การต้านพาราควอทใน Chlamydomonas reinhardtii

นางสาวสุพร นุชดำรงค์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2534

ISBN 974-579-424-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

017421 i 10312626

Paraquat Resistance in *Chlamydomonas reinhardtii*

Miss Suporn Nuchadomrong

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy

Program Biological Sciences

Graduate School

Chulalongkorn University

1991

ISBN 974-579-424-4

Thesis Title Paraquat Resistance in Chlamydomonas reinhardtii

By Miss Suporn Nuchadomrong

Program Biological Sciences

Thesis Advisor Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.

Accepted by the Graduate School , Chulalongkorn University in the Partial Fulfilment of the requirement for the Degree of Doctor of Philosophy.

.....Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhaya, Ph.D.)

Thesis Committee

.....Chairman

(Associate Professor Kamchad Mongkolkul, Ph.D.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Sanha Panichajakul, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Pairoh Pinphanichakarn, Ph.D.)

.....Member

(Phongtep Antarikanonda, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Aran Incharoensakdi, Ph.D.)

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เป็นบทคัดย่อที่ผ่านการอนุมัติแล้ว

สุพร นุชดำรงค์ : การต้านพาราควอทใน Chlamydomonas reinhardtii (PARAQUAT RESISTANCE IN Chlamydomonas reinhardtii) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. สัณห์ พณิชยกุล, 194 หน้า. ISBN 974-579-424-4.

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษากลไกการต้านสารปราบวัชพืช "พาราควอท" ของสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดี่ยว Chlamydomonas reinhardtii โดยใช้สายพันธุ์ต้านพาราควอทที่พัฒนาขึ้นเองในห้องปฏิบัติการเป็นแม่แบบทดลองเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (137c) สายพันธุ์ต้านพาราควอท PPQ-10/3 ซึ่งได้จากการคัดเลือกภายใต้แรงกดดันของสารพาราควอท และสายพันธุ์ UPQ-S1 ซึ่งได้จากการกลายพันธุ์ด้วยสาร 5-ฟลูออโรดีออกซียูริดีน มีค่าการต้านพาราควอทที่วัดได้โดยค่า LD_{50} ด้วยวิธีการที่พัฒนาขึ้นเองเป็น 6.48 และ 3.07 ไมโครโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่ค่า LD_{50} ของสายพันธุ์ 137c เท่ากับ 0.36 ไมโครโมลาร์ ทั้ง PPQ-10/3 และ UPQ-S1 ต่างให้ค่าการเจริญต่ำกว่าสายพันธุ์ปกติ สภาวะขาดพาราควอทในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นผลให้การแบ่งตัวของสายพันธุ์ต้านพาราควอทผิดปกติ เมื่อวิเคราะห์ชั้นของผนังเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน (TEM และ SEM) พบว่า สายพันธุ์ต้านพาราควอทน่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของลักษณะการจับตัวของผนังเซลล์ชั้นนอกสุด ปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเซลล์ UPQ-S1 ใกล้เคียงกับของเซลล์ปกติและลักษณะการเรียงตัวของแผ่นเยื่อคลอโรพลาสต์ไม่ต่างกันคือ เป็นกรานาสายยาว ในขณะที่กรานาของ PPQ-10/3 เรียงตัวซ้อนทบกันหลายชั้น พบว่าปริมาณคลอโรฟิลล์เอในเซลล์สายพันธุ์นี้เพิ่มขึ้น 2-3 เท่าจากระดับที่วัดได้ในสายพันธุ์ 137c นอกจากนี้ยังตรวจพบแวคคิวโอลที่มีขนาดใหญ่จำนวนมากในเซลล์ต้านพาราควอททั้งสองสายพันธุ์ แอคติวิตีของ photosystem I ในสายพันธุ์ UPQ-S1 สูงกว่าของ PPQ-10/3 และสายพันธุ์ 137c ประมาณ 2 เท่า การเจริญของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยพาราควอทปริมาณที่ไม่เป็นพิษมีผลทำให้แอคติวิตีของ photosystem I ลดลงในเซลล์ทั้ง 3 สายพันธุ์อย่างเห็นได้ชัด การนำเข้าของพาราควอทในเซลล์ C. reinhardtii อาศัย carrier-mediated system โดยใช้พลังงานบางส่วนจากออกซิเดทิฟฟอสฟอริลเลชัน เนื่องจากการนำเข้าถูกยับยั้งได้ด้วยไดไนโตรฟีนอล การเจริญของเซลล์ PPQ-10/3 และ UPQ-S1 ภายใต้อิทธิพลของพาราควอทสามารถเหนี่ยวนำการนำเข้าพาราควอทให้เพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าจากค่าปกติ ค่า K_m ของการนำสารพาราควอทผ่านเยื่อเซลล์ PPQ-10/3 สูงกว่าค่าที่วิเคราะห์ได้ในเซลล์ UPQ-S1 และสายพันธุ์ดั้งเดิม 137c ประมาณ 7 เท่า แม้ว่าพาราควอทจะถูกนำเข้าเซลล์ทั้ง 3 ชนิดในปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด แต่ปริมาณพาราควอทที่วัดได้ในคลอโรพลาสต์ของเซลล์ PPQ-10/3 และ UPQ-S1 น้อยกว่าที่วัดได้ในคลอโรพลาสต์ของ 137c ประมาณ 60% เซลล์ต้านพาราควอท PPQ-10/3 และ UPQ-S1 มีระดับเอนไซม์กำจัดพิษซุปเปอร์ออกไซด์ (ซุปเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเตส (SOD), คะตาเลส, และแอสคอร์เบตเปอร์ออกซิเดส) สูงกว่าเซลล์ 137c อย่างชัดเจน สามารถตรวจพบไอโซไซม์ของ SOD เพิ่มขึ้น 4 ชนิดในเซลล์ UPQ-S1 ซึ่งไม่พบใน PPQ-10/3 และ 137c คือ คอปเปอร์/ซิงค์-เอนไซม์ 2 ไอโซไซม์ และแมงกานีส-เอนไซม์ 2 ไอโซไซม์ ผลการวิจัยที่น่าสนใจอีกประการหนึ่งคือการเสริมสารพาราควอทในอาหารเพาะเลี้ยงของเซลล์ทั้ง 3 สายพันธุ์มีผลทำให้ระดับเอนไซม์ SOD ลดลงประมาณ 20-50% โดยพบว่าเป็นการลดลงของไอโซไซม์บางชนิด ในขณะที่แอคติวิตีของแอสคอร์เบต เปอร์ออกซิเดส เพิ่มขึ้นชัดเจนในเซลล์ที่ได้รับผลกระทบของพาราควอทดังกล่าว พอจะสรุปได้ว่ากลไกการต้านพาราควอทของ PPQ-10/3 และ UPQ-S1 น่าจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระบบการกำจัดพาราควอทออกจากคลอโรพลาสต์ และระบบป้องกันพิษของเรดิกัลของออกซิเจนโดยผ่านเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องทั้งสามชนิด ผลการวิเคราะห์รูปแบบเรสตริคชันของดีเอนเอในคลอโรพลาสต์ที่แยกจากสายพันธุ์ UPQ-S1 ยังแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงรูปแบบเรสตริคชันเมื่อย่อยดีเอนเอด้วยเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอส Pst I

ภาควิชา ชีวเคมี
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ
ปีการศึกษา 2533

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

SUPORN NUCHADOMRONG : PARAQUAT RESISTANCE IN Chlamydomonas reinhardtii. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SANHA PANICHAJAKUL, Ph.D., 194 PP. ISBN 974-579-424-4.

In this research project, the resistance mechanisms to the herbicide "paraquat" in unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii were investigated by using resistant cell lines constructed from the corresponding wild type cell (137c). PPQ-10/3 strain was obtained from stepwise selection under the herbicide pressure. UPQ-S1 strain was from chloroplast DNA directed mutagenesis by 5-fluorodeoxyuridine. The degree of paraquat resistance, which was determined by the establishing lethal dose test, was found to be 6.48 and 3.07 µM for PPQ-10/3 and UPQ-S1 respectively in comparison with the value of 0.36 µM for 137c. Maximum growth yield of both resistant strains were significantly lower than that of the wild type. Absence of paraquat in the culture medium caused abnormal cell division which from TEM and SEM evidences indicated the alteration in the deposition of the outermost wall layer. Chlorophyll a content of UPQ-S1 was not distinct from that found in the wild type which was concomitant with the similar organization of chloroplast discs into very long grana. Whereas in PPQ-10/3 about 2-3 folds higher in the chlorophyll a content was detected accompanying with the highly stacking degree of grana. Extensive large number and size of vacuoles were observed in paraquat resistant strains together with the enlargement of cells. Activity of UPQ-S1 photosystem I was 2 folds over that of PPQ-10/3 and 137c. Paraquat treatment at sublethal dose caused reduction in photosystem I activity in all cell types. Paraquat uptake in C. reinhardtii was illustrated to be facilitated via a membrane carrier-mediated system which was partially inhibited by dinitrophenol, the specific uncoupling agent for oxidative phosphorylation. Paraquat treatment in advance somewhat stimulated paraquat uptake by 2 folds in PPQ-10/3 and UPQ-S1 but not in 137c strain. The K_m value of paraquat transport across cell membrane of PPQ-10/3 was about seven times of UPQ-S1 and the wild type 137c. No significant difference in the amount of paraquat uptake was observed in paraquat resistant and wild type cells. The amount of the herbicide influx into the chloroplasts was decreased (60%) in the resistant cells when comparing to 137c. The enzymes of the superoxide detoxification pathway, superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase, were found to be at constitutively elevated levels in UPQ-S1 and especially PPQ-10/3 strains. Distinct isozyme patterns of superoxide dismutase were observed in UPQ-S1 with two novel copper/zinc-enzymes and two manganese-enzymes. Paraquat treatment unexpectedly reduced the cellular superoxide dismutase content (20-50%) and caused diminution of some isozymes in the three algal strains, whereas, markedly increased activity of ascorbate peroxidase was observed. The data conclusively revealed that sequestration of paraquat from chloroplasts and the ability to prevent peroxidative damage by oxygen radicals were the biochemical bases of paraquat resistance in C. reinhardtii PPQ-10/3 and UPQ-S1 cell lines. Moreover, analyses of chloroplast DNA of UPQ-S1 demonstrated interestingly altered restriction pattern comparing to that of the wild type when digested with the same Pst I endonuclease.

ภาควิชา ชีวเคมี ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2533 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

ACKNOWLEDGEMENT

I would like to express my deepest gratitude to my advisor, Associate Professor Sanha Panichajakul, for his valuable advice, understanding, and constant encouragement throughout my study here at this Department of Biochemistry and during the preparation of this thesis.

I am very grateful to Dr. Kamchad Mongkolkul , Dr. Pairoh Pinphanichakarn, Dr. Phongtep Antarikanonda, and Dr. Aran Incharoensakdi for serving as thesis committee, for their valuable comments and criticisms.

I am also indebted to the fellowship from the Faculty of Science , Chulalongkorn University , the Study and Research Fund from the Science and Technology Development Board, the fellowship from the National Centre of Genetic Engineering and Biotechnology, and to Rachadapisek Sompoj Research Grant, Chulalongkorn University. Sincere appreciation is expressed to Professor J.-D. Rochaix at the Department of Molecular Biology, University of Geneva, Switzerland , and the Pflazenphysilogisches Institut der Universitat Gottingen, Germany for their kindness in sending the algal strains. My special thanks is due to Dr. Pissawon Jiamsombat at the Biochemistry Unit, Central Laboratory and Greenhouse Complex, KURDI, Kasetsart University, Kamphaengsaen Campus for her kind advice in electron microscopic interpretations, and to Dr. Vichien Rimpanichakit at this Department of Biochemistry for his valuable suggestions in analysis

of DNA restriction patterns.

My sincere gratitude belongs to all instructors at this department for giving me academic background during my study here. Much appreciation is expressed to all colleagues here for their assistance and entertainment during preparation of this manuscript.

CONTENTS

THAI ABSTRACT..... iv

ENGLISH ABSTRACT..... v

ACKNOWLEDGEMENT..... vi

CONTENTS viii

LIST OF TABLES..... xiii

LIST OF FIGURES..... xv

ABBREVIATIONS..... xix

CHAPTER

I INTRODUCTION

1.1 Background of herbicide resistance..... 1

1.2 Paraquat toxicity..... 3

1.3 Enzyme defense system against paraquat toxicity..... 8

1.4 Paraquat resistance in living organisms..... 10

1.5 General properties of Chlamydomonas reinhardtii..... 14

1.6 Herbicide resistance in Chlamydomonas reinhardtii 17

1.7 Aims of the research 20

1.8 Research approaches 20

II MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials 22

2.2 Algal cultures 24

2.3 Growth determination 25

2.4 Determination of cell mortality 27

2.5 Evaluation of paraquat effect 27

2.6 Development of paraquat resistant mutants 28

2.7 Preparation of autolysin 29

2.8 Preparation of protoplast 31

2.9 Isolation of chloroplast 31

2.10 Electron microscopic analysis 33

2.11 Measurement of PS I activity 34

2.12 Measurement of [^{14}C]paraquat uptake 37

2.13 Enzyme assay 39

2.14 Enzyme induction 41

2.15 Isozyme of superoxide dismutase 42

2.16 Detection of proteins in cell lysate by PAGE.. 44

2.17 Analysis of chloroplast DNA 45

III CONSTRUCTION OF PARAQUAT RESISTANT MUTANTS

3.1 Growth of C. reinhardtii 137c 49

3.2 Effect of paraquat on C. reinhardtii 137c ... 52

3.3 Construction of paraquat resistant mutants by selection under the herbicide pressure

3.3.1 First step selection 55

3.3.2 Second step selection 57

3.3.3 Growth characteristic of C. reinhardtii PPQ-10/3 61

3.3.4 Effect of paraquat on C. reinhardtii PPQ-10/3 63

3.4 Construction of paraquat resistant mutants by 5-fluorodeoxyuridine mutagenesis

3.4.1 First mutagenesis 67

3.4.2 Second mutagenesis 68

3.4.3 Growth characteristic of UPQ-S1 70

3.4.4 Effect of paraquat on UPQ-S1 70

IV MORPHOLOGY AND PHYSIOLOGY

4.1 Light microscopy 76

4.2 Scanning electron microscopy 76

4.3 Transmission electron microscopy 81

4.4 Activity of photosystem I 86

V BIOCHEMICAL PROPERTIES OF PARAQUAT RESISTANT MUTANTS OF CHLAMYDOMONAS REINHARDTII

5.1 Preparation of protoplast and chloroplast

5.1.1 Protoplast formation 89

5.1.2 Isolation of chlorolast 92

5.2 Uptake of [^{14}C]paraquat

5.2.1 Reliability of the method for measurement of [^{14}C]paraquat 95

5.2.2 Optimization of the method for [^{14}C]paraquat uptake..... 95

5.2.3 Time course of [^{14}C]paraquat uptake 97

5.2.4 [^{14}C]paraquat uptake of the whole cell ... 99

5.2.5 Effect of an energy uncoupling agent on [^{14}C]paraquat uptake 101

5.2.6 [^{14}C]paraquat uptake of paraquat pretreated cells 104

5.2.7 [^{14}C]paraquat uptake of protoplast 104

5.2.8 Kinetic constants for [^{14}C]paraquat uptake 106

5.2.9 Distribution of [^{14}C]paraquat into chloroplast 115

5.3 Comparative studies of the enzyme content

5.3.1 Determination of cell number..... 117

5.3.2 Enzyme content in C. reinhardtii 137c..... 117

5.3.3 Enzyme content in C. reinhardtii PPQ-10/3 119

5.3.4 Enzyme content in C. reinhardtii UPQ-S1... 123

5.4 Effect of cyanide on superoxide dismutase..... 125

5.5 Effect of paraquat treatment on enzymes content

5.5.1 Effect of paraquat treatment on the target enzymes production in C. reinhardtii 137c 127

5.5.2 Effect of paraquat treatment on the target enzymes production in C. reinhardtii PPQ-10/3 129

5.5.3 Effect of paraquat treatment on the target enzymes production in C. reinhardtii UPQ-S1 131

5.6 Effect of paraquat treatment on isozymes of superoxide dismutase

5.6.1 Effect of paraquat on isozymes of C. reinhardtii 137c superoxide dismutase ..133

5.6.2 Effect of paraquat on isozymes of C. reinhardtii PPQ-10/3 superoxide dismutase 136

5.6.3 Effect of paraquat on isozymes of C. reinhardtii UPQ-S1 superoxide dismutase 137

5.7 Patterns of cellular proteins in C. reinhardtii 141

5.8 Analysis of chloroplast DNA restriction patterns

5.8.1 Purification of chloroplast DNA 144

5.8.2 Identification of alterations in chloroplast DNA 144

VI Discussion

6.1 Establishment of method for evaluation of paraquat toxicity 149

6.2 Construction of paraquat resistant mutants.... 151

6.3 General remarks of C. reinhardtii 137c and paraquat resistant strains 154

6.4 Electron microscopy and Physiological implications 156

6.5 Uptake of paraquat in C. reinhardtii 159

6.6 Correlation of enzyme defense system and paraquat resistance 162

6.7 Molecular approach of C. reinhardtii UPQ-S1: emphasis on chloroplast DNA 168

REFERENCES..... 173

APPENDIX 187

BIOGRAPHY 194

LIST OF TABLES

Table		Page
1.1	Distribution of metalloenzymes of superoxide dismutase.....	9
4.1	Photosystem I activity and chlorophyll a content.....	88
5.1	Recovery and precision of the 10%TCA extraction method	96
5.2	Comparative values of kinetic constants for [^{14}C]paraquat uptake in whole cells.....	112
5.3	Comparative values of kinetic constants for [^{14}C]paraquat uptake in cells previously grown in medium with paraquat.....	113
5.4	Comparative values of kinetic constants for [^{14}C]paraquat uptake in protoplasts.....	114
5.5	Content of superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase in C. reinhardtii 137c.....	120
5.6	Content of superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase in C. reinhardtii PPQ-10/3.....	122
5.7	Content of superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase in C. reinhardtii UPQ-S1.....	124

5.8 Effect of paraquat treatment on superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase in C. reinhardtii 137c..... 128

5.9 Effect of paraquat treatment on superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase in C. reinhardtii PPQ-10/3 130

5.10 Effect of paraquat treatment on superoxide dismutase, catalase, and ascorbate peroxidase in C. reinhardtii UPQ-S1..... 132

LIST OF FIGURES

Figure		page
1.1	Proposed mechanism of paraquat action	5
1.2	Formation of paraquat radical and oxygen radical formula.....	6
1.3	Life cycle of Chlamydomonas reinhardtii	15
2.1	Set up of an apparatus for C. reinhardtii cultivation.....	26
2.2	Set up for PS I activity determination.....	35
3.1	Growth of C. reinhardtii 137c.....	50
3.2	Growth curve of C. reinhardtii 137c.....	51
3.3	Spot test of paraquat effect on C. reinhardtii 137c	53
3.4	Effect of paraquat on growth of C. reinhardtii 137c	54
3.5	Effect of praquat on growth and viability of C. reinhardtii 137c	56
3.6	Growth pattern of C. reinhardtii PPQ-1.....	58
3.7	Adaptation of C. reinhardtii PPQ-1.....	59
3.8	Effect of paraquat on growth of C. reinhardtii PPQ-1..	60
3.9	Growth curve of C. reinhardtii PPQ-10/3.....	62
3.10	Spot test of paraquat effect on C. reinhardtii PPQ-10/3.....	64

3.11 Effect of paraquat on growth of
C. reinhardtii PPQ-10/3..... 65

3.12 Effect of praquat on growth and
viability of C. reinhardtii PPQ-10/3..... 66

3.13 Effect of paraquat on growth of C. reinhardtii UPQ-2.. 69

3.14 Growth curve of C. reinhardtii UPQ-S1..... 71

3.15 Spot test of paraquat effect on
C. reinhardtii UPQ-S1..... 72

3.16 Effect of paraquat on growth of
C. reinhardtii UPQ-S1..... 74

3.17 Effect of paraquat on growth and viability of
C. reinhardtii UPQ-S1..... 75

4.1 Light micrographs of C. reinhardtii..... 77

4.2 Scanning electron micrographs of
normal cells of C. reinhardtii..... 79

4.3 Scanning electron micrographs of paraquat
treated cells of C. reinhardtii..... 80

4.4 Transmission electron micrographs of
normal cells of C. reinhardtii..... 83

4.5 Transmission electron micrographs of paraquat
treated cells of C. reinhardtii 85

5.1 Effect of Triton X-100 on cell
hydrolysis in C. reinhardtii..... 90

5.2 Time course of protoplast formation..... 91

5.3 Protoplasts of C. reinhardtii..... 93

5.4 Illustration of C. reinhardtii chloroplast..... 94

5.5 Optimization of factors affecting [^{14}C]paraquat uptake..... 98

5.6 Time course of [^{14}C]paraquat uptake..... 100

5.7 [^{14}C]paraquat uptake in whole cells of C. reinhardtii..... 102

5.8 Effect of dinitrophenol on [^{14}C]paraquat uptake..... 103

5.9 [^{14}C]paraquat uptake in paraquat pretreated cells..... 105

5.10 [^{14}C]paraquat uptake in protoplasts..... 107

5.11 A double reciprocal plot for [^{14}C]paraquat uptake in whole cells..... 109

5.12 A double reciprocal plot for [^{14}C]paraquat uptake in cells previously grown in medium plus paraquat..... 110

5.13 A double reciprocal plot for [^{14}C]paraquat uptake in protoplasts..... 111

5.14 Comparative distribution of [^{14}C]paraquat in protoplasts and chloroplasts..... 116

5.15 Correlation between the number of cells and the absorption of green pigment of C. reinhardtii..... 118

5.16 Effect of cyanide on crude superoxide dismutase..... 126

5.17 Zymograms of superoxide dismutase of
C. reinhardtii 137c..... 134

5.18 Zymograms of superoxide dismutase of
C. reinhardtii PPQ-10/3..... 138

5.19 Zymograms of superoxide dismutase of
C. reinhardtii UPQ-S1..... 140

5.20 Electrophoregrams of native proteins..... 143

5.21 UV fluorescence of DNAs-ethidium bromide
in cesium chloride gradient..... 145

5.22 Electrophoregrams of BamH I, EcoR I, and Pst I
digests of purified chloroplast DNA from
C. reinhardtii UPQ-S1 and 137c..... 147

5.23 Electrophoregrams of BamH I, EcoR I, and Pst I
digests of purified chloroplast DNA from
UPQ-S1 and 137c..... 148

ABBREVIATIONS

^{O}C	=	degree celcius
kb	=	kilobase
LD_{50}	=	lethal dose-50
psi	=	pound per square inches
min	=	minute
cm	=	centimetre
mm	=	millimetre
nm	=	nanometre
u	=	micron
g	=	gram
mg	=	milligram
ug	=	microgram
L	=	litre
ml	=	millilitre
ul	=	microlitre
M	=	molar
mM	=	millimolar
uM	=	micromolar
rpm	=	round per minute
V	=	volt
W	=	watt

Bis	=	N,N-methylene bis acrylamide
DCIP	=	Dichloroindophenol
DCMU	=	3(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethyl urea
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
DNP	=	Dinitrophenol
EDTA	=	Ethylene diamine tetra-acetic acid
FdUd	=	5-Fluorodeoxyuridine
MR	=	Methyl red
NBT	=	Nitro blue tetrazolium
PEG	=	Polyethylene glycol
TCA	=	Trichloroacetic acid
TEMED	=	N,N,N,N-Tetramethylene diamine
Tris	=	Tris-hydroxymethyl aminomethane
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
PS I	=	Photosystem I
PS II	=	Photosystem II
Cu/Zn-SOD	=	Copper/zinc-superoxide dismutase
Fe-SOD	=	iron-superoxide dismutase
Mn-SOD	=	manganese-superoxide dismutase
PAGE	=	Polyacrylamide gel electrophoresi
SEM	=	Scanning electron microscopy
TEM	=	Transmission electron microscopy