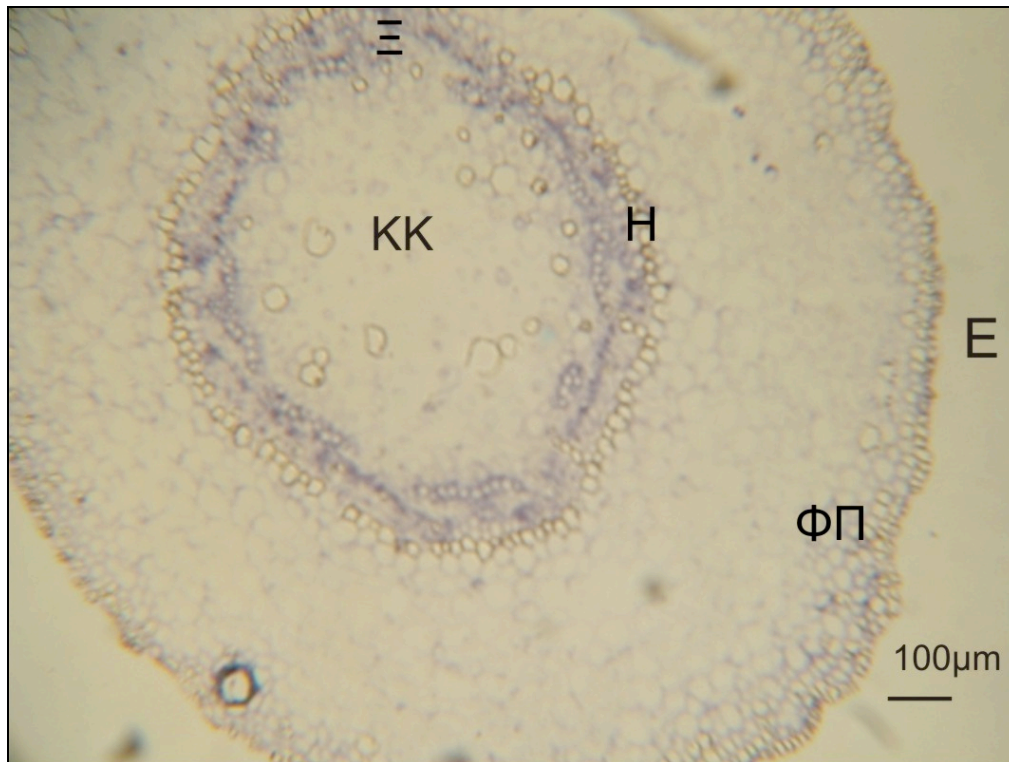


Ανοσοεντοπισμός και δραστηριότητα της β-αμυλάσης και της NAD-ισοκιτρικής αφυδρογονάσης φυταρίων βαμβακιού που προήλθαν από προχειρισμό σπερμάτων σε θερμοκρασία 40°C.



**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
του μεταπτυχιακού φοιτητή Τσανικλίδη Γεωργίου**
Πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών υπό την
επίβλεψη του
Επ. Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι.
Αθήνα 2009

Ευχαριστίες:

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους

κ. Αϊβαλάκι για την βοήθεια και τη καθοδήγηση του καθώς και τους κ. Κίντζιο και κ. Φασσέα.

Την οικογένειά μου και την κ. Αγγελική Μπουτίνη.

Τους Νίκο Νικολουδάκη, Γιώργο Κατοίκο και Κώστα Σκαρμούτσο καθώς και όλους τους συμφοιτητές μου.

Τους κ. Νίκο Βάγια και Κυριακή Δάλλα από για την κατανόηση και τη βοήθεια τους.

Περιεχόμενα	Σελίδα
Περίληψη	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Το βαμβάκι: το φυτό, ιστορικό, είδη και εξέλιξη	
1.1.1 Είδη και Καταγωγή του βαμβακιού	7
1.1.2 Μορφολογία του είδους <i>Gossypium hirsutum</i>	8
1.1.3 Εμπορικές χρήσεις, η καλλιέργεια στην Ελλάδα και στον κόσμο	10
1.2 Η σύσταση και η βλάστηση των σπερμάτων του βαμβακιού	11
1.2.1 Η σύσταση των σπερμάτων	11
1.2.2 Η βλάστηση των σπερμάτων	11
1.2.3 Επίδραση της γήρανσης στις φυσιολογικές και βιοχημικές διεργασίες στα σπέρματα	15
1.3.1 Ισοκιτρική αφυδρογονάση	17
1.3.2 Οι τύποι της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης και ο ρόλος τους	17
1.3.2.1 Η NADP ⁺ εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH)	17
1.3.2.2 Η NAD ⁺ εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση (IDH)	18
1.3.3.3 Χαρακτηριστικά της NAD ⁺ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης	19
1.3.3 Η ισοκιτρική αφυδρογονάση σε συνθήκες καταπόνησης	21
1.4.1 Το άμυλο	23
1.4.2 Η υδρόλυση του αμύλου	24
1.4.3 Η υδρόλυση των επιφανειακών γλυκανών.	26
1.5.1 Η α-αμυλάση	29
1.5.2 Ένζυμα αποδιακλάδωσης	30
1.5.3 Η β-αμυλάση. Η δομή και η λειτουργία του ενζύμου	30
1.5.4 Ο εντοπισμός του ενζύμου	32
1.5.5 Η β-αμυλάση σε καταστάσεις καταπόνησης	33
1.5.6 Η β-αμυλάση στη βλάστηση των σπερμάτων	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. Υλικά και Μέθοδοι	35
2.1 Οι διαδικασίες του πειράματος	35
2.2 Βλάστηση σπερμάτων που είχαν εκτεθεί σε υψηλές θερμοκρασίες	35
2.3 Η εκχύλιση των ενζύμων	36
2.4 Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων	37
2.5 Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της β-αμυλάσης και της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης	38
2.6 Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών	39
2.6 Η ανοσοβιοχημική μελέτη	40
2.7 Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης και της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης	42

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. Αποτελέσματα	46
3.1.1 Μέτρηση της βλαστικότητας των σπερμάτων βαμβακιού μετά την επίδραση θερμοκρασίας 40°C	46
3.1.2 Μέτρηση νωπού βάρους 200 σπερμάτων	46
3.2 Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης και της NAD ⁺ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης	48
3.3 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων	53
3.4 Ο προσδιορισμός της in vitro δραστηρότητας της β-αμυλάσης και της NAD ⁺ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. Συζήτηση	57
4.1 Επίδραση στη βλαστικότητα και ζωτικότητα των σπερμάτων	58
4.2 Η NAD ⁺ ισοκιτρική αφυδρογονάση	58
4.3 Η β-αμυλάση	60
4.4 Συμπεράσματα	64
Βιβλιογραφία	65

Περίληψη

Στη γεωργική πρακτική έχει παρατηρηθεί ότι η χρήση βαμβακόσπορου που έχει αποθηκευθεί για χρονικά διαστήματα μεγαλύτερα του έτους έχει μειωμένη βλαστικότητα αλλά κυρίως παράγει φυτά μειωμένης ζωτικότητας. Ο χειρισμός των σπερμάτων στους 40°C για μία ημέρα θεωρείται ότι αντιστοιχεί σε αποθήκευση του σπόρου στις συνήθεις συνθήκες για ένα έτος.

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η δραστικότητα ενός υδρολυτικού ενζύμου του κεντρικού μεταβολισμού (της β-αμυλάσης) και ενός μιτοχονδριακού ενζύμου (της NAD⁺ εξαρτώμενης ισοκιτρικής αφυδρογονάσης) σε αρτίβλαστα βαμβακιού των οποίων τα σπέρματα δέχθηκαν επίδραση θερμοκρασίας (40°C) για 1,2,3,4 και 5 ημέρες. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του ανοσοεντοπισμού, και του *in vitro* προσδιορισμού της δραστικότητας των ενζύμων τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης όσο και σε συνθήκες καταπόνησης υψηλών θερμοκρασιών.

Στις ρίζες, η β-αμυλάση εντοπίστηκε στην καλύπτρα, στην επιδερμίδα καθώς και στον κεντρικό κύλινδρο. Στα υποκοτύλια, η παρουσία της πρωτεΐνης ήταν έντονη στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Τέλος, στις κοτύλες, υπήρχε γενικευμένο έντονο σήμα αλλά ισχυρότερο ήταν στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.

Η NAD⁺-εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση στις ρίζες εντοπίστηκε στην καλύπτρα, στην επιδερμίδα καθώς και στον κεντρικό κύλινδρο. Στα υποκοτύλια εντοπίστηκε κοντά στην επιδερμίδα και στην εξωτερική περιοχή του κεντρικού κυλίνδρου. Ενώ στις κοτύλες εντονότερο ήταν το σήμα στην περιοχή των ηθμαγγειωδών δεσμίδων και ιδιαίτερα στα αγγεία του ξύλου.

Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά από ηλεκτροφόρηση μη μετουσιωμένων πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κατέδειξε για την μεν β-αμυλάση, ύπαρξη τριών ηλεκτροφορητικών ζωνών (bands) που πιθανόν να σημαίνει ύπαρξη πολλών ισοτύπων του ενζύμου, ενώ για την NAD⁺ ισοκιτρική αφυδρογονάση δύο ηλεκτροφορητικών ζωνών.

Τέλος, η *in vitro* δραστικότητα της β-αμυλάσης στα εκχυλίσματα των ριζών, των κοτυλών καθώς και των υποκοτυλίων αυξήθηκε μετά από το χειρισμό ενώ η δραστικότητα της NAD⁺ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης μειώθηκε. Αυτό πιθανόν σημαίνει μερική αποδιοργάνωση του κεντρικού μεταβολισμού αφού εξαιτίας του θερμικού χειρισμού παρατηρείται μεν αυξημένη δραστικότητα της β-αμυλάσης (που παραπέμπει σε

υδρόλυση του αμύλου) αλλά μείωση στη δραστικότητα της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (μειωμένη μιτοχονδριακή δραστηριότητα).

Abstract

In agricultural practice has been observed that the use of cottonseed stored for periods in excess of the year has reduced germination but mainly it produces plants with reduced vitality. Handling of the seeds to 40°C for one day is deemed equivalent to storing the seeds for one year in normal storing conditions.

In this study, the hydrolytic activity of an enzyme of central metabolism (beta-amylase) and a mitochondrial enzyme (the NAD^+ dependent isocitrate dehydrogenase) in cotton seedlings whose seeds have accepted temperature impact (40°C) for 1,2,3,4 and 5 days was examined. For this purpose, we used the techniques of immunolocalization and in vitro activity assay of enzymes in both normal growth and stress conditions at high temperatures.

In roots, beta-amylase was detected in the hood, the skin and the central cylinder. In hypocotyls the presence of protein was marked in vascular bundles. Finally, in cotyledons, there was a generalized intense signal, but it was stronger in vascular bundles. The immunolocalization of beta-amylase on nitrocellulose membrane after electrophoresis of non-denaturized protein extracts revealed the true b-amylase, having five electrophoretic bands that probably mean that there are several isoforms of the enzyme, for the NAD^+ isocitrate dehydrogenase two electrophoretic bands were found. Finally, the in vitro activity of beta-amylase in extracts of roots, the cotyledon and of hypocotyls increased after treatment, while the activity of NAD^+ isocitrate dehydrogenase decreased. This may mean partial disruption of the central metabolism as a result of thermal treatment because while enhanced activity of beta-amylase (referring to starch hydrolysis), the activity of NAD^+ isocitrate dehydrogenase (decreased mitochondrial activity) is reduced.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Το βαμβάκι: το φυτό, ιστορικό, είδη και εξέλιξη

1.1.1. Είδη και Καταγωγή του βαμβακιού

Το βαμβάκι ανήκει στο γένος *Gossypium* της οικογένειας Malvaceae. Είναι φυτό των τροπικών και υποτροπικών περιοχών (Χριστίδης 1965). Το γένος περιλαμβάνει περίπου 50 είδη φυτών, από αυτά τα 4 καλλιεργούνται σε διάφορες περιοχές του κόσμου (Brubaker *et al.*, 1999). Τα είδη που καλλιεργούνται είναι τα *Gossypium herbaceum* L., *Gossypium arboreum* L., *Gossypium hirsutum* L. και το *Gossypium barbadense* L. (Τόλης 1986). Τα άγρια είδη δεν παρέχουν ίνες κατάλληλες για βιομηχανική επεξεργασία αλλά λόγω της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν σε κάποιες ασθένειες και εχθρούς είναι χρήσιμα για την γενετική βελτίωση των καλλιεργούμενων ποικιλιών. Τα καλλιεργούμενα είδη εξημερώθηκαν από τον άνθρωπο σε διάφορες περιοχές της υφηγίου, ανεξάρτητα, κυρίως για την παραγωγή ινών για την υφαντουργία (Brubaker *et al.*, 1999). Ο ακριβής τόπος καταγωγής του βαμβακιού δεν έχει εντοπιστεί. Παρόλα αυτά οι περιοχές με την μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα του είδους είναι το Μεξικό (με 18 είδη), η βορειοδυτική Αφρική και η Αραβία (με 14 είδη) και η Αυστραλία (με 17 είδη). Δεδομένα αλληλουχίας DNA από τα υπάρχοντα είδη του γένους *Gossypium* δείχνουν ότι το είδος έχει ηλικία περίπου 12,5 εκατομμύρια έτη (Wendel and Albert 1992; Seelanan *et al.*, 1997). Αρχαιολογικά ευρήματα δείχνουν ότι ίνες βαμβακιού χρησιμοποιούνται από το 6000 πΧ. Μία βαμβακερή κλωστή βρέθηκε ότι είχε χρησιμοποιηθεί για να δεθούν χάλκινες σφαίρες στο Mehgarh του Πακιστάν την 6^η χιλιετία πΧ., αν και είναι άγνωστο αν η ίνα προέρχεται από καλλιεργούμενη ποικιλία (Moulhetat *et al.*, 2002). Πιθανότατα πάντως οι ίνες του βαμβακιού είχαν και άλλες χρήσεις όπως το δέσιμο πληγών ή χρήση ως υλικό παραγεμίσματος πριν ανακαλυφθεί η τεχνολογία παραγωγής νήματος (Smith 1995). Ευρήματα στο Μεξικό δείχνουν ότι η χρήση του βαμβακιού χρονολογείται από το 5800 πΧ. ενώ υπολείμματα από κάψες στο Περού τοποθετούν εκεί την έναρξη χρήσης καλλιεργούμενων ποικιλιών του είδους *Gossypium barbadense* L.. Ευρήματα δείχνουν επίσης ότι από το 2500 πΧ. έως το 1000 πΧ υπήρξε μία συνεχής αύξηση της αντοχής των ινών καθώς και του μεγέθους των σπερμάτων, χαρακτηριστικών που

οδηγούν στην αύξηση της παραγωγικότητας του φυτού (Stephens and Moseley 1973). Το γεωγραφικό κέντρο του *Gossypium hirsutum* L. τοποθετείται στη Βόρεια και Κεντρική Αμερική και πιθανότατα η καλλιέργεια του είχε αρχίσει από τους κατοίκους της περιοχής την προ-Κολομβιανή περίοδο (Brubaker and Wendel 1994). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιορισμένη γενετική παραλλακτικότητα του είδους *Gossypium hirsutum* L., αυτή αποδίδεται στη συνεχή βελτίωση των καλλιεργούμενων ποικιλιών για τα χαρακτηριστικά όπως ο ετήσιος κύκλος καλλιέργειας, ο μειωμένος λήθαργος των σπερμάτων, η ανεξάρτητη από τη φωτοπερίοδο άνθιση, χαρακτηριστικά που υπάρχουν στις σύγχρονες καλλιεργούμενες ποικιλίες (Iqbal et al., 2001), καθώς και η αντοχή στο ψύχος, που έχει οδηγήσει στην εξάπλωση του φυτού σε περιοχές με εύκρατο κλίμα (Γαλανοπούλου-Σενδουκά 1979). Το γένος *Gossypium* χωρίζεται σε 8 διπλοειδείς ομάδες γονιδιώματος (ονομάζονται με γράμματα του λατινικού αλφάβητου από το A έως το K) με βάση χρωμοσωμικές ομοιότητες (Steward 1995). Τα είδη *Gossypium hirsutum* L. και *Gossypium barbadense* L. στα οποία ανήκει η συντριπτική πλειοψηφία των καλλιεργούμενων ποικιλιών, είναι αλλοτετραπλοειδή, ανήκουν στην ομάδα γονιδιώματος AD (περιέχουν ένα γονιδίωμα της ομάδας A και ένα της ομάδας D) (Wentel et al., 1989; Yu et al., 2008). Η ταυτότητα των διπλοειδών ειδών καθώς και το πώς ήλθαν σε επαφή για την παραγωγή τετραπλοειδών δεδομένου ότι τα διπλοειδή A και D ευδοκίμουν σήμερα σε διαφορετικά ημισφαίρια, είναι άγνωστο (Endrizzi et al., 1985).

1.1.2. Μορφολογία του είδους *Gossypium hirsutum* L.

Στο *Gossypium hirsutum* L. (χνοώδες βαμβάκι) ανήκουν τα αμερικάνικα βαμβάκια που είναι γνωστά με το όνομα Upland. Είναι διαδεδομένο σε ολόκληρο τον κόσμο και είναι το μόνο που καλλιεργείται στην Ελλάδα. Από το είδος αυτό προέρχεται το 90% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής. Τα φυτά που είδους αυτού είναι κατά κανόνα μονοετείς θάμνοι που το ύψος τους κυμαίνεται από 0,60-1,80m, με εξαίρεση κάποιες ποικιλίες που παράγουν πολυετείς θάμνους ή δέντρα (Τόλης 1986). Ο βλαστός είναι πλούσιος σε κυτταρίνη και σε αυτόν υπάρχουν αδένες που εκκρίνουν το αλκαλοειδές γκοσουπιόλη. Η ρίζα είναι πασαλώδης και αρχίζει να διακλαδίζεται όταν φτάσει σε μήκος τα 15 cm δίνοντας πολλές δευτερεύουσες ρίζες και φτάνοντας σε

βάθος τα 2 μέτρα (Γαλανοπούλου-Σενδουκά 2002). Τα φύλλα σχηματίζουν 3-5 λοβούς, το σχήμα των βρακτίων είναι τριγωνικό και τα καρύδια είναι ωσειδή ή επιμήκη. Οι ανθοφόροι οφθαλμοί που εξελίσσονται σε άνθη ονομάζονται χτένια. Στα πρώτα τους στάδια τα χτένια καλύπτονται από 3 βράκτια φύλλα. Συνήθως χρειάζονται 21 ημέρες από την εμφάνιση των χτενιών μέχρι την πλήρη άνθιση (Χριστίδης 1965). Ο καρπός είναι κάψα και ονομάζεται καρύδι. Από την ανθοφορία μεσολαβούν 45-65 ημέρες μέχρι την καρποφορία. Το σχήμα του καρυδιού διαφέρει μεταξύ των διαφόρων ποικιλιών (Χριστίδης 1965). Το μέρος με το κύριο εμπορικό ενδιαφέρον στο βαμβάκι είναι οι ίνες. Η κάθε ίνα σχηματίζεται από ένα επιδερμικό κύτταρο του σπέρματος το οποίο επιμηκύνεται. Τα επιμηκυσμένα κύτταρα, αναπτύσσονται σε δύο είδη ινών, τις νηματοποιήσιμες, που επιμηκύνονται για 20 περίπου ημέρες μετά την άνθιση και μετά την 16^η ημέρα παχαίνουν και το χνούδι (λίντα ή λίντερ) που επιμηκύνονται 2-5 ημέρες μετά την άνθιση και παραμένουν προσκολλημένες στο σπόρο (Γαλανοπούλου-Σενδουκά 2002). Οι ποικιλίες του είδους αυτού που κατατάσσονται στη βοτανική ποικιλία *Latifolium* και διακρίνονται για την προσαρμοστικότητα στις υποτροπικές περιοχές (Τόλης 1986). Το φυτό αναπτύσσεται καλύτερα σε θερμά και ξηρά κλίματα και είναι ευαίσθητο στον παγετό (Τόλης 1986). Έχει υψηλές απαιτήσεις σε εδαφική υγρασία που στην πλειοψηφία των περιπτώσεων παρέχεται στις καλλιέργειες με άρδευση (Gregory et al., 1999).



Εικόνα 1: Σπέρματα βαμβακιού *Gossypium hirsutum* L. USDA, NRCS. 2009



Εικόνες 2,3: (Ανθος και φύλλα βαμβακιού (αριστερά), ανοικτά καρύδια (δεξιά): πηγή www.Wikipedia.org)

1.1.3. Εμπορικές χρήσεις, η καλλιέργεια στην Ελλάδα και στον κόσμο

Το βαμβάκι είναι το κύριο φυτό που καλλιεργείται για παραγωγή ινών για την υφαντουργία παγκοσμίως, συγκομίζεται σύσπορο και μετά ακολουθεί διαχωρισμός των σπόρων από τις ίνες (εκκοκκισμός). Οι ίνες επεξεργάζονται περαιτέρω ανάλογα με το είδος του υφάσματος που θα παραχθεί και κατόπιν υφαίνονται. Τα σπέρματα του βαμβακιού είναι πλούσια σε λιπαρά οξέα τα οποία εξάγονται με σύνθλιψη και χρησιμοποιούνται για παραγωγή βρώσιμων ελαίων, μαργαρινών, σαπουνιού και πλαστικών (Gregory et al., 1999). Το μέρος των σπερμάτων που έχει υποστεί αφαίρεση ελαίου, χρησιμοποιούνται για παραγωγή ζωοτροφών (γνωστό ως βαμβακόπιτα), μιας και το προϊόν αυτό περιέχει έως 41% πρωτεΐνη (Smith 1999). Τα εκκοκκισμένα σπέρματα καλύπτονται από τριχίδια τα οποία μετά την απομάκρυνσή τους, έχουν ποικίλες χρήσεις όπως την παραγωγή στρωμάτων και παραγωγή κυτταρίνης για χημική χρήση ή για χρήση στη βιομηχανία των τροφίμων (Gregory et al., 1999).

Την καλλιεργητική περίοδο 2007-2008 καλλιεργήθηκαν στην Ελλάδα 3.150.000 στρέμματα και παρήχθησαν 288.000 τόνοι εκκοκκισμένου προϊόντος. Παγκοσμίως η παραγωγή εκκοκκισμένου βαμβακιού φαίνεται στον Πίνακα 1 (FAS/USDA 2008).

Χώρα	Παραγωγή Εκκοκκισμένου βαμβακιού 2007-2008 (εκατομμύρια τόνοι)
Κίνα	8,056
Ινδία	5,356
ΗΠΑ	4,182
Πακιστάν	1,938
Βραζιλία	1,602

Πίνακας 1: Παραγωγή εκκοκκισμένου βαμβακιού στις 5 μεγαλύτερες παραγωγούς χώρες (Πηγή: FAS/USDA 2008)

1.2. Η σύσταση και η βλάστηση των σπερμάτων του βαμβακιού

1.2.1. Η σύσταση των σπερμάτων

Η χημική σύσταση του σπερμάτων του βαμβακιού μετά την αφαίρεση της λίντας (λίντερ) έχει ως εξής:

Ξηρά ουσία	90%
Ολική πρωτεΐνη	25,6%
Λιπαρά	23,6%
Ασβέστιο	0,12%
Φώσφορος	0,50%
Κάλιο	1,18%
Μαγνήσιο	0,41%
Υδατάνθρακες που δεν ανήκουν στις ίνες	9,4%
Ολικά σάκχαρα	6,8%
Τέφρα	4,4%
Ίνες διαφόρων ειδών	13,8%
Ελεύθερη λυσίνη	3,2%
Ολική γκοσουπιόλη	0,99%

Πίνακας 2: χημική σύσταση του σπόρου του βαμβακιού μετά την αφαίρεση της λίντας (ή λίντερ) (Kohel and Lewis 1984).

1.2.2. Η βλάστηση των σπερμάτων

Ως βλαστικότητα των σπερμάτων ορίζεται η ικανότητα του εμβρύου να αναπτύσσεται σε σπορόφυτο μετά την παράκαμψη του λήθαργου που συνήθως ακολουθεί την ωρίμανσή του εμβρύου. Στο βαμβάκι, ως εμπειρικός δείκτης ποιότητας του σπόρου, χρησιμοποιείται συχνά η περιεκτικότητα του σε ελεύθερα λιπαρά οξέα. Όταν η συγκέντρωση των ελεύθερων λιπαρών οξέων είναι μεγαλύτερη από 8%, έχει δειχθεί ότι η βλαστικότητα των σπερμάτων είναι χαμηλή, ενώ για τη διάθεση του σπόρου για συστηματική καλλιέργεια, απαιτείται συγκέντρωση λιπαρών οξέων χαμηλότερη από 1% (Hoffrauir et al., 1950).

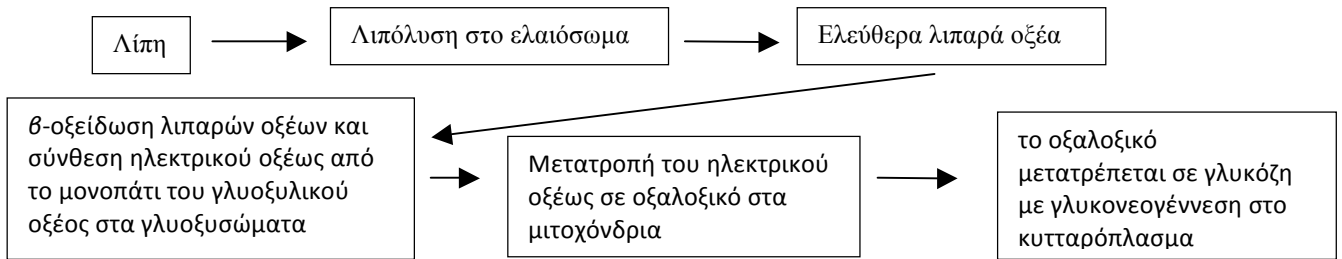
Πριν από τη βλάστηση, το ώριμο σπέρμα είναι αφυδατωμένο (περιέχει περίπου 11% υγρασία) και είναι μεταβολικά αδρανές. Η διαδικασία βλάστησης,

αρχίζει με ταχεία απορρόφηση νερού η οποία συνεχίζεται αργότερα με μικρότερη ταχύτητα. Η απορρόφηση νερού συνεχίζεται έως ότου το ποσοστό νερού στο σπέρμα φτάσει περίπου το 60% του αρχικού ξηρού βάρους. (Christiansen and Rowland 1981). Στους 30°C η ενυδάτωση μπορεί να γίνει σε 4-5 ώρες, αν και ο ρυθμός διαφέρει μεταξύ των ειδών του γένους *Gossypium* (Cole and Christiansen 1975). Το επόμενο στάδιο είναι η ανάπτυξη σε σπορόφυτο, που απαιτεί μεγάλα ποσά ενέργειας.

Τα σπέρματα των φυτών αποθηκεύουν άνθρακα για τη βλάστηση των φυταρίων και την εγκατάστασή τους. Οι αποθησαυριστικές μορφές του άνθρακα είναι λιπίδια, υδατάνθρακες κυρίως με τη μορφή του αμύλου, και πρωτεΐνες (Bewely and Black 1994). Τα γυμνόσπερμα όπως τα κωνοφόρα, τα κυκαδόφυτα και τα γκίνγκο, αποθηκεύουν λιπαρά οξέα με τη μορφή τριακυλογλυκερολών (TAG) στους μητρικούς ιστούς που περιβάλλουν το έμβρυο, ενώ τα αγγειόσπερμα μπορούν επίσης να τα αποθηκεύσουν είτε στο ενδοσπέρμιο είτε στο ίδιο το έμβρυο. Στο *Arabidopsis thaliana* και στα άλλα μέλη της οικογένειας *Brassicaceae*, ο άνθρακας αποθηκεύεται με τη μορφή του TAG κυρίως στους ιστούς του εμβρύου. Κατά τη διάρκεια της βλάστησης των σπερμάτων στα αγγειόσπερμα, το ενδοσπέρμιο έχει δύο γνωστούς ρόλους. Στα σπέρματα που έχουν ενδοσπέρμιο, όπως των δημητριακών και της ρετινολαδιάς, εκκρίνονται υδρολυτικά ένζυμα από την αλευρώνη στο ενδοσπέρμιο για να κινητοποιηθούν τα αποθέματα του αμύλου ή των λιπιδίων. Ο άνθρακας από τα αποθέματα του ενδοσπερμίου μεταφέρεται με τη μορφή σακχαρόζης στο έμβρυο για να υποστηρίξει την αύξηση του (Kornberg and Beevers 1957). Στα κύτταρα του πρωτεϊνοφόρου στρώματος του κριθαριού, το γιββερελινικό οξύ (GA) προάγει την έκφραση αυτών των γονιδίων, και την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων, περιλαμβανομένου και της β-αμυλάσης (GAMYB) (Gubler et al., 1995, 2002). Το αμψισικό οξύ ανταγωνίζεται τη δράση του GA, καταστέλλοντας την έκφραση του γονιδίου της αμυλάσης και ενεργεί μέσω μιας επαγόμενης από το ABA κινάσης των πρωτεϊνών (Gomez- Cadenas et al., 2001).

Πολλά φυτά, όπως το βαμβάκι, αποθηκεύουν στα σπέρματα τους λιπίδια, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και βιοσυνθετικών πρόδρομων ενώσεων κατά τη βλάστηση, πριν αναπτυχθούν οι φωτοσυνθετικοί μηχανισμοί. Στο βαμβάκι κατά μέσο όρο, το σπέρμα περιέχει 16,2% υδατάνθρακες, 23,6% λιπαρά και 25,6% πρωτεΐνη (Kohef and Lewis 1984). Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα για την

αποδόμηση των λιπαρών οξέων των αποθεμάτων, στο βαμβάκι, αποτυπώνονται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα1 : Μετατροπή των λιπαρών οξέων σε απλά σάκχαρα (Kohel and Lewis 1984)

Στα βλαστώντα σπέρματα, η ενεργός νεογλυκογένεση παρέχει γλυκόζη για τη σύνθεση σακχαρόζης και πολυσακχαριτών που προέρχονται από τις εξόζες. Όλα τα ένζυμα της έχουν δημιουργηθεί κατά τη μορφογένεση και παραμένουν στα μιτοχόνδρια και στα γλυοξυσώματα (Trelease et al., 1980). Στο αναπτυσσόμενο φυτό η σακχαρόζη προσφέρει μεγάλο μέρος της ενέργειας και των σκελετών άνθρακα που απαιτούνται για την αρχική αύξηση.

Δευτερευόντως εκκρίνονται υδρολυτικά ένζυμα που η λειτουργία τους είναι να αποδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα περιοχών του περιβλήματος των σπερμάτων, απομακρύνοντας καταυτόν τον τρόπο τα μηχανικά εμπόδια για την ανάδυση των ριζιδίων. Αυτά περιλαμβάνουν β-1,3-γλουκανάσες, ενδομανανάσες, πολυγαλακτουρονάσες και εξπανσίνες (Leubner-Metzger et al., 1995; Nonagaki and Morohashi 1996; Sitrit et al., 1999; Chen and Bradford 2000). Τα σπέρματα του βαμβακιού υπόκεινται σε χημική αφαίρεση των ινών (λιντάρισμα) για βελτίωση των χαρακτηριστικών τους (λ.χ. ευκολότερος χειρισμός από σπαρτικές μηχανές) αλλά και για τη βελτίωση της ενυδάτωσης του σπέρματος που διευκολύνει τη βλάστηση (Kohel and Lewis 1984). Οι Kerby et al., (1996), αναφέρουν ότι ο «μαύρος σπόρος», δηλαδή ο σπόρος στον οποίο έχουν αφαιρεθεί οι ίνες, έχει σημαντικά μεγαλύτερες πιθανότητες να δώσει φυτάριο από ότι ο σπόρος με ίνες. Αυτό οφείλεται στην αυξημένη επαφή με το έδαφος που έχει το επεξεργασμένο σπέρμα που έχει ως συνέπεια, την αποτελεσματικότερη ενυδάτωση του. Στο *Arabidopsis thaliana*, στον καπνό και στην τομάτα έχει δειχθεί ότι τα κυτταρικά τοιχώματα του περιβλήματος του σπέρματος και του ενδοσπερμίου συνιστούν ένα σημαντικό συστατικό του ληθάργου των σπερμάτων και ότι ρύθμιση της αποδόμησης του περιβλήματος του σπέρματος είναι ένα

σημαντικό στοιχείο από μόνο του στη ρύθμιση της βλάστησης (Debeaujon et al., 2000; Leubner- Metzger and Meins 2000; Downie et al., 2003).

Το *Arabidopsis thaliana* έχει συχνά χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο φυτό για τη διευκρίνιση της βιοχημείας και της ρύθμισης της κινητοποίησης των λιπιδίων κατά τη διάρκεια της βλάστησης. Η κινητοποίηση των λιπιδίων λαμβάνει μέρος στα γλυοξυσώματα και απαιτεί έναν μεταφορέα λιπαρών οξέων, δύο ισόμορφα γονίδια της ακυλο-CoA συνθάσης, και τη διαδικασία της υπεροξειδωμικής β-οξειδωσης (Hayashi et al., 1998; Germain et al., 2001; Zolman et al., 2001; Footitt et al., 2002; Fulda et al., 2004). Ένα ισόμορφο του ενζύμου κλειδιού β-οξειδωσης, η 3-κετοακυλο-CoA θειολάση, υπερισχύει κατά τη διάρκεια της βλάστησης. Μεταλλαγμένα φυτά ως προς την πρωτεΐνη αυτή έχουν αναδείξει το ρόλο της κινητοποίησης των λιπιδίων στη βλάστηση. Το γονίδιο Peroxisome Defective1 (PED1)/3-κετοακυλ-CoA θειολάση2 είναι απαραίτητο για την εγκατάσταση του φυταρίου αλλά όχι για την ανάπτυξη του ριζιδίου και τη βλάστηση (Hayashi et al., 1998; Germain et al., 2001). Χαρακτηριστικά η εγκατάσταση των φυταρίων στη μετάλλαξη *red1* μπορεί να αποκατασταθεί με την παροχή μιας εναλλακτικής πηγής άνθρακα.

Σε αντίθεση, στα ελλιπή φυτάρια του *Arabidopsis thaliana* στο ένζυμο του γλυοξυλικού κύκλου ισοκιτρικής λυάσης (ICL) εγκαθίστανται επαρκώς στο φώς αλλά παρουσιάζουν μειωμένη συγκριτικά με το μάρτυρα επιμήκυνση του υποκοτυλίου στο σκοτάδι κατά τρόπο που εξαρτάται από τη σακχαρόζη (Eastmond et al., 2000). Ένας παρόμοιος φαινότυπος έχει παρατηρηθεί στα φυτά στα οποία η έκφραση του γονιδίου της καρβοξυκινάσης του φωσφοροενόλο πυροσταφυλικού (PCK1) που έχει υποστεί σίγαση με το αντινοσηματικό RNA (Rylott et al., 2003). Η διαφορά μεταξύ του *Arabidopsis thaliana* και των ελαιούχων σπερμάτων όπως είναι η ρετσινολαδιά έχει οδηγήσει σε αμφιβολίες σχετικά με το ρόλο του γλυοξυλικού κύκλου και της γλυκονεογένεσης στα εμβρυακά κύτταρα ελαιούχων σπερμάτων στα οποία απαντώνται εναλλακτικές πλην της β-οξειδωσης, οδοί της σύνθεσης του ακετυλο-CoA (Smith 2002).

Η αύξηση των φυτών και η αποθήκευση οργανικών ουσιών υψηλής ενέργειας στα όργανα των φυτών απαιτεί συνεχή ροή θρεπτικών συστατικών. Στα περισσότερα φυτικά είδη, η σακχαρόζη είναι η κύρια μεταφερόμενη οργανική ουσία. Η σακχαρόζη συντίθεται κυρίως στο μεσόφυλλο κατά τη φωτοσύνθεση, και μεταφέρεται στα κέντρα

κατανάλωσης μέσω του ηθμού όπου χρησιμοποιούνται στη διαδικασία δημιουργίας βασικών δομικών και ενεργειακών συστατικών της κυτταρικής αύξησης.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της βλαστητικής αύξησης η γρήγορα αυξανόμενη ζώνη της ρίζας είναι ο βασικός καταναλωτής των φωτοσυνθετικών προϊόντων. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η αποφόρτιση του ηθμού (phloem unloading) στη ρίζα εκδηλώνεται μόνο στις ζώνες εκείνες στις οποίες απαιτούνται ουσίες για κατανάλωση. Αυτό το συμπέρασμα βασίζεται σε ανατομικές μελέτες που δείχνουν ότι τα δομικά συστατικά του ώριμου ηθμού εκτείνονται κατά μήκος ολόκληρης της ζώνης επιμήκυνσης (Esau and Gill 1973; Demchenko 1989; Dolan 1993).

1.2.3. Επίδραση της γήρανσης στις φυσιολογικές και βιοχημικές διεργασίες στα σπέρματα.

Η γήρανση ενός σπέρματος ορίζεται ως η μείωση της βλαστικότητας παράλληλα με την μείωση της ευρωστίας των φυταρίων από σπέρματα που κατάφεραν να βλαστήσουν. Κατά τη διαδικασία της γήρανσης τα σπέρματα χάνουν την ευρωστία τους, τη βλαστικότητα και τέλος τη ζωτικότητα τους (Trawatha et al., 1995). Ο σπόρος του βαμβακιού είναι από τους πιο ευαίσθητους μεταξύ των καλλιεργούμενων φυτικών ειδών και χάνει μεγάλο μέρος της ευρωστίας και της ζωτικότητας του μετά από έναν μόλις χρόνο αποθήκευσης. Αυτό σύμφωνα με τον Tappel (1973) οφείλεται στο μεγάλο ποσοστό λιπαρών οξέων που περιέχει. Η αλλοίωση των μεμβρανών θεωρείται ότι είναι από τους κύριους λόγους της μείωσης της βλαστικότητας των σπερμάτων (Tappel 1973). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, την αδυναμία διατήρησης από τα κύτταρα της φυσιολογικής τους λειτουργίας. Ο βασικότερος λόγος της αλλοίωσης των μεμβρανών είναι η αύξηση των ελεύθερων λιπαρών οξέων καθώς και η αυξημένη παραγωγή ελεύθερων ριζών από την υπεροξειδάση των λιπαρών οξέων (Grilli et al., 1995).

Ο ρυθμός απώλειας της ζωτικότητας των σπερμάτων, επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία και η περιεκτικότητα της ατμόσφαιρας σε O_2/CO_2 (Basra et al., 2000). Ο Harrington (1972) πρότεινε ότι κάτω από κανονικές συνθήκες αποθήκευσης (25°C, 50-70% σχετική υγρασία), για κάθε 1% μείωση της υγρασίας του σπόρου και για κάθε 5°C μείωση της

θερμοκρασίας, η διάρκεια ζωής των σπερμάτων διπλασιάζεται. Η επιταχυνόμενη γήρανση με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες σε διάφορα φυτά (Parish and Leopold 1978; Baily et al., 1996) και στο βαμβάκι (Rathinavel and Dharmalingam 2001). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται και από εταιρίες παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού για την μελέτη της ζωτικότητας και βλαστικότητας των προϊόντων που παράγουν (Rajjou and Debeaujon 2008).

1.3.1. Ισοκιτρική αφυδρογονάση

Τα μιτοχόνδρια είναι τα οργανίδια στα οποία γίνεται ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων και η μεταφορά των H^+ και των ηλεκτρονίων προς το οξυγόνο για την παραγωγή ATP. Επίσης και μέρος μεγάλου αριθμού μεταβολικών μονοπατιών πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια όπως η φωτοαναπνοή, οι πρόδρομες ουσίες για τη γλυκονεογένεση, και της σύνθεσης μερικών αμινοξέων και το μονοπάτι του γ-αμινοβουτυρικού. Η πρώτη αποκαρβοξυλίωση στον κύκλο του Krebs, από ισοκιτρικό σε α-κετογλουταρικό, πραγματοποιείται από το ένζυμο NAD^+ ισοκιτρική αφυδρογονάση που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Lemaitre and Hodges 2006).

1.3.2. Οι τύποι της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης και ο ρόλος τους

Με βάση το συνένζυμο τους οι φυτικές ισοκιτρικές αφυδρογονάσες κατατάσσονται σε δύο τύπους. Ο ένας τύπος λειτουργεί με συνένζυμο το $NADP^+$ και ο άλλος το NAD^+ (Lancien et al., 1998). Αμφότεροι οι τύποι της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης καταλύουν την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του ισοκιτρικού οξέος με προϊόν το α-κετογλουταρικό, CO_2 και ένα ανηγμένο συνένζυμο και απαιτούν την παρουσία ιόντων Mg^{+2} ή Mn^{+2} (Martinez –Riva and Vega 1998).



1.3.2.1. Η $NADP^+$ εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH)

Η $NADP^+$ εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση (ICDH) (EC 1.1.1.42) απαντά στα μιτοχόνδρια και είναι ομοδιμερές, ενώ ισομορφές της βρίσκονται στα πλαστίδια, στα υπεροξυσώματα και στο κυτόπλασμα. Οι μεταβολικοί ρόλοι των ισομορφών της ICDH δεν έχουν ακόμα πλήρως καθοριστεί (Lancien et al., 1998), αν και ιδίως η πλαστιδική μορφή είναι πιθανόν να παίζει σημαντικό ρόλο στην σύνθεση αμινοξέων (Chen and Gadal 1990). Επίσης λόγω της υψηλής δραστηριότητας της κυταροπλασματικής ICDH, πιθανολογείται από κάποιους

ερευνητές ότι εκεί πραγματοποιείται ο κύριος όγκος της αφομοίωσης αζώτου μέσω της δράσης του ενζύμου αυτού (Galvez et al., 1999).

1.3.2.2. Η NAD⁺ εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση (IDH)

Η NAD⁺ εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση (IDH) (EC 1.1.1.41) απαντάται αποκλειστικά στα μιτοχόνδρια (McIntosh 1997; Lemaitre et al., 2007). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το ένζυμο καταλύει την αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης του ισοκιτρικού προς α-κετογλουταρικό και NADH, ενώ η αντίδραση αυτή δεν είναι αμφίδρομη μιας και το ένζυμο δεν δρα αμφίδρομα (Igamberdiev and Gardestrom 2003). Το NADH που παράγεται στα μιτοχόνδρια με τη δράση του ενζύμου χρησιμοποιείται για την παραγωγή ATP, ενώ το α-κετογλουταρικό, είτε μετατρέπεται σε ηλεκτρικό (μέσω του κύκλου του Krebs) είτε εξάγεται στο κυτόπλασμα και σε άλλα οργανίδια του κυττάρου. (Hodges et al., 2003). Μάλιστα το ένζυμο αυτό πιστεύεται ότι παίζει καθοριστικό ρυθμιστικό ρόλο στον κύκλο των τρικαρβονικών οξέων λόγω της μειωμένης δραστηριότητας του σε σχέση με τα άλλα ένζυμα του κύκλου και τη ρύθμιση του από μεταβολίτες κλειδιά όπως το NADH, AMP και ATP (Nichols et al., 1994; Zhao and McAlister-Henn 1997; Taylor et al., 2008). Επίσης λόγω της «θέσης» του ενζύμου στον κύκλο των τρικαρβονικών οξέων (είναι η πρώτη αποκαρβοξυλάση), η IDH έχει έναν ακόμα κομβικό ρυθμιστικό ρόλο. Σε συνθήκες που ευνοούν τη βιοσύνθεση, εις βάρος της παραγωγής ενέργειας (π.χ. κατά την βλάστηση των σπερμάτων), η δραστηριότητα του ενζύμου είναι μειωμένη (Behal and Oliver 1998; Hill et al., 1992; Millhouse et al., 1983).

Η IDH εκτός από τον βασικό της ρόλο ως ένζυμο του κύκλου του Krebs έχει προταθεί ότι συμμετέχει και στη σύνθεση γλουταμινικού παρέχοντας ανθρακικούς σκελετούς. Το γεγονός φαίνεται να τεκμηριώνεται με τη μελέτη της έκφρασης της IDH και γονιδίων που έχουν σχέση με την αφομοίωση αζώτου σε φυτά καπνού που είχαν υποστεί τεχνητή έλλειψη του στοιχείου αυτού (Lancien et al., 1999).

Σε άλλο πείραμα, προσθήκη αζώτου με τη μορφή NH₄⁺ σε ρίζες ρυζιού, αύξησε την IDH. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη στασιμότητα που

παρατηρήθηκε στα επίπεδα της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού κάτω από τις ίδιες συνθήκες, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η IDH είναι καλός υποψήφιος για συμμετοχή στην διεργασία παροχής ανθρακικών αλυσίδων με τη μορφή του ακετογλουταρικού στο σύστημα αφομοίωσης NH_4^+ / NADH-GOGAT (NADH-γλουταμινικής συνθετάσης) (Abiko et al., 2005). Εναλλακτικά η IDH πιθανόν να συνεισφέρει στην δραστικότητα του συστήματος NADH-GOGAT μέσω της παραγωγής NADH που παράγεται από τον κύκλο του Krebs. Είναι επίσης πιθανόν η επαγωγή της IDH να συνδέεται με τη μιτοχονδριακή οξειδωτική φωσφορυλίωση, οδηγώντας σε αυξημένη παραγωγή ATP (Ishiyama et al., 2004).

1.3.3.3. Χαρακτηριστικά της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης

Η NAD^+ εξαρτώμενη ισοκιτρική αφυδρογονάση στα φυτά είναι ετεροδιμερές ένζυμο με μία υπομονάδα ρυθμιστική και μία καταλυτική (Lancien et al., 1998). Στο μπιζέλι, βρέθηκε ότι το μέγεθος της κάθε υπομονάδας είναι περίπου 47 kD (McIntosh and Oliver 1992). Στο ένζυμο από το ρύζι έχουν χαρακτηριστεί οι θέσεις πρόσδεσης του NAD και του συμπλόκου Mg-ισοκιτρικού που συμφωνούν με το πρότυπο που έχει προταθεί από τους (Hurley et al., 1991). Οι χαρακτηριστικές αυτές δομές απουσιάζουν από τις ρυθμιστικές αλυσίδες του ενζύμου (Abiko et al., 2005). Το άριστο pH δράσης του ενζύμου είναι 7,5 (McIntosh 1997).

Στο μπιζέλι έχουν ανιχνευτεί δύο ξεχωριστές ισομορφές NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, με διαφορετικές ιδιότητες (υδροφοβικότητα, φορτίο, ισχύ πρόσδεσης στην μεμβράνη, ισχύ πρόσδεσης στο Matrex Gel Blue A). Η παρουσία αυτών των δύο ισομορφών προέρχεται είτε από διαφορετικά γονίδια είτε πρόκειται για το ίδιο ένζυμο του οποίου οι ιδιότητες εξαρτώνται από το αν βρίσκεται ή όχι προσδεμένο στις μεμβράνες. Παρόλα αυτά οι δύο ισομορφές φαίνεται να έχουν τις ίδιες ενζυμικές ιδιότητες (McIntosh 1997). Σε νεότερες έρευνες έχει βρεθεί ότι στο *Arabidopsis thaliana* ανιχνεύονται πέντε γονίδια που κωδικοποιούν την IDH (Lin et al., 2004) ενώ στον καπνό και στο ρύζι μόνο τρία, δύο από τα γονίδια αυτά κωδικοποιούν δύο μορφές ρυθμιστικής υπομονάδας ενώ το τρίτο κωδικοποιεί την καταλυτική υπομονάδα που έπειτα συνδυάζεται με μία από

τις ρυθμιστικές υπομονάδες. (Lancien et al., 1999; Abiko et al., 2005). Το ένζυμο παρουσιάζει κανονική κινητική κατά Michaelis-Menten όσον αφορά το NAD^+ . Το NADH είναι ανταγωνιστικός παρεμποδιστής ενώ το NADPH είναι μη ανταγωνιστικός παρεμποδιστής (McIntosh 1997). Παρόλα αυτά υπάρχουν ενδείξεις ότι αν το ένζυμο αφεθεί να «ωριμάσει» και πραγματοποιηθεί αμέσως η δοκιμή, παρουσιάζει διαφορετική κινητική, πιθανώς λόγω αναδιάταξης των υπομονάδων, ο φυσιολογικός ρόλος αυτού του φαινομένου είναι άγνωστος (McIntosh and Oliver 1992).

Το ένζυμο παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα όταν υπάρχει επαρκής παροχή ισοκιτρικού, στις συνθήκες σκότους αυτός είναι ο κανόνας, οπότε μπορεί να προταθεί ότι η NAD^+ IDH έχει ρόλο της διατήρησης της λειτουργίας του κύκλου των τρικαρβονικών οξέων όσο η παροχή ισοκιτρικού είναι επαρκής (Igamberdiev and Gardestrom 2003).

Η δραστικότητα NAD^+ IDH στα μιτοχόνδρια του μπιζελιού είναι περίπου τέσσερις φορές μεγαλύτερη από αυτή της NADP^+ IDH που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια (Igamberdiev and Gardestrom 2003). Επίσης, στους κονδύλους της πατάτας, δραστικότητα του ενζύμου ήταν ελαφρώς μεγαλύτερη (McIntosh and Oliver 1992). Η δραστικότητα του όμως, δεν επηρεάστηκε από την παρουσία φωτός στο μπιζέλι και στο κριθάρι.

Το ένζυμο παρουσιάζει πολύ μεγαλύτερη δραστικότητα (1,10 έναντι 0,02 mg πρωτεΐνης/min) στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου από ότι στην εξωτερική (Tezuka and Laties 1983). Η δραστικότητα του ενζύμου προέρχεται από την μήτρα των μιτοχονδρίων σε ποσοστό 50-65% ενώ η υπόλοιπη δραστικότητα προέρχεται από τις μεμβράνες των οργανιδίων (McIntosh 1997).

Σύμφωνα με τους Falk et al., (1998), κατά τη βλάστηση των σπερμάτων, η NAD^+ IDH ρυθμίζεται από μεταμεταφραστικούς μηχανισμούς κατά τη διάρκεια της πρώιμης ανάπτυξης του φυταρίου, αλλά μετά τη δεύτερη ή τρίτη ημέρα της ανάπτυξης, ρυθμίζεται από το επίπεδο του mRNA.

Ο εντοπισμός του ενζύμου σε ρίζες ρυζιού κάτω από συνθήκες τεχνητής έλλειψης NH_4^+ , η IDH ανιχνεύτηκε στο ακραίο μερίστωμα και στον κεντρικό κύλινδρο (εικόνα 4). Εικοσιτέσσερις ώρες μετά από την προσθήκη NH_4^+ , η

δραστικότητα του ενζύμου αυξήθηκε σημαντικά στα κύτταρα της ενδοδερμίδας και της επιδερμίδας (Abiko et al., 2005).



Εικόνα 4: Ανοσοεντοπισμός IDH σε ρίζες ρυζιού (διακρίνεται το ακραίο τμήμα) (Abiko et al., 2005). Co=φλοιός, cc=κεντρικός κύλινδρος, ep=επιδερμίδα, pr=παρέγχυμα (Abiko et al., 2005).

1.3.3. Η ισοκιτρική αφυδρογονάση σε συνθήκες καταπόνησης

Η παρατεταμένη αποθήκευση σπερμάτων των ειδών *Coinxya rupestris*, *Iberis perctinata* και *Vella pseudocytisus* για 29, 24, και 26 χρόνια αντίστοιχα στους 5°C και 8% υγρασία, οδήγησε αφενός σε μηδενικά ποσοστά βλάστησης και για τα τρία είδη, αφετέρου σε αποδόμηση των ηλεκτροφορητικών ζωνών για όλα τα ένζυμα που μελετήθηκαν, μεταξύ των οποίων και δυο αλληλόμορφοι της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα ένζυμα είχαν υποστεί αλλοίωση και παρουσίασαν επίσης μειωμένη ενζυμική δραστικότητα της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης σε σχέση με σπέρματα που παρελήφθησαν από φυτά που καλλιεργήθηκαν την τρέχουσα περίοδο (Maselli et al., 1999).

Η επίδραση αυξημένης αλατότητας (με επίδραση NaCl) οδήγησε φυτά καπνού σε αύξηση της δραστικότητας και των δύο τύπων της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (NAD^+ και $NADP^+$). Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με την αύξηση της δραστικότητας της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού (GDH), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το σύστημα σε συνθήκες καταπόνησης λειτουργεί ως «ασπίδα»

απέναντι στα αμμωνιακά ιόντα που παράγονται από πρωτεόλυση (Lutts et al., 1999; SkorELITIS et al., 2006). Οι ισοκιτρικές αφυδρογονάσεις παρέχουν στο σύστημα ανθρακικούς σκελετούς μέσω του α-κετογλουταρικού (SkorELITIS et al., 2006). Παρόμοια ευρήματα αναφέρονται και σε εργασία στο ρύζι με απ' ευθείας επίδραση αμμωνιακών ιόντων (Abiko et al., 2005).

Σε συνθήκες τροφοπενίας σιδήρου σε ρίζες λούπινου, η δραστικότητα της NAD^+ IDH, υπέστη σημαντική μείωση. Η δραστικότητα του ενζύμου ήταν μεγαλύτερη στις ρίζες δεύτερης τάξης και μικρότερη στις ρίζες τρίτης τάξης. Στις ρίζες βλαστογενείς ρίζες η δραστικότητα ήταν ακόμη μεγαλύτερη. Η μείωση αυτή αποδίδεται κατά πάσα πιθανότητα σε μεταμεταφραστική ρύθμιση λόγω της επίδρασης των ιόντων στο ένζυμο (Oexle et al., 1999; McCluskey et al., 2004).

Στα ακρορίζια εμβρυακών ριζών του λούπινου που αναπτύχθηκαν σε θρεπτικό διάλυμα με ή χωρίς γλυκόζη, βρέθηκε μείωση της δραστικότητας της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης κατά 8% σε συνθήκες έλλειψης της γλυκόζης. Η μείωση αυτή ήταν μικρότερη από την μείωση της δραστικότητας της PEP καρβοξυλάσης (κυτοπλασματικό ένζυμο). Ως συμπέρασμα οι συγγραφείς αναφέρουν ότι τα μιτοχονδριακά ένζυμα είναι λιγότερο ευαίσθητα στην έλλειψη υδατανθράκων από τα ένζυμα του κυτοπλάσματος (Morkunas et al., 2002)

Σε συνθήκες υποξίας, έχει βρεθεί ότι η δραστικότητα του ενζύμου μειώνεται σημαντικά παράλληλα με μια συνολική μείωση στον κύκλο των τρικαρβονικών οξέων. Η μείωση αυτή αποδίδεται κυρίως στο μειωμένο οξειδωτικό δυναμικό του NADH και αντιμετωπίζεται από τα κύτταρα με εξαγωγή κιτρικού οξέως στο κυτόπλασμα και παραγωγή εκεί 2-οξογλουταρικού οξέως (Igamberdiev and Hill 2009). Δεν βρέθηκαν στοιχεία στην βιβλιογραφία για την επίδραση υψηλών και χαμηλών θερμοκρασιών στην δραστικότητα του ενζύμου.

Δεδομένα της επίδρασης υψηλών θερμοκρασιών στη δραστικότητα του ενζύμου στα φυτά δεν βρέθηκαν.

1.4.1. Το άμυλο

Το άμυλο αποτελεί την κύρια αποθησαυριστική μορφή του άνθρακα στα περισσότερα φυτικά είδη και διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, στο παροδικό και στο μόνιμο. Το παροδικό συντίθεται κατά κύριο λόγο στα φωτοσυνθετικά ενεργά φύλλα και θεωρείται ότι υδρολύεται και μετακινείται από αυτά κυρίως κατά τη διάρκεια της νύχτας για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των ετερότροφων ιστών. Το μόνιμο άμυλο απαντάται στους ετερότροφους ιστούς ή όργανα όπως στις ρίζες, τους κονδύλους, τους καρπούς, στα έμβρυα ή στο ενδοσπέρμιο (Neuhaus and Emes 2000). Τα δύο αυτά είδη αμύλου στο φυτικό κύτταρο διαφοροποιούνται με βάση το μέγεθος το σχήμα και τη δομή των αμυλοκόκκων. Το μόνιμο άμυλο αποτελείται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη ενώ το παροδικό μόνο από αμυλοπηκτίνη. Το άμυλο συντίθεται στα πλαστίδια, και ειδικότερα στους αμυλοπλάστες και στους χλωροπλάστες (Smith and Denyer 1992). Οι δύο τύποι πολυσακχαριτών, η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη, είναι οργανωμένες σε μια τρισδιάστατη ημι-κρυσταλλική δομή, τον αμυλόκοκκο.

Η αμυλόζη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης μοριακού βάρους 105-106kD. Ανάλογα με το είδος του φυτού αποτελείται από 100 μέχρι αρκετές χιλιάδες κατάλοιπα γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με α -(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς οι οποίοι δημιουργούν την ελικοειδή μορφή του πολυμερούς. Σε κάθε βήμα της έλικας απαντώνται έξι κατάλοιπα γλυκόζης. Αποτελεί το 20-30% του ολικού αμύλου, ποσοστό εξαρτάται από το είδος του φυτού, την ποικιλία, το φυτικό όργανο, την ηλικία ανάπτυξης ενός οργάνου αλλά και τις συνθήκες ανάπτυξης των φυτών (Martin and Smith 1995). Σε διάλυμα ιωδίου (KI) η αμυλόζη χρωματίζεται με βαθύ κυανό χρώμα που οφείλεται στο σχηματισμό ενώσεων εγκλεισμού του ιόντος ιωδίου στην κοιλότητα του ελικομορφου μορίου της αμυλόζης (Stryer 1988).

Η αμυλοπηκτίνη είναι ένας διακλαδιζόμενος πολυσακχαρίτης, μοριακού βάρους μεγαλύτερου των 300 kD, και αποτελεί το 75-80% του αμύλου. Αποτελείται από κατάλοιπα γλυκόζης τα οποία συνδέονται με α -(1,4) και α -(1,6) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Τα σημεία διακλάδωσης βρίσκονται κάθε 20-30 μόρια γλυκόζης. Οι διακλαδώσεις αυτές από μόνες τους σχηματίζουν μια οργανωμένη δομή. Οι δομές

αυτές ενώνονται στη συνέχεια με α-(1,6) δεσμούς με εσωτερικές διακλαδώσεις (β αλυσίδες) που μπορεί να διακλαδίζονται σε ένα ή περισσότερα σημεία. Τέλος υπάρχει μια μοναδική αλυσίδα για κάθε μόριο αμυλοπηκτίνης που φέρει ένα ελεύθερο άκρο άνθρακα (Martin and Smith 1995). Τα σημεία διακλάδωσης σχηματίζουν κάποιες δομές που λέγονται συσσωματώματα (clusters) και αποτελούνται από 15-20 μονάδες γλυκόζης τα οποία τοποθετούνται σε ομάδες με μήκος 9nm κατά μήκος του άξονα του μορίου. Αλυσίδες των 45 μονάδων γλυκόζης χωρίζονται σε δύο συσσωματώματα ενώ αντίθετα αλυσίδες των 70 μονάδων γλυκόζης χωρίζονται σε τρία συσσωματώματα (Smith 2003). Ένα τυπικό μόριο αμυλοπηκτίνης έχει μήκος 200-400nm και πλάτος 15nm (Martin and Smith 1995). Μικρές ποσότητες φωσφορικών ομάδων ενώνονται εστερικά με το υδροξύλιο του άνθρακα 6. Οι φωσφορικές ομάδες σχετίζονται τόσο με τη σύνθεση όσο και με την αποδόμηση του αμύλου (Stryer 1988).

Η συγκέντρωση του αμύλου στα φύλλα εξαρτάται από τις περιβαλλοντικές συνθήκες με διάφορους τρόπους. Το άμυλο των χλωροπλαστών υδρολύεται σχεδόν γραμμικά και ο ρυθμός της αποδόμησής του είναι μεγαλύτερος σε ημέρες μεγάλης διάρκειας από αυτόν σε ημέρες μικρής διάρκειας (Gibson et al., 2004; Lu et al., 2004, 2005). Η υδρόλυση του αμύλου ακολουθεί ενδογενείς ρυθμούς. Έχει επίσης αναφερθεί ότι η έκφραση των ενζύμων που κινητοποιούν το άμυλο ελέγχονται από κρκαδικούς ρυθμούς (Harmer et al., 2000; Smith et al., 2004; Lu et al., 2005). Για παράδειγμα, η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί μια β-αμυλάση του *Arabidopsis thaliana* (*BAM3*, At4g17090) παρουσιάζει ημερήσια διακύμανση και είναι ευαίσθητη στις εναλλαγές της φωτοπεριόδου. Επίσης, υπό συνθήκες συνεχούς φωτισμού, τα επίπεδα της μαλτόζης κυμαίνονται με μια περίοδο περίπου 24h (Lu et al., 2005). Η φυσιολογική σημασία αυτού του φαινομένου είναι ερευνάται ακόμη.

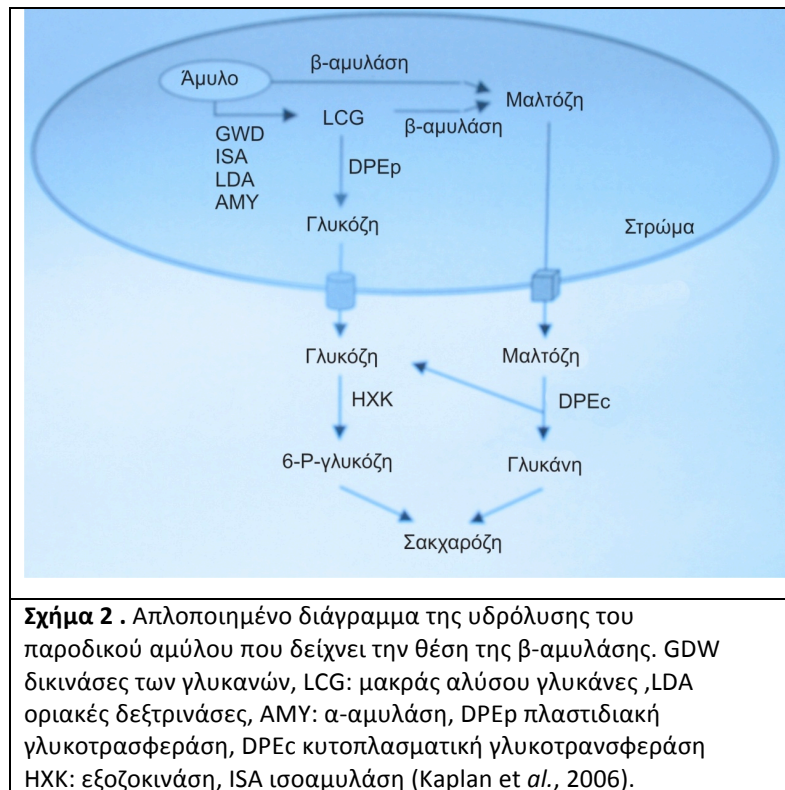
1.4.2. Η υδρόλυση του αμύλου

Η υδρόλυση του αμύλου πραγματοποιείται σε όλους τους φυτικούς ιστούς είτε πρόκειται για φωτοσυνθετικούς είτε για ετερότροφους ιστούς. Στους

φωτοσυνθετικούς ιστούς, η υδρόλυση του αμύλου πραγματοποιείται παράλληλα με τη βιοσύνθεσή του. Φυσιολογικά το άμυλο δημιουργείται την ημέρα και υδρολύεται κατά τη διάρκεια της νύχτας παρέχοντας τον πλεονάζοντα φωτοσυνθετικά καθηλωμένο άνθρακα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Κατά τη διάρκεια της νύχτας, το μεγαλύτερο μέρος του αμύλου των χλωροπλαστών αποδομείται γρήγορα και μεταφέρεται κυρίως ως σακχαρόζη στους ιστούς καταναλωτές για την παραγωγή ενέργειας και αλυσίδων άνθρακα. Κατά τη διαδικασία αυτή παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας των υδρολυτικών ενζύμων (Lea and Leegood 1997).

Σε υγιή, μη καταπονημένα φυτά η υδρόλυση του αμύλου συντονίζεται με τη σύνθεση του αμύλου ώστε ο ρυθμός της υδρόλυσης του αμύλου να είναι συνεχής κατά τη διάρκεια της νύχτας και αρκετός ώστε να καταναλώσει όλο σχεδόν το άμυλο που έχει συσσωρευτεί την προηγούμενη ημέρα. Ο ρυθμός της εξαγωγής του άνθρακα από τα φύλλα τη νύχτα μπορεί να παραμένει σταθερός και κατά τη διάρκεια της ημέρας ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης του παροδικού αμύλου (Hendrix and Grange 1991). Ο ρυθμός της εξαγωγής αυτής είναι ανάλογος της συγκέντρωσης του αμύλου των φύλλων στο τέλος της ημέρας και επίσης εξαρτάται γραμμικά από την αναπνοή των φύλλων τη νύχτα (Hendrix and Grange 1991).

Στους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς όμως, όπως τα σπέρματα και οι κόνδυλοι η συγκέντρωση του αμύλου είναι περισσότερο σταθερή. Συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια μιας περιόδου εβδομάδων ή και μηνών όπου παράλληλα τα ένζυμα αποδόμησης θεωρούνται ότι βρίσκονται σε μη ενεργή κατάσταση. Η δραστηριότητα αυτών των υδρολυτικών ενζύμων του αμύλου αυξάνεται κατά την περίοδο της βλάστησης ή της ανάπτυξης (Lea and Leegood 1997).



1.4.3. Η υδρόλυση των επιφανειακών γλυκανών

Το πρώτο στάδιο της αποδόμησης του αμύλου θα πρέπει να καταλύεται από ένζυμα που είναι ικανά να μεταβολίσουν τα πολυμερή στη επιφάνεια του ημικρυσταλλικού αμυλόκοκκου. Αν και υπάρχουν μερικοί τύποι ενζύμων που είναι ικανοί να απελευθερώσουν γλυκάνες από απομονωμένους αμυλόκοκκους *in vitro*, πειραματικά δεδομένα (Scheidig et al., 2002, Steup et al., 1983, Sun et al., 1995), υποδεικνύουν ότι το μόνο ένζυμο που δρα με αυτό τον τρόπο *in planta* είναι η ενδοαμυλάση α-αμυλάση. Στο ενδοσπέρμιο των βλαστανόντων καρυόψευων των σιτηρών, οι α-αμυλάσες υδρολύουν τους α-1,4 δεσμούς εντός των πολυμερών που βρίσκονται εκτεθειμένα στην επιφάνεια ή στις ρωγμές των αμυλοκόκκων. Στο *Arabidopsis thaliana* έχουν εντοπιστεί τρεις α-αμυλάσες. Από αυτές η AMY3 εντοπίζεται στους χλωροπλάστες. Θεωρείται λοιπόν εύλογο να υποτεθεί ότι η AMY3 καταλύει την υδρόλυση του αμύλου στην επιφάνεια του αμυλόκοκκου κατά τη διάρκεια της νύχτας. Όμως, κανένας από αυτούς τους ισότυπους της α-αμυλάσης δεν είναι απαραίτητος για την αποδόμηση του αμύλου αφού μεταλλάγματα που δεν έχουν το γονίδιο AMY1 (At4g25000) ή το AMY2 (At1g76130)

ή το AMY3 παρουσιάζουν κανονικούς ρυθμούς αποδόμησης του αμύλου τη νύχτα. Τριπλό μετάλλαγμα δηλαδή φυτά ελλειμματικά και στις τρεις α-αμυλάσες παρουσιάζουν επίσης κανονικούς ρυθμούς αποδόμησης του αμύλου (Yu et al., 2005). Φαίνεται λοιπόν, ότι η αρχική υδρόλυση του αμυλόκοκκου δεν απαιτεί μια ενδοαμυλάση ή ότι το *Arabidopsis thaliana* έχει μια άλλη ενδοαμυλάση που δεν αναγνωρίζεται από την αμινοξική της ακολουθία ως α-αμυλάση, εφόσον το μετάλλαγμα δεν φέρει αλλαγές και στη σύνθεση ή και στη δομή του αμύλου (Yu et al., 2005).

Οποιοσδήποτε και να είναι ο μηχανισμός της απελευθέρωσης διαλυτών γλυκανών από τους αμυλόκοκκους, είναι ξεκάθαρο ότι αυτή η διαδικασία απαιτεί ένα άλλο ένζυμο που ονομάστηκε δικινάση της γλυκάνης (GWD, glucan water dikinase). Μελέτες του ενζύμου αυτού στην πατάτα έδειξαν ότι η GWD μεταφέρει φωσφορικά από το ATP στη θέση 6 ή τη θέση 3 των γλυκοζιτικών καταλοίπων της αμυλοπηκτίνης (Mikkelsen et al., 2004; Ritte et al., 2002). Αυτή η φωσφορυλίωση γίνεται πιθανόν και κατά τη διάρκεια της σύνθεσης και κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του αμύλου *in vivo* (Nielsen et al., 1994; Ritte et al., 2004; Wischmann et al., 1999). Αν και τα φωσφορικά απαντώνται με χαμηλή συχνότητα στο άμυλο του φύλλου του *Arabidopsis thaliana* (περίπου 1 στα 2000 κατάλοιπα φωσφορυλιώνεται) (Yu et al., 2001), η παρουσία ενεργής GWD φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την ομαλή αποδόμηση του αμύλου. Μεταλλάξεις που προκαλούν σίγηση στα γονίδια που κωδικοποιούν την GWD ή επηρεάζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου, μειώνουν δραματικά και τη συγκέντρωση των φωσφορικών της αμυλοπηκτίνης και το ρυθμό της αποδόμησης του αμύλου. Ώριμα φύλλα αυτών των μεταλλαγμάτων (*starch excess 1* ή *sex 1*) συσσωρεύουν μέχρι και επτά φορές μεγαλύτερα ποσά αμύλου από ότι τα φυτά του αγρίου τύπου (Caspar et al., 1991; Yu et al., 2001; Zeeman and Rees 1999).

Οι απλούστερες πιθανές ερμηνείες για τη συμμετοχή της GWD στην αποδόμηση του αμύλου είναι ότι απαιτούνται είτε φωσφορικές ομάδες είτε το ίδιο το ένζυμο για τη δράση αγνώστων ενζύμων που υδρολύουν τις γλυκάνες στην επιφάνεια του αμυλόκοκκου. Οι φωσφορικές ομάδες πιθανόν επηρεάζουν το «πακετάρισμα» των πολυμερών της γλυκόζης μέσα στον αμυλόκοκκο και συνεπώς την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων (Blennow et al., 2000,2002; Yu et al.,

2001). Η GWD διαθέτει περιοχή της δικινάσης και μία άλλη μεγάλη αμινοτελική περιοχή (περίπου 120kD) άγνωστης λειτουργικότητας. Επιπλέον, πρόσφατα βρέθηκε νέο ένζυμο που μοιάζει με την GWD ή GWD 3 ή δικινάση της φωσφορογλυκάνης (PWD phosphoglucan water dikinase) που απαιτείται για την ομαλή υδρόλυση του αμύλου (Baunsgaard et al., 2005; Kötting et al., 2005). Μεταλλάγματα που δεν έχουν αυτό το ένζυμο παρουσιάζουν επίσης αυξημένα ποσά αμύλου στα φύλλα αλλά όχι στον ίδιο βαθμό με τα μεταλλάγματα της GWD. Είναι λοιπόν εύλογο να υποτεθεί ότι η GWD και η PWD δρουν μαζί για να δημιουργήσουν ένα πρότυπο φωσφορυλίωσης της αμυλοπηκτίνης που την κάνει προσιτή στα υδρολυτικά ένζυμα (Baunsgaard et al., 2005; Kötting et al., 2005).

Η περαιτέρω αποδόμηση του αμύλου μπορεί να γίνει με δύο διαφορετικούς τρόπους: είτε με υδρόλυση μέσω των αμυλασών (α και β) και του ενζύμου αποδιακλάδωσης τα οποία καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση των α(1,4) και α(1,6) γλυκοζιδικών δεσμών, είτε με φωσφορόλυση μέσω των φωσφορυλασών οι οποίες διασπούν τους α(1,4) γλυκοζιδικούς δεσμούς φωσφορολυτικά, με αποτέλεσμα το σχηματισμό φωσφορογλυκόζης (Heldt 1999).

Η φωσφορυλάση του αμύλου προσφέρει οικονομία ενέργειας στο φυτό. Κατά την υδρόλυση του αμύλου από τις αμυλάσες η ενέργεια που περιέχεται στους γλυκοζιδικούς δεσμούς α(1,4) και α(1,6) που διασπώνται μετατρέπεται σε μη αξιοποιήσιμη θερμική ενέργεια, γεγονός που δεν επιτρέπει την αντιστροφή της αντίδρασης υδρόλυσης. Αντίθετα κατά την φωσφορόλυση του αμύλου και το σχηματισμό της 1-φωσφορογλυκόζης, η ενέργεια του γλυκοζιδικού δεσμού διατηρείται στον εστερικό δεσμό. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την υπό προϋποθέσεις αντιστροφή της αντίδρασης προς την πλευρά σύνθεσης του αμύλου.

Η φωσφορυλάση του αμύλου δεν μπορεί να ενεργήσει από μόνη της, διότι η δράση της εντοπίζεται στις εξωτερικές αλυσίδες του μορίου της αμυλοπηκτίνης. Για αυτό το λόγο, ενεργεί σε συνδυασμό με την α-αμυλάση (που αρχίζει την αποδόμηση των αμυλόκκοκων) και των ενζύμων της αποδιακλάδωσης που κάνουν τις εσωτερικές αλυσίδες γλυκόζης προσιτές στο ένζυμο της φωσφορυλάσης (Hopkins 1995).

Διαφορετικές αμυλάσες ενεργούν σε διαφορετικά μέρη του μορίου του αμύλου. Και με αυτόν τον τρόπο μπορούμε και τις διακρίνουμε σε τρεις κατηγορίες:

- Εξααμυλάσες που αρχίζουν την υδρόλυση του αμύλου από τα εξωτερικά μέρη του μορίου υδρολύοντας δεσμούς 1-4.
- Ενδοαμυλάσες που υδρολύουν τα εσωτερικά μέρη του μορίου του αμύλου υδρολύοντας δεσμούς 1-4.
- Ένζυμα αποδιακλάδωσης όπου υδρολύουν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς στα σημεία διακλάδωσης δεσμοί 1-6 (Heldt 1999)

1.5.1. Η α-αμυλάση

Η α-αμυλάση είναι μια ενδοαμυλάση (Lea and Leegood 1997) που υδρολύει τους α(1,4) γλυκοζιδικούς δεσμούς σε τυχαίες θέσεις.

Με τη δράση της α-αμυλάσης, η αμυλόζη διασπάται γρήγορα σε μόρια μικρότερου μεγέθους τις δεξτρίνες. Από την παραπέρα δράση του ενζύμου πάνω στα μόρια αυτά λαμβάνονται ως προϊόντα κυρίως μαλτόζη και μαλτοτριόζη και δευτερευόντως γλυκόζη. Το ένζυμο αυτό δεν δρα πάνω σε δεσμούς α(1,6). Επομένως με υπόστρωμα την αμυλοπηκτίνη παράγει οριακές δεξτρίνες. Οι οριακές δεξτρίνες αποτελούνται από ένα μικρό αριθμό καταλοίπων γλυκόζης (4-10) και φέρουν τα αρχικά σημεία διακλάδωσης (Hopkins 1995).

Η α-αμυλάση είναι ένα ένζυμο ευρύτατα διαδεδομένο τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο καθώς και στους μικροοργανισμούς. Συγκρινόμενες σε αμινοξικό επίπεδο, οι α-αμυλάσες από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς αποκαλύπτουν τέσσερις υψηλά συντηρημένες περιοχές οι οποίες συσχετίζονται με περιοχές που έχουν δομικό και λειτουργικό ρόλο για το ένζυμο (Nakazima *et al.*, 1986).

Στα φυτά απαντάται στα βλαστώνοντα σπέρματα και ειδικά σε εκείνα που είναι πλούσια σε άμυλο. Είναι επίσης ενεργή στους αναπτυσσόμενους χέδρωπες όπου συμβάλει και στην ανάπτυξη του σπέρματος (Avigad and Dey 1997).

Τέλος η α-αμυλάση ρυθμίζεται και επάγεται από τις φυσικές ορμόνες γιβερρελίνη και αμπισικό οξύ. Επιπλέον ιόντα Ca^{2+} συμβάλλουν στην επαγωγή της δραστηριότητας της α-αμυλάσης (Hopkins 1995). Αντίθετα το ένζυμο παρεμποδίζεται από τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης του αμύλου καθώς και από τα βαρέα μέταλλα (Losch 2004).

1.5.2. Ένζυμα αποδιακλάδωσης

Τα ένζυμα αποδιακλάδωσης υδρολύουν τους $\alpha(1,6)$ γλυκοζιδικούς δεσμούς και διαφέρουν μεταξύ τους σε σχέση με το υπόστρωμα δράσης τους (Lea and Leegood 1997). Διακρίνονται σε δύο ομάδες τις πουλουλανάσες (EC 3.2.1.41) και την ισοαμυλάση (EC 3.2.1.68) ανάλογα με την ικανότητα υδρόλυσης του πουλουλανίου, ενός πολυσακχαρίτη με επαναλαμβανόμενες μονάδες μαλτοτριόζης που ενώνονται με $\alpha(1,6)$ γλυκοζιδικούς δεσμούς (Van de Maarel et al., 2002).

Οι πουλουλανάσες τύπου 1 υδρολύουν τους $\alpha(1,6)$ γλυκοζιδικούς δεσμούς του πουλουλανίου και της αμυλοπηκτίνης. Έχουν άριστο pH: 5,5 (Avigad and Dey 1997). Υπάρχουν επίσης και πολκουλανάσες τύπου 2 οι οποίες υδρολύουν $\alpha(1,6)$ και $\alpha(1,4)$ γλυκοζιδικούς δεσμούς. Τα κυριότερα προϊόντα της αποδόμησης τους είναι μαλτόζη και μαλτοτριόζη.

Η ισοαμυλάση υδρολύει τους $\alpha(1,6)$ γλυκοζιδικούς δεσμούς της αμυλοπηκτίνης μεγάλου μήκους γραμμικούς πολυσακχαρίτες. Απαντάται στις πατάτες, τα κουκιά και άλλα φυτικά είδη. Το άριστο pH δράσης του ενζύμου είναι 6,5-7,0 και η άριστη θερμοκρασία δράσης του 34°C. Η δράση του ενζύμου παρεμποδίζεται από τον Hg (Van de Maarel et al., 2002).

1.5.3. Η β -αμυλάση. Η δομή και η λειτουργία του ενζύμου

Η β -αμυλάση (EC 3.2.1.2) υδρολύει τους $\alpha(1,4)$ γλυκοζιδικούς δεσμούς πολυ- και ολίγο-σακχαριτών αφαιρώντας μόρια β -μαλτόζης από το μη αναγωγικό τους άκρο, κατατάσσεται στις έξω-υδρολάσες. Η δράση της σε έναν πολύ ή ολίγο-σακχαρίτη σταματά όταν συναντήσει την πρώτη διακλάδωση $\alpha(1,6)$. Το ένζυμο υπάρχει σε πολλά ανώτερα φυτά και σε κάποια βακτήρια. Πρόκειται για ένα μονομερές ένζυμο το οποίο παρουσιάζει κοινές φυσικοχημικές ιδιότητες σε όλα τα φυτά όπου έχει βρεθεί. Εξαιρεση αποτελεί η β -αμυλάση της γλυκοπατάτας που αποτελείται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες των 56 KDa (Rochalska and Grabowska 2007; Tanaka et al., 2002; Ziegler 1999; Shinke et al., 1988). Το άριστο pH δράσης είναι 5,5-6 ενώ η άριστη θερμοκρασία δράσης έχει βρεθεί ότι είναι 55°C (Yamasaki 2003). Το ένζυμο, αντίθετα με την α -αμυλάση, πιστεύεται ότι συνθέτεται

κατά την παραγωγή του σπέρματος και όχι κατά την βλάστηση. Το ένζυμο αποτελεί περίπου το 1-2% του ολικού N στο σπέρμα (Kreis and Shewry 1992). Στα σπέρματα των σιτηρών, το ένζυμο δημιουργείται κατά το σχηματισμό του σπέρματος και βρίσκεται σε ελεύθερη (διαλυτή) ή δεσμευμένη σε πρωτεϊνικά συσσωματώματα (αδιάλυτη) μορφή (Shinke et al., 1988).

Υπάρχουν δύο τύποι του ενζύμου που έχουν ανιχνευτεί σε σιτηρά, ο κύριος που βρίσκεται στο ενδοσπέρμιο και ένας με σημαντικά μικρότερη δραστηριότητα που βρίσκεται στο ενδοσπέρμιο αλλά και στα υπόλοιπα μέρη του φυτού. Ο δεύτερος τύπος έχει βρεθεί στο κριθάρι, στο σιτάρι και στη σίκαλη και ρυθμίζεται διαφορετικά από τον πρώτο τύπο (Daussant et al., 1987, 1991; Shewry et al., 1988). Η κύρια λειτουργία της β-αμυλάσης είναι η υδρόλυση του αμύλου στα φυτά (Kossmann and Lloyd 2000). Βασισμένος, σε *in vitro* μελέτες, ο φυσιολογικός ρόλος της β-αμυλάσης στην υδρόλυση του αμύλου ήταν για πολλά χρόνια υπό αμφισβήτηση, και αυτό κυρίως γιατί θεωρούταν ότι ήταν καταλυτικά ανενεργή σε φυσικούς αμυλόκοκκους χωρίς την πρότερη υδρόλυση του αμύλου από άλλα αμυλολυτικά ένζυμα όπως η α-αμυλάση (Beck and Ziegler 1989). Παρόλα αυτά, τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι η β-αμυλάση παίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση του παροδικού αμύλου (Scheiding et al., 2002). Μείωση της έκφρασης της εντοπιζόμενης στους χλωροπλάστες β-αμυλάσης με τη χρήση αντι-πληροφοριακού (antisense) RNA στην πατάτα είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση περίσσειας αμύλου στα φύλλα σε σύγκριση με αυτά του αγρίου τύπου (Scheiding et al., 2002). Διαγονιδιακά φυτά που έχουν έλλειψη σε αυτή τη χλωροπλαστική β-αμυλάση έχουν μειωμένη υδρολυτική ικανότητα αμύλου, ειδικά στο σκοτάδι. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η υδρολυτική διάσπαση του παροδικού αμύλου είναι το κυριότερο μονοπάτι σε αντίθεση με αυτό της φωσφορολυτικής οδού. Επιπροσθέτως, τα προϊόντα που παράγονται από τη δράση της β-αμυλάσης μετακινούνται στο κυτόπλασμα μέσω φορέων μαλτόζης (Niittyla et al., 2004) όπου και μεταβολίζονται σε γλυκόζη από τις γλυκοζυλοτρανσφεράσες (Lu and Sharkey 2004; Sean et al., 2004).

1.5.4. Ο εντοπισμός του ενζύμου

Στα φωτοσυνθετικά όργανα η β-αμυλάση εντοπίζεται στους χλωροπλάστες, εκεί δηλαδή που υπάρχει το άμυλο. Δραστικότητα του ενζύμου υπάρχει και στο χυμοτόπιο και στο κυτόπλασμα, όπου δεν υπάρχει άμυλο με αποτέλεσμα να γεννάται η υποψία της ύπαρξης και άλλων ρόλων στην αποδόμηση των γλυκανών (Karlan et al., 2005). Το γονιδίωμα των διαφόρων φυτικών ειδών κωδικοποιεί αρκετούς ισότυπους της β-αμυλάσης. Στο *Arabidopsis thaliana* λ.χ., υπάρχουν εννέα ισότυποι τους οποίους οι Smith et al., (2004) ονομάζουν BAM1 ως BAM9 παρέχοντας έτσι μια ενοποιημένη ονομασία. Με βάση την ανάλυση των ακολουθιών, μόνο τρία γονίδια τα BMY7, BMY8 και BMY9 φαίνεται να κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν πιθανό χλωροπλαστικό πεπτίδιο οδηγό (Lu et al., 2005). Το ένζυμο είναι εξω-χλωροπλαστικό, είναι υπεύθυνο για το 80% της συνολικής αμυλολυτικής δραστικότητας (Lin et al., 1988) και εκφράζεται περισσότερο κάτω από συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών. Πρόσφατα οι Sparla et al., (2006) έδειξαν ότι ο BAM1 (που ονομάζεται TR-BMY και BMY7), κωδικοποιεί ένα ενεργό χλωροπλαστικό ισότυπο της β-αμυλάσης που ρυθμίζεται μέσω της αναγωγής του με τη θειορεδοξίνη (Sparla et al., 2006). Ωστόσο, αρχικές αναφορές υποδεικνύουν ότι μετάλλαξη του BAM1 δεν έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του αμύλου των φύλλων, και εκφράζεται σε φωτοσυνθετικούς και μη φωτοσυνθετικούς ιστούς (Karlan and Guy 2005). Ο BAM2 (που ονομάζεται επίσης και BMY9) και ο BAM4 (που ονομάζεται και BMY6) φέρουν επίσης πλαστιδιακό πεπτίδιο οδηγό (Lloyd et al., 2005; Smith et al., 2005). Όμως, οι προβλέψεις είναι ελλιπείς, και δεν έχει εντοπιστεί πειραματικά η υποκυτταρική θέση της πρωτεΐνης. Επιπροσθέτως, οι Karlan and Guy (2005) αναφέρουν ότι η μετάλλαξη του BAM2 δεν έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του αμύλου στα φύλλα. Η BAM5 (που επίσης αποκαλείται BMY1 και RAM1) έχει μελετηθεί σε βάθος. Οι Laby et al., (2001) αναφέρουν ότι το 90% της δραστικότητας της β-αμυλάσης των φύλλων του *Arabidopsis* κωδικοποιείται από τη BAM5. Νωρίτερα είχε αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη BAM5 εδράζεται στους ηθμοσωλήνες (Wang et al., 1995). Ωστόσο, μετάλλαξη στο γονίδιο BAM5 δε φαίνεται να

επηρεάζει τη λειτουργία του ηθμού ή τα επίπεδα του αμύλου στα φύλλα (Laby et al., 2001).

1.5.5. Η β-αμυλάση σε καταστάσεις καταπόνησης

Η β-αμυλάση είναι ένα ένζυμο που «κινητοποιείται» από τα φυτά για την αντιμετώπιση καταστάσεων καταπόνησης. Αυτό έχει δειχθεί για την οσμωτική καταπόνηση και την αυξημένη αλατότητα (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999), καθώς και για τις χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες (Nielsen et al., 1997; Seki et al., 2001; Sung 2001; Dreier et al., 1995). Η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου σε συνθήκες καταπόνησης παρατηρείται σε πολλά φυτικά είδη (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999). Οσμωτική καταπόνηση του κριθαριού (*Hordeum vulgare*) (Dreier et al., 1995), του κεχριού (*Pennisetum glaucum*) και του αραβόσιτου (*Zea mays*) (Datta et al., 1999) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, η οποία συσχετίζεται και με μια αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών. Οι Todaka et al., (2000) αναφέρουν ότι σε κοτυληδόνες αγγουριού που εκτέθηκαν σε συνθήκες έλλειψης νερού, παρατηρήθηκαν έξι ισομορφές β-αμυλάσης, ενώ στο μάρτυρα βρέθηκαν τρεις. Η υπόθεση που διατύπωσαν είναι ότι μάλλον πρόκειται για ενεργοποίηση των ισομορφών αυτών υπό συνθήκες καταπόνησης παρά σε *de novo* παραγωγή διαφορετικών ισομορφών από τα καταπονημένα φυτά. Όπως είναι αναμενόμενο και η καταπόνηση αλατότητας αυξάνει τη συγκέντρωση της β-αμυλάσης καθώς και την δραστηριότητα της στο κριθάρι και στον αραβόσιτο (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999). Αναφορικά με την επίδραση της θερμοκρασιακής καταπόνησης έχει δειχθεί ότι οδηγεί στην επαγωγή της μεταγραφής και/ή στην αύξηση της δραστηριότητας της β-αμυλάσης (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999; Thomashow 2002; Jung et al., 2003; Seki et al., 2001). Αυτή η αύξηση συνδέθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης της μαλτόζης (Kaplan and Guy 2004; Nielsen 1997). Η έκθεση λ.χ. φυτών *Arabidopsis* που είχαν αναπτυχθεί στους 20°C, στους 40°C, οδήγησε σε πενταπλασιασμό των μεταγραφημάτων BMY7/BAM1 (που κωδικοποιούν ένα χλωροπλαστικό πεπτιδίο (Kaplan and Guy 2004; Sung 2001). Η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου ακολουθείται από αύξηση της συσσώρευσης μαλτόζης, ενώ η δραστηριότητα τόσο της α-γλυκοζιδάσης όσο και της

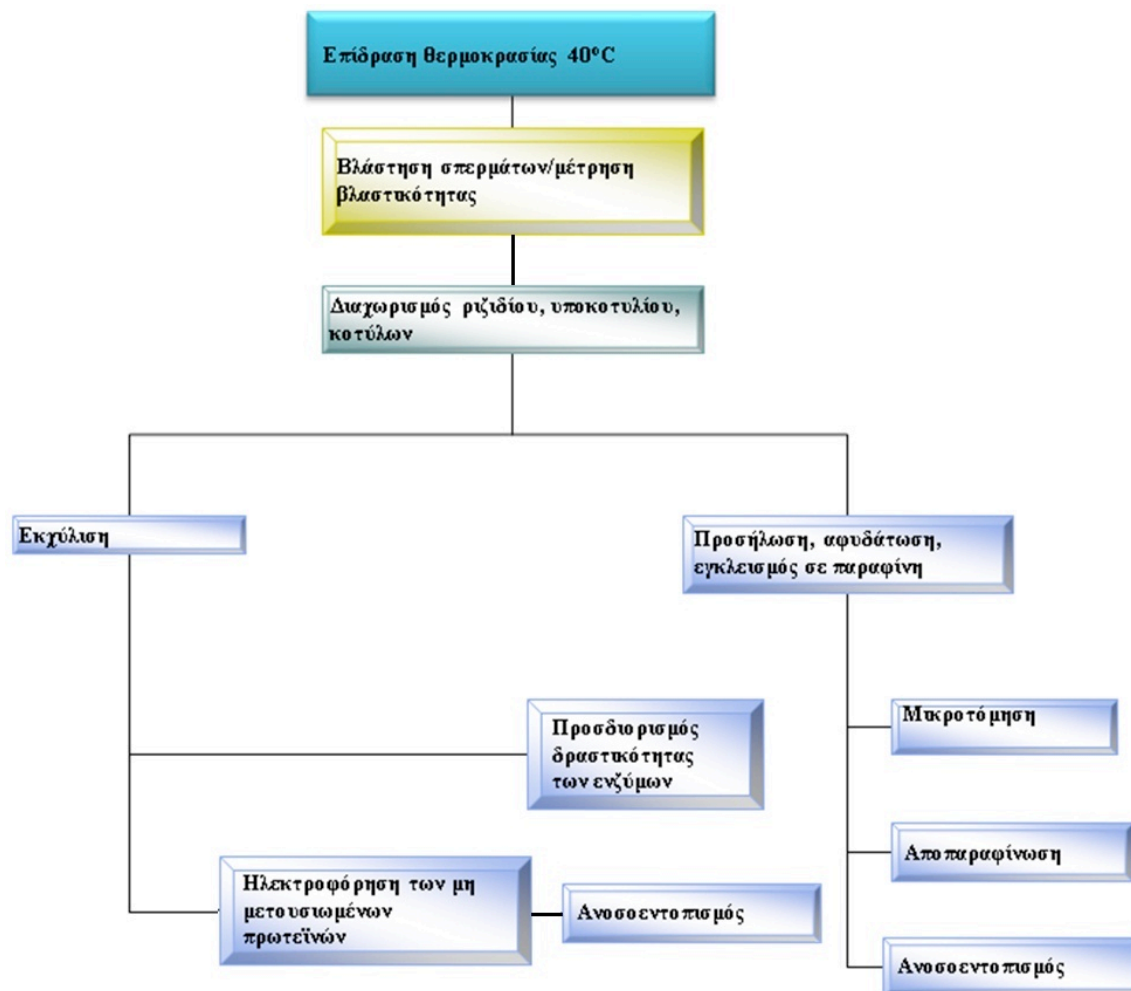
ενδοαμυλάσης, δεν παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή (Nielsen et al., 1997). Δεδομένης της γρήγορης συσσώρευσης των μεταγραφημάτων του ενζύμου, προτάθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης μαλτόζης αλλά και της φρουκτόζης και της γλυκόζης σε θερμοκρασιακής καταπόνησης, πιθανόν να βοηθά στην προστασία της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο στρώμα των χλωροπλαστών (Karlan and Guy 2005; Karlan et al., 2006). Αυξημένες ποσότητες της ολικής μαλτόζης των φύλλων στο *Arabidopsis thaliana* έχουν παρατηρηθεί επίσης κατά τη διάρκεια θερμοκρασιακών καταπονήσεων (Karlan and Guy 2004).

1.5.6. Η β-αμυλάση κατά τη βλάστηση των σπερμάτων

Κατά τη διάρκεια της βλάστησης των σπερμάτων, έχει δειχθεί ότι η δραστηριότητα του ενζύμου αυξάνει σημαντικά. Στο ρύζι και στο κριθάρι έχει αναφερθεί ότι το ένζυμο συντίθεται στα σπέρματα πριν από τη βλάστηση (Okamoto and Akazawa 1980; Kreis and Shewry 1992). Στα σιτηρά, κατά τη βλάστηση, το ένζυμο υφίσταται μεταμεταφραστικές αλλαγές (Kruger 1979; Lundgard and Svensson 1986; Bureau et al., 1989). Η ενεργοποίηση του ενζύμου γίνεται ή από μια δισουλφιδική ρεδοκτάση ή από ένα πρωτεολυτικό ένζυμο (Sorpanen and Lauriere 1989). Η δραστηριότητα της β-αμυλάσης, έχει συσχετιστεί με τη βλαστικότητα των σπερμάτων στα σιτηρά, σπέρματα με χαμηλή δραστηριότητα έχουν χαμηλότερη βλαστικότητα (Prtruzelli and Taranto 1990; Liveslay and Bray 1991). Οι Das and Sen-Mandi (1992) πρότειναν ότι η β-αμυλάση έχει μεγαλύτερη σημασία από την α-αμυλάση κατά τη διάρκεια των πρώτων ωρών της βλάστησης των σιτηρών. Φαίνεται ότι η *de novo* σύνθεση του ενζύμου στην αλευρώνη, συμβάλει στη διάσπαση του αμύλου. Οι Nandi et al., (1994) κατέγραψαν 6-10 φορές υψηλότερη δραστηριότητα της β-αμυλάσης από την α-αμυλάση στο πρώτο 24ωρο της ζωής του φυταρίου του ρυζιού. Αυξανόμενη δραστηριότητα του ενζύμου τις πρώτες 4 ημέρες της βλάστησης στο κεχρί αναφέρει και ο Yamasaki (2003), θεωρώντας ότι είναι βασικό ένζυμο για τη βλάστηση.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Οι διαδικασίες του πειράματος



Σχήμα 3: Σχηματική παράσταση των διαδικασιών του πειράματος.

2.2. Βλάστηση σπερμάτων που είχαν εκτεθεί σε υψηλές θερμοκρασίες

Έξι ομάδες από 200 σπέρματα βαμβακιού τοποθετήθηκαν σε τριβλία. Η πρώτη ομάδα αποτελούσε το μάρτυρα. Οι υπόλοιπες τοποθετήθηκαν για 1, 2, 3, 4, και 5 ημέρες αντίστοιχα σε κλίβανο στους 40°C. Η βλάστηση των σπερμάτων της βαμβακιού έγινε μεταξύ υγραμένων φύλλων χαρτί κουζίνας σε τυλιγμένα με αλουμινοχαρτο κουτιά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία 25°C. Η βλάστηση κράτησε 7 ημέρες για τις πρώτες 4 ομάδες (0, 1, 2, 3 ημέρες στους 40°C) και 8 ημέρες για τις

υπόλοιπες ομάδες. Η απόφαση αυτή πάρθηκε ώστε να υπάρχει αρκετός αριθμός φυτών για περαιτέρω έρευνα. Μετρήθηκε η βλαστικότητα.

2.3. Η εκχύλιση των ενζύμων

Αρχικά σπέρματα βαμβακιού προβλαστήθηκαν με τον τρόπο και με τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω. Μετά από 7 ή 8 ημέρες έγιναν τομές των αρτίβλαστων ξεχωρίζοντας τα δείγματα σε ρίζες, κοτύλες και υποκοτύλια. Μέρος των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε ώστε να γίνουν τομές για τον ανοσοεντοπισμό των ενζύμων, στα υπόλοιπα έγινε εκχύλιση των πρωτεϊνών για μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων.

Διαδικασία για την μέτρηση της δραστηριότητας των ενζύμων: Τα δείγματα ζυγίστηκαν και λειοτριβήθηκαν σε γουδί με χρήση υγρού αζώτου προσθέτοντας τον αντίστοιχο όγκο εκχυλιστικού ως εξής: 1:1 (w/v) στις ρίζες και στις κοτύλες και 1/0,5 (w/v) στα υποκοτύλια. Τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν μέσα σε erpendorf στον πάγο.

Τα δείγματα ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στα 15000g για 15 λεπτά και 4°C. Στο εκχύλισμα των κοτυλών παρατηρήθηκε συσσώρευση λιπιδίων στην επιφάνεια του υπερκείμενου υγρού. Γι' αυτό το λόγο το λίπος «ξαφρίστηκε» με χρήση πιπέτας και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και πάλι στις ίδιες συνθήκες. Μετά το πέρας και αυτής της διαδικασίας προστέθηκε γλυκερίνη σε κάθε δείγμα ώστε η τελική της συγκέντρωση να γίνει 20%. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων με τη μέθοδο Bearden. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα χωρίστηκαν σε δύο μέρη. Στο ένα μέρος προστέθηκαν λίγοι κόκκοι κυανού της βρωμοφαινόλης για την ηλεκτροφόρηση. Το άλλο μέρος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της β-αμυλάσης και της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης.

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών.

Tris HCl pH 7,5	10mM
glycerol	15%
BSA	0,02%
Ανηγγμένη γλουταθειόνη	2mM

2.4. Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της β-αμυλάσης και της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης κρίθηκε απαραίτητος ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με τη μέθοδο Bearden (1978).

Διάλυμα Bearden

1. Ζύγιση 10mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva 17524).
2. Το παραπάνω αραιώνεται σε 40ml 85% φωσφορικού οξέος.
3. Προσθήκη 200ml αποσταγμένο νερό (dH₂O).
4. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται την επόμενη ημέρα.

Η πρότυπη καμπύλη εξάρτησης της απορρόφησης του δείγματος από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών (BSA) σχεδιάστηκε για ποσότητες BSA μεταξύ 5 και 50μg.

Μετά την εκχύλιση των πρωτεϊνών και τη φυγοκέντρωση ετοιμάσθηκαν 3 σωλήνες για κάθε δείγμα (ρίζα, υποκοτύλιο, κοτύλη) που περιείχαν 1,5ml dH₂O, 10μl εκχυλίσματος και 1,5ml διαλύματος Bearden. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένας σωλήνας που περιείχε 1,5ml dH₂O και 1,5ml διαλύματος Bearden. Ακολούθως έγινε φωτομέτρηση στα 595nm. Σημειώνεται ότι η κοτύλη είχε αραιωθεί με αποσταγμένο νερό σε όγκο 1:10. Αυτό έγινε λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας της κοτύλης σε πρωτεΐνη. Μετά τις επαναληπτικές μετρήσεις για κάθε δείγμα υπολογίζεται η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης βάσει της πρότυπης καμπύλης.

2.5. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της β-αμυλάσης και της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της β-αμυλάσης ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της Megazyme της μεθόδου Betamyl. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην υδρόλυση του p-νιτροφαινυλομαλτοπενταοζιδίου από την β-αμυλάση. Η παραγόμενη μαλτόζη καθώς και η p-νιτροφαινυλογλυκόζη υδρολύεται αμέσως από μία α-γλυκοζιδάση. Σε προκαταρκτικά πειράματα μελετήθηκε η πορεία της αντίδρασης κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας (40°C) και συγκέντρωσης ενζύμου. Για την ισοκιτρική αφυδρογονάση, η μέτρηση βασίστηκε στην αντιστοίχιση της δραστηριότητας με την ποσότητα του παραγόμενου NADH.

Το διάλυμα αντίδρασης περιείχε για το μάρτυρα 100μl ενζυμικού εκχυλίσματος (17 έως 22μg ολικών πρωτεϊνών κατά Bearden) και 100μl αντιδραστηρίου (Betamyl), ενώ για τα υπόλοιπα δείγματα 60μl νερό και 40μl ενζυμικού εκχυλίσματος και 100μl αντιδραστηρίου (Betamyl). Μετά από 30min σε υδατόλουτρο 40°C προστίθεντο 1500μl 1% Trisma base για την περάτωση της αντίδρασης. Η μέτρηση της δραστηριότητας της β-αμυλάσης έγινε στα 410nm και αφορούσε την απελευθέρωση της p-νιτροφαινόλης.

Η μέτρηση της δραστηριότητας της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης έγινε μέσω της παραγωγής του NADH σύμφωνα με την McIntosh (1997). Το διάλυμα προσδιορισμού της δραστηριότητας περιείχε:

TRIS-HCl pH 8,0	50mM
NAD	0,5mM
Πρωτεΐνη του ορού του βοδιού (BSA)	0,025%
EDTA	1,0mM
MgCl ₂ 6H ₂ O	5,0mM
Ισοκιτρικό οξύ	5mM

Για το μάρτυρα δεν προστέθηκε το ισοκιτρικό οξύ.

Ακολούθησε μέτρηση στα 340nm με φασματοφωτόμετρο UV-160A (Shimadzu).

2.6. Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% ολικής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου με 2,7% bis-ακρυλαμίδιο, σε ασυνεχές σύστημα του οποίου τα συστατικά αναφέρονται παρακάτω. Ακολούθως φορτώθηκε με εκχύλισμα πρωτεϊνών που αντιστοιχούσε περίπου σε 20μg πρωτεΐνης από κοτύλες για την Nad^+ ισοκιτρική αφυδρογονάση και 5μg για την β-αμυλάση.

Η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 70V για δύο ώρες δηλαδή όσο χρόνο χρειάστηκε η χρωστική να περάσει στην πηκτή ανάλυσης και 120V για τη συνέχεια μέχρι το πέρας της ηλεκτροφόρησης.

Μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας η πηκτή τοποθετήθηκε στα αντίστοιχα διαλύματα επώασης. Στη συνέχεια αφέθηκε για λίγες ώρες μέχρι την εμφάνιση σήματος. Ακολούθως φωτογραφήθηκαν οι πηκτές.

A. Πηκτή ανάλυσης 6%T, 2,7%C

Μητρικό διάλυμα ακρυλαμιδίου, Bis-ακρυλαμιδίου (30%, 2,7%)	2,87ml
Ρυθμιστικό διάλυμα Ανάλυσης	2,50ml
Αποσταγμένο νερό	6,00ml
10% Υπερθειικό Αμμώνιο	50μl
TEMED	10μl

Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης

378mM Tris-HCl pH 8,9

B. Πηκτή συσσώρευσης (Stacking Gel) 3%T, 2,7%C

Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμιδίου, Bis-Ακρυλαμιδίου (30%, 2,7%)	1,25ml
Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης	5,0ml
Αποσταγμένο Νερό	3,5ml
10% Υπερθειικό Αμμώνιο	150μl
TEMED	10μl

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης

63mM Tris-HCl pH 6,8

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

Tris	25mM
γλυκίνη	192mM

Στην περίπτωση της β-αμυλάσης για τον καθαρισμό των δειγμάτων από το λίπος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

Ακετόνη ψύχθηκε στους -20°C

Διάλυμα ακετόνης/νερό 4:1 και ψύχθηκε στους -20°C , προστέθηκε σε αναλογία 4:1 στο δείγμα, αφέθηκε όλη τη νύκτα στους -20°C .

Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στους 4°C στις 15000 στροφές ανά λεπτό για 15 λεπτά.

Αφαιρέθηκε το υπερκείμενο υγρό και έπειτα ξεπλύθηκε με διάλυμα ακετόνης/νερού 4:1 θερμοκρασίας -20°C .

Το υπερκείμενο υγρό αφαιρέθηκε και προστέθηκε διάλυμα Tris+ 1μl κορεσμένου διαλύματος κυανού της βρωμοφαινόλης (Scopes 1987).

2.7. Η ανοσοβιοχημική μελέτη

Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα εναντίον της β-αμυλάσης της γλυκοπατάτας (rabbit anti beta-amylase Biodesign) που παράχθηκαν σε κουνέλια. Ο ανοσοεντοπισμός έγινε σε τομές ριζών, υποκοτυλίου και κοτυλών.

Για την ισοκιτρική αφυδρογονάση χρησιμοποιήθηκαν επίσης πολυκλωνικά αντισώματα (Agrisera AS06203A) από συντηρημένες περιοχές του ενζύμου από ανώτερα φυτά και *Chlamydomonas reihardtii* που δεν περιείχαν συντηρημένες περιοχές των ισοτύπων που εξαρτώνται από NADP.

Προσήλωση δειγμάτων.

Τα διάφορα όργανα (ρίζες, υποκοτύλια και κοτύλες), συλλέχθηκαν σε γυάλινα μικρά μπουκάλια και προσηλώθηκαν σε διάλυμα 0,5% διάλυμα γλουταραλδεϋδης και 4% φορμαλδεϋδης.

Αφυδάτωση.

Ακολούθως τα όργανα, αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων αιθανόλης (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100 για 3 φορές).

Διαφανοποίηση.

Στη συνέχεια κατέστησαν διαφανή με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ξυλένιου, διαδοχικά ως εξής: 25% ξυλένιο-75% αιθανόλη, 50% ξυλένιο-50% αιθανόλη, 75% ξυλένιο-25% αιθανόλη, 100% ξυλένιο για 3 φορές .

Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη.

Για τον εγκλεισμό των δειγμάτων σε παραφίνη χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικά εκμαγεία, τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοχείο με πάγο. Η τοποθέτηση των δειγμάτων έγινε με τρόπο ώστε αυτά να έχουν τον επιθυμητό προσανατολισμό. Επίσης μεταφέρθηκε μικρή ποσότητα λιωμένης παραφίνης. Καθώς η παραφίνη έπηξε, και για να αποφευχθεί ο εγκλεισμός φυσαλίδων αέρα, μια πυρακτωμένη ανατομική βελόνα, θέρμαινε την περιοχή γύρω από τους ιστούς.

Προετοιμασία αντικειμενοφόρων.

1. Οι αντικειμενοφόροι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν πλένονται σε διάλυμα 1% SDS για 2 περίπου ώρες, για να απομακρυνθούν από αυτές οι τυχόν λιποδιαλυτές ουσίες.
2. Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό, σε συνεχή ροή.
3. Ακολουθεί πλύσιμό τους επίσης για 2 ώρες σε διάλυμα υδροχλωρίου 5%.
4. Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και αποστειρώνονται.
5. Ακολουθεί εμβάπτιση τους σε διάλυμα 1% w/v πολυλυσίνης.
6. Τέλος, αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μέρες, και,
7. Ακολουθεί φύλαξή τους στο ψυγείο.

Μικροτομήσεις.

Το δείγμα τοποθετείται σε χειροκίνητο μικροτόμο (LEIKA). Οι τομές που έγιναν ήταν πάχους 10μm. Ακολούθησε επιλογή των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι επιλεγμένες τομές τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους επεξεργασμένες με πολυλυσίνη και προστίθεται μικρή ποσότητα απεσταγμένου-αποστειρωμένου νερού κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι τομές να επιπλέουν στις αντικειμενοφόρους. Έπειτα τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα στους 42°C. Μετά την πάροδο 10 λεπτών το νερό αφαιρέθηκε προσεκτικά με χαρτί και οι αντικειμενοφόροι παρέμειναν στους 42°C για 48 ώρες για να εξατμιστεί το νερό και να προσκολληθούν οι τομές στις αντικειμενοφόρους.

Αποπαραφίνωση

Η αποπαραφίνωση έγινε με διαδοχική εμβάπτιση των ιστών σε διαλύματα που περιείχαν:

100% ξυλένιο για 30min σε δύο διαφορετικά διαλύματα, 50 % ξυλένιο-50% αιθανόλη για 20min, 100 % αιθανόλη για 15min, 95 % αιθανόλη για 15min, 70 % αιθανόλη για 15min

2.8. Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης και της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης

Μετά την αποπαραφίνωση ακολουθούνται τα εξής βήματα.

- Οι τομές καλύπτονται με διάλυμα δεσμεύσεως μη ειδικών θέσεων και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 ώρα.
- Ακολουθεί επώαση των τομών σε 1:1500 αραιώση του αντισώματος (Biodesign Rabbit anti-sweet potato b-amylase polyclonal) και 1:500 αραιώση του αντισώματος (Biodesign Rabbit anti-sweet potato NAD⁺ isocitrate dehydrogenase polyclonal), σε διάλυμα TBST με 1% BSA, και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για τουλάχιστον 12 ώρες σε θερμοκρασία 4°C.
- Το μη δεσμευμένο αντίσωμα ξεπλένεται με διάλυμα TBST για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

- Οι τομές επωάζονται σε διάλυμα TBST με 1% BSA, που περιέχει κατάλληλη αραίωση (1:5000) δευτερογενούς αντισώματος, που φέρει συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση (AP-Anti-Rabbit, Promega), για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα προέρχεται από ποντίκι έναντι των αντισωμάτων κουνελιών (IgG).
- Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος ξεπλένεται με διάλυμα TBST για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές εξισορροπούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα Buffer 3 για 10 λεπτά, και καλύπτονται με διάλυμα χρωματικής αντίδρασης (66 μl NBT και 33μl BCIP σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος ανίχνευσης).
- Η χρωματική αντίδραση γίνεται στο σκοτάδι και η ανάπτυξη του χρώματος ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο, ούτως ώστε να προληφθεί η ανάπτυξη μη εξειδικευμένου σήματος υποβάθρου.
- Η αντίδραση σταματά με καλό ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με αποσταγμένο νερό.
- Ακολουθεί αφυδάτωση με διαδοχικές εμβαπτίσεις, σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης 10%, 30%, 50%, 70%, 90% και δύο φορές σε 100% για ένα λεπτό σε κάθε διάλυμα.
- Τέλος, αφού στεγνώσουν καλά οι τομές, μονιμοποιούνται και καλύπτονται με DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας.

Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

- Ενυδάτωση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με αποσταγμένο νερό.
- Αντικατάσταση του αποσταγμένου νερού με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και επώασή του συμπεριλαμβανομένης της πηκτής για 10min.
- Τοποθέτηση 3 φύλλων χαρτιού 3MM που έχει κορεστεί με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Αφαίρεση τυχόν φυσαλίδων αέρα με χρήση πιπέτας.
- Τοποθέτηση των φύλλων νιτροκυτταρίνης και της πηκτής αντίστοιχα.
- Πάνω από αυτά τοποθετούνται 3 φύλλα χαρτιού 3MM και αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες αέρα.
- Μεταφορά των πρωτεϊνών στα 200mA για 45min, υπό ψύξη.

- Μετά την ηλεκτροφόρηση σημειώνεται το φύλλο νιτροκυτταρίνης που είχε τοποθετηθεί προς την κάθοδο και φυλάσσεται μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.

Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου στις τομές των φυτικών οργάνων.

- Δέσμευση των μη ενεργών θέσεων των τομών για 1h σε 1% BSA σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Επάση των τομών με διάλυμα αντισώματος σε αραιώση 1:1500 σε TBST 1% BSA στους 4°C για 16h.
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBST 3 φορές επί 5min για την απομάκρυνση του αδέσμευτου πρωτογενούς αντισώματος.
- Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος σε αραιώση 1:5000 για 1h30min.
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBST 3 φορές επί 5min για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος.
- Εντοπισμός της αλκαλικής φωσφατάσης με NBT/BCIP (66 μl NBT και 33μl BCIP σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος ανίχνευσης).
- Αφυδάτωση των τομών σε σειρά EtOH.
- Εφαρμογή DPX.
- Η χρώση του μάρτυρα έγινε με Orange G σε απόλυτη αλκοόλη.

Διαλύματα

TBST

Tris HCl pH 7.5	20 mM
NaCl	150mM
Tween 20	0,05%

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης

10ml ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης

33μl 5-βρωμο-3-χλωρο-ινδολυλο- φωσφορικό (BCIP)

66μl Νιτρομπλέ του τετραζολίου (NBT)

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης

Tris pH 9.5	100mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	50 mM

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών

Tris	24mM
Γλυκίνη	192mM
Μεθανόλη	20%

3. Αποτελέσματα

3.1.1. Μέτρηση της βλαστικότητας των σπερμάτων βαμβακιού μετά την επίδραση θερμοκρασίας 40°C

200 σπέρματα για κάθε μεταχείριση (0,1,2,3,4,5 ημέρες στους 40°C) τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε πλαστικά δοχεία και ανάμεσα σε φύλλα απορροφητικού χαρτιού στο σκοτάδι. Η βλαστικότητα μετρήθηκε 7 ημέρες από την ημέρα τοποθέτησης, εκτός από τις μεταχειρίσεις 4 και 5 ημέρες στους 40° C στις οποίες μετρήθηκε στις 8 ημέρες από την ημέρα τοποθέτησης. Αυτό έγινε για να εξασφαλιστεί αρκετό φυτικό υλικό για τη συνέχιση του πειράματος που κρίθηκε ανεπαρκές στις 7 ημέρες για τις δύο αυτές μεταχειρίσεις.

Χρόνος παραμονής των σπερμάτων στους 40°C (ημέρες)						
	Μάρτυρας	1	2	3	4	5
Αρ. σπερμάτων που βλάστησαν	185	182	168	162	152	147
Βλαστικότητα	92,5%	91%	84%	81%	76%	73,5%

Πίνακας 3: Βλαστικότητα των σπερμάτων μετά την επίδραση θερμοκρασίας 40°C

3.1.2. Μέτρηση νωπού βάρους 200 σπερμάτων



Γράφημα 1: Μέτρηση νωπού βάρους 200 σπερμάτων.

Στο παραπάνω γράφημα αποτυπώνεται το νωπό βάρος 200 σπερμάτων. Το νωπό βάρος φαίνεται να μην επηρεάστηκε σημαντικά από το χειρισμό. Αυτό μας οδηγεί

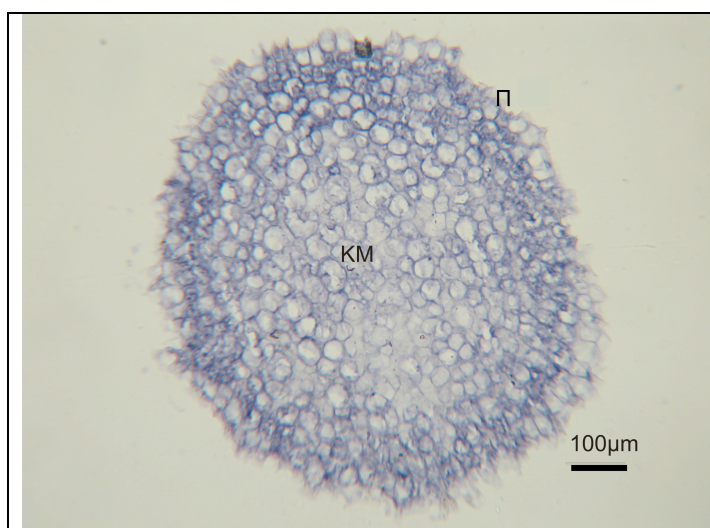
στο συμπέρασμα ότι τα σπέρματα δεν είχαν αφυδατωθεί σε σημαντικό βαθμό που να επηρεάζεται η δραστικότητα των ενζύμων.

Σημείωση: Η αύξηση του νωπού βάρους από την τρίτη ημέρα, οφείλεται στην αυξημένη υγρασία του περιβάλλοντος λόγω των καιρικών συνθηκών που επικρατούσαν κατά τις συγκεκριμένες ημέρες που έγιναν οι μετρήσεις (ημέρες βροχής).

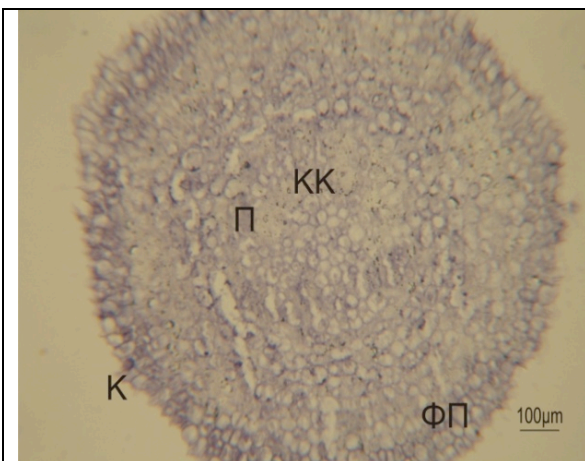
3.2. Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης και της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης

Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης και της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης δείχνει τους ιστούς στους οποίους κατά τη στιγμή της προσήλωσης υπάρχουν τα ένζυμα και τη σχετική αφθονία τους. Τα ένζυμα εντοπίστηκαν σε εγκάρσιες τομές ρίζας, υποκοτυλίου και των κοτυλών. Η παρουσία μοβ-μπλε χρωματισμού σηματοδοτεί την παρουσία των ενζύμων στους φυτικούς ιστούς. Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης στις ρίζες, σε εγκάρσιες τομές στην περιοχή της καλύπτρας, έδειξε ότι το ένζυμο εντοπίζεται τόσο σε όλα τα κύτταρα της καλύπτρας (Κ), όσο και στην κεντρική περιοχή (**Εικόνα 6**). Στην περιοχή της άκρης της καλύπτρας, υπάρχει δραστικότητα της β-αμυλάσης σε όλους τους ιστούς (**Εικόνα 5**).

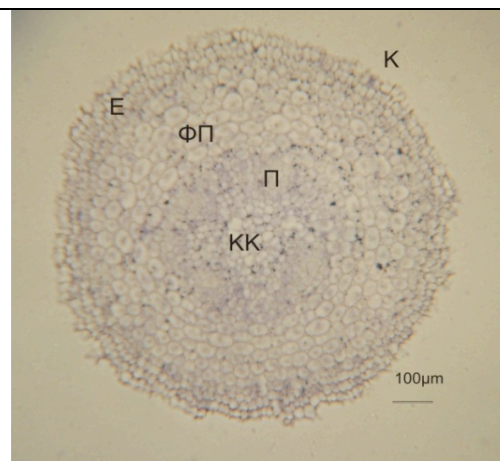
Στην αντίστοιχη περιοχή (περιοχή καλύπτρας), η ισοκιτρική αφυδρογονάση εντοπίζεται κυρίως στον κεντρικό κύλινδρο, στην επιδερμίδα και στην εξώτερη στοιβάδα του φλοιώδους παρεγχύματος (ΦΠ) (**Εικόνα 7**)



Εικόνα 5: Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή στη καλύπτρα. Διακρίνεται η κεντρική περιοχή (ΚΜ) και τα περιφερειακά κύτταρα (Π). Το ένζυμο εντοπίζεται παντού, το σήμα όμως είναι εντονότερο στα περιφερειακά κύτταρα, δηλαδή τα κύτταρα που πρόκειται να εξαλλοιωθούν.



Εικόνα 6: Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή στη ρίζα βαμβακιού σε περιοχή σχηματισμού των ηθμοσωλήνων. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός σε όλα τα κύτταρα της καλύπτρας (Κ). Στο υπόλοιπο μέρος της ρίζας παρατηρείται σήμα αλλά μικρότερης έντασης. Διακρίνονται το Φλοιώδες παρέγχυμα (ΦΠ) και το προκάμβιο (Π).

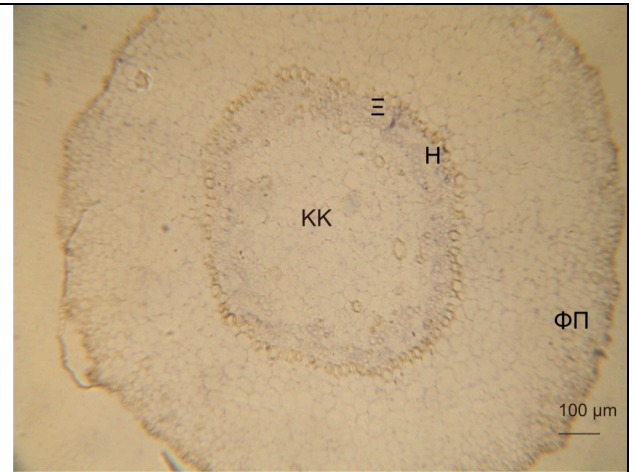


Εικόνα 7: Ανοσοεντοπισμός της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης σε εγκάρσια τομή στη ρίζα βαμβακιού σε περιοχή κοντά στο ακρορρίζιο. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός κυρίως στην περιοχή του κεντρικού κυλίνδρου (ΚΚ) και λιγότερο έντονος στην αναπτυσσόμενη επιδερμίδα (Ε), και στις εξωτερικές στοιβάδες του φλοιώδους παρεγχύματος (ΦΠ).

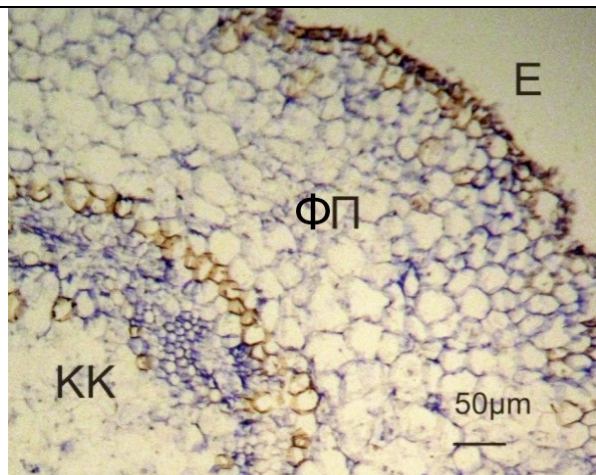
Στην περιοχή του υποκοτυλίου και τα δύο ένζυμα, εντοπίστηκαν κυρίως στην περιοχή του ηθμού και λιγότερο στην εξωτερική στοιβάδα του φλοιώδους παρεγχύματος (ΦΠ).



Εικόνα 8: Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή σε υποκοτύλιο βαμβακιού. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός κυρίως στην περιοχή του ηθμού (Η) και του ξύλου (Ξ) και λιγότερο στην εξωτερική στοιβάδα του φλοιώδους παρεγχύματος (ΦΠ)



Εικόνα 9: Ανοσοεντοπισμός της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης σε εγκάρσια τομή σε υποκοτύλιο βαμβακιού. Παρατηρείται χρωματισμός κυρίως στην περιοχή του ηθμού (Η) και του ξύλου (Ξ) και λιγότερο στην εξωτερική στοιβάδα του φλοιώδους παρεγχύματος (ΦΠ)



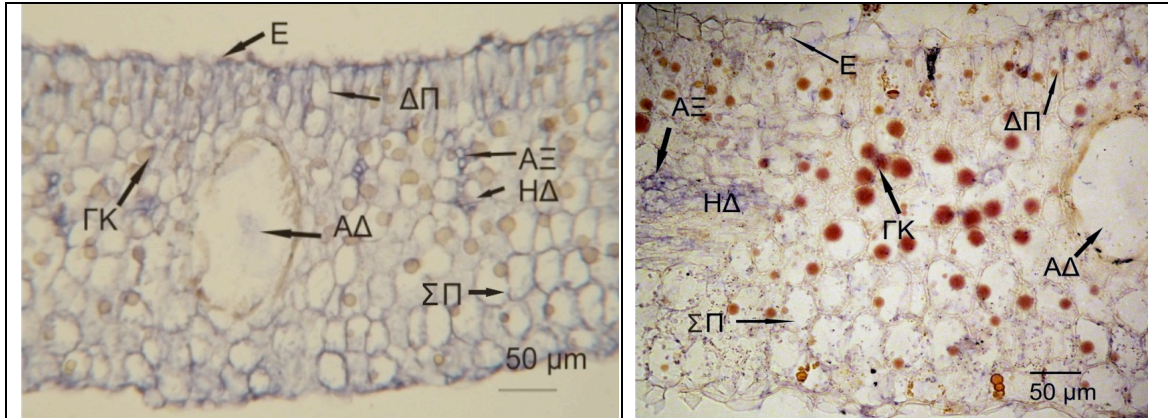
Εικόνα 10: Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή σε υποκοτύλιο βαμβακιού σε μεγέθυνση. Παρατηρείται χρωματισμός κυρίως στις εξωτερικές περιοχές του κεντρικού κυλίνδρου (ΚΚ), στις εξωτερικές στοιβάδες κυττάρων του Φλοιώδους παρεγχύματος (ΦΠ) και στα κύτταρα της επιδερμίδας (Ε).



Εικόνα 11: Ανοσοεντοπισμός της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης σε εγκάρσια τομή σε υποκοτύλιο βαμβακιού σε μεγέθυνση. Παρατηρείται χρωματισμός κυρίως στις εξωτερικές περιοχές του κεντρικού κυλίνδρου (ΚΚ) και στις εξωτερικές στοιβάδες κυττάρων του Φλοιώδους παρεγχύματος (ΦΠ), (Ε).

Στις κοτυληδόνες, τα ένζυμα εντοπίστηκαν στα αγγεία του ξύλου (ΑΞ) και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) καθώς και στο δρυφακτοειδές παρέγχυμα (ΔΠ) και

στις εξωτερικές στοιβάδες του σπογγώδους παρεγχύματος (ΣΠ) με σχετικά ισχυρό σήμα (Εικόνα 12, Εικόνα 13, Εικόνα 14, Εικόνα 15).



Εικόνα 12: Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή στις κοτύλες βαμβακιού. Παρατηρείται γενικευμένος χρωματισμός σε όλα σχεδόν τα κύτταρα του οργάνου. Εντονότερο είναι το σήμα στα αγγεία του ξύλου (ΑΞ). Διακρίνεται αδένες (ΑΔ) καθώς και θύλακες με το αλκαλοειδές γκοσσυπιόλη (ΓΚ). (ΔΠ) δρυφακτοειδές παρέγχυμα, (Ε) επιδερμίδα, (ΣΠ) σπογγώδες παρέγχυμα.

Εικόνα 13: Ανοσοεντοπισμός της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης σε εγκάρσια τομή στις κοτύλες βαμβακιού. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), στα αγγεία του ξύλου (ΑΞ), στο Δρυφακτοειδές παρέγχυμα (ΔΠ) και στις εξωτερικές στοιβάδες του σπογγώδους παρεγχύματος (ΣΠ).

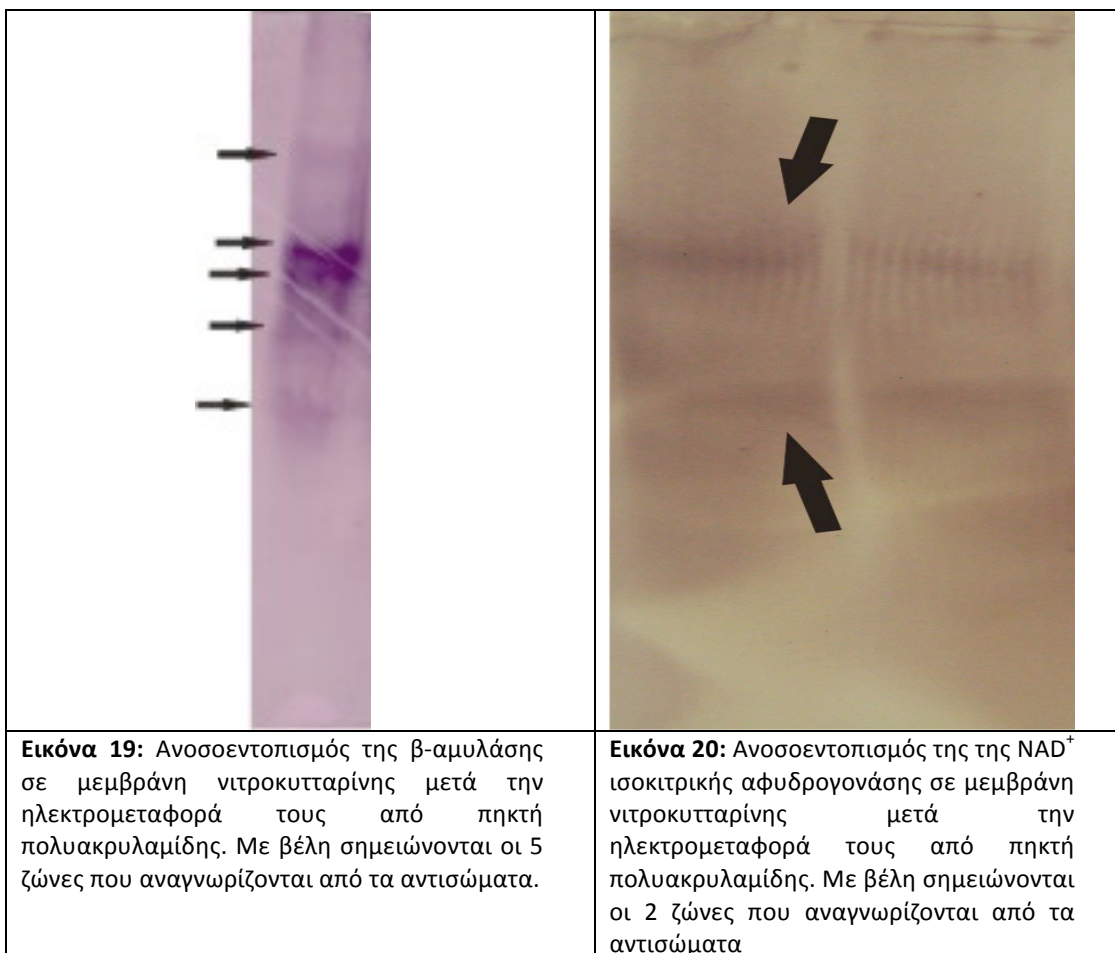
<p>Εικόνα 14: Λεπτομέρεια από εγκάρσια τομή στις κοτύλες (περιοχή ηθμαγγειωδών δεσμίδων και αγγείων του ξύλου), ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), στα αγγεία του ξύλου (ΑΞ) και στις παρακείμενες στοιβάδες του σπογγώδους παρεγχύματος (ΣΠ).</p>	<p>Εικόνα 15: Λεπτομέρεια από εγκάρσια τομή στις κοτύλες (περιοχή ηθμαγγειωδών δεσμίδων και αγγείων του ξύλου), ανοσοεντοπισμός της NAD⁺ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), στα αγγεία του ξύλου (ΑΞ) και στις παρακείμενες στοιβάδες του σπογγώδους παρεγχύματος (ΣΠ). Εντός των κυττάρων εντοπίζονται τα μιτοχόνδρια.</p>

Παρακάτω παρατίθενται φωτογραφίες από το μάρτυρα (επώαστηκαν με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης) η εικόνα είναι παρόμοια και για τα δύο ένζυμα (**Εικόνα 16, Εικόνα 17, Εικόνα 18**).

<p>Εικόνα 16: Εγκάρσια τομή κοτύλης. προσαξόνια επιδερμίδα (Ε), δρυφακτοειδές παρέγχυμα (ΔΠ), αδένας (ΑΔ), γκοσσυπιόλη (ΓΚ).</p>	<p>Εικόνα 17: Εγκάρσια τομή ρίζας βαμβακιού. κεντρική περιοχή (ΚΜ), σχηματιζόμενη επιδερμίδα (Ε).</p>	<p>Εικόνα 18: Εγκάρσια τομή υποκοτυλίου βαμβακιού, κεντρικός κύλινδρος (ΚΚ), φλοιώδες παρέγχυμα (ΦΠ), επιδερμίδα (Ε).</p>

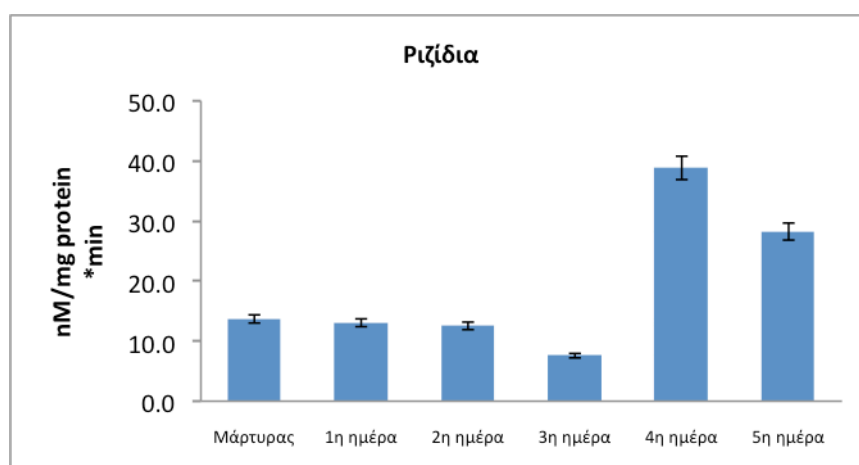
3.3. Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων.

Τα αποτελέσματα της ανοσοανίχνευσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κοτυλών μετά την ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης φαίνονται στις **Εικόνες 19 και 20**. Η **Εικ. 19** αφορά την β-αμυλάση. Το αντίσωμα αναγνωρίζει πέντε πεπτίδια της β-αμυλάσης. Στην **Εικ. 20** τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα κατά της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης αναγνώρισαν δύο πεπτίδια (βέλη).

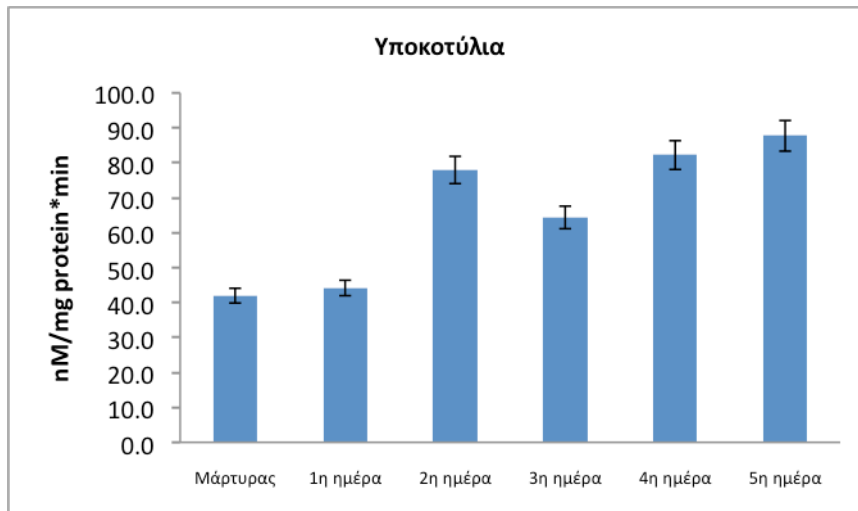


3.4. Ο προσδιορισμός της *in vitro* δραστηριότητας της β-αμυλάσης και της NAD⁺ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης

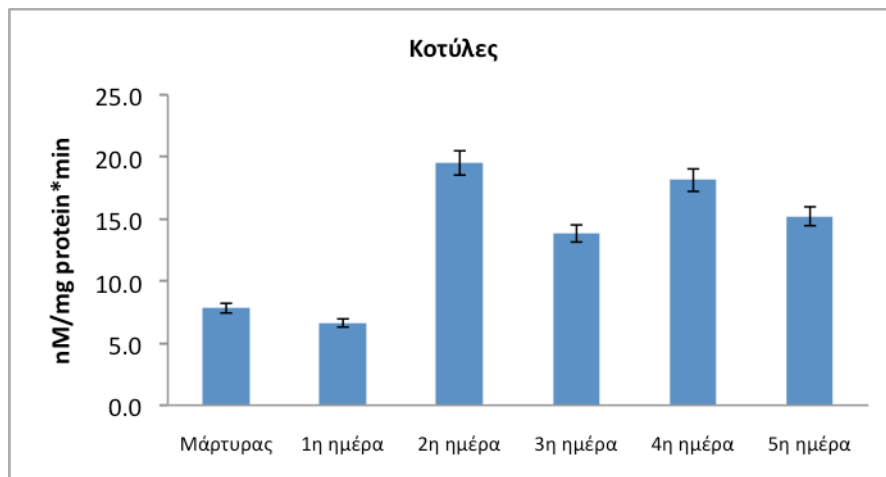
Η δραστηριότητα της β-αμυλάσης προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε ρίζες, υποκοτύλια και κοτύλες τόσο στο μάρτυρα όσο και σε φυτά που τέθηκαν για 1, 2, 3, 4 και 5 ημέρες στους 40°C. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκε πρώτα το χρονικό διάστημα της επώασης των δειγμάτων και η ποσότητα του ενζυμικού εκχυλίσματος κατά τα οποία η παραγωγή του έγχρωμου προϊόντος αυξανόταν γραμμικά. Οι προκαταρκτικές δοκιμές έδειξαν ότι με τη δεδομένη συγκέντρωση υποστρώματος η ταχύτητα της αντίδρασης παρέμενε σταθερή για 75μl εκχυλισμάτων που περιείχαν από 150-350μg ολικών πρωτεϊνών για 20min. Κατόπιν τούτου επιλέχθηκε η μέτρηση της δραστηριότητα του ενζύμου μετά από χρονικό διάστημα 10min.



Γράφημα 2: Δραστηριότητα της β-αμυλάσης (nM/mg πρωτεΐνης ανά λεπτό) στο μάρτυρα και σε φυτά που τέθηκαν 1, 2, 3, 4, 5 ημέρες στους 40°C, για το ριζίδιο (οι μπάρες δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου)

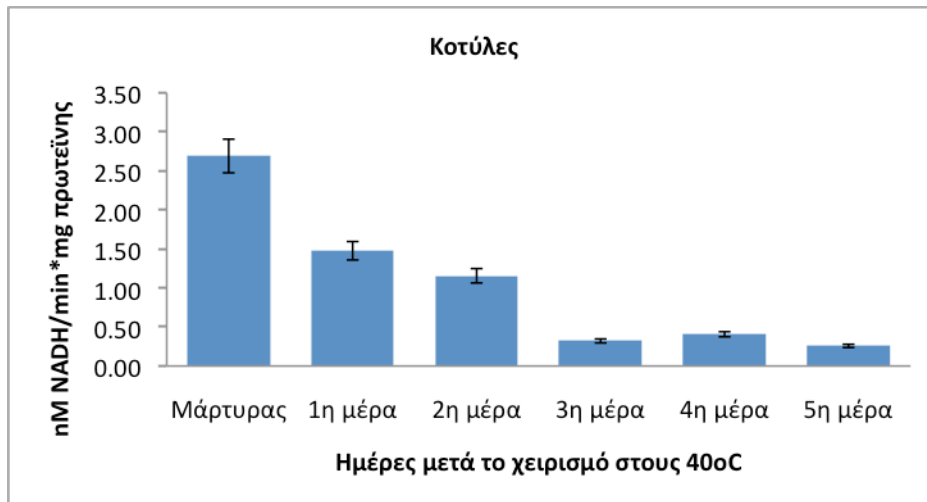


Γράφημα 3: Δραστηριότητα της β-αμυλάσης (nM/mg πρωτεΐνης ανά λεπτό) στο μάρτυρα και σε φυτά που τέθηκαν 1, 2, 3, 4, 5 ημέρες στους 40°C, για το υποκοτύλιο (οι μπάρες δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου)



Γράφημα 4: Δραστηριότητα της β-αμυλάσης (nM/mg πρωτεΐνης ανά λεπτό) στο μάρτυρα και σε φυτά που τέθηκαν 1, 2, 3, 4, 5 ημέρες στους 40°C, για τις κοτύλες (οι μπάρες δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου)

Για την NAD^+ ισοκιτρική αφυδρογονάση, δεν κατέστη δυνατό να προσδιοριστεί η δραστικότητα στα ριζίδια και στα υποκοτύλια. Η μέτρηση στις κοτύλες, κατέστη δυνατή με άμεση μέτρηση μετά την τοποθέτηση του ενζύμου.



Γράφημα 5: Δραστικότητα της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης (nM/mg πρωτεΐνης ανά λεπτό) στο μάρτυρα και σε φυτά που τέθηκαν 1, 2, 3, 4, 5 ημέρες στους 40°C, για το ριζίδιο, το υποκοτύλιο και τις κοτύλες αντίστοιχα (οι μπάρες δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου)

Όπως φαίνεται από τα παραπάνω διαγράμματα, η δραστικότητα της β-αμυλάσης αυξάνεται σημαντικά στα υποκοτύλια και τις κοτύλες τη δεύτερη ημέρα στους 40°C, ενώ στις ρίζες την τέταρτη ημέρα. Όσον αφορά την NAD^+ ισοκιτρική αφυδρογονάση, φαίνεται μία σχεδόν ομαλή πτώση της δραστικότητα του ενζύμου όσο αυξάνεται το διάστημα παραμονής των σπερμάτων στους 40°C.

4. Συζήτηση

Ένα μεγάλο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι καλλιεργητές βαμβακιού είναι η μειωμένη βλαστικότητα του σπόρου. Το πρόβλημα αυτό είναι δυνατόν να αντιμετωπιστεί με αυξημένες ποσότητες σποράς. Ένα άλλο πρόβλημα όμως είναι η μειωμένη ζωτικότητα των σποροφύτων που προέρχονται από σπόρους αποθηκευμένους για περιόδους μεγαλύτερες του έτους (Trawatha *et al.*, 1995). Τα φυτάρια της μειωμένης ζωτικότητας καθυστερούν να αναπτυχθούν με συνέπεια την αυξημένη ανομοιογένεια των φυτών της καλλιέργειας που οδηγεί τελικά στην αύξηση του κόστους της παραγωγής.

Την περίοδο 2003-2004, η συνολική αξία των σπόρων που πωλήθηκαν στις Ηνωμένες Πολιτείες και μόνο ήταν 1,44 δισεκατομμύρια δολάρια (USDA/FAS 2009). Από τους σπόρους αυτούς, πρόβλημα στη βλαστικότητα και τη ζωτικότητα παρουσιάζουν κατά μέσο όρο το 25% (Shatters *et al.*, 1994). Δεδομένων των οικονομικών επιπτώσεων της υποβάθμισης του φυτικού υλικού κατά την αποθήκευση και του περιορισμένου διαθέσιμου χρόνου, οι εταιρίες παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού καταφεύγουν στην μέθοδο της επιταχυνόμενης γήρανσης για την αξιολόγηση των προϊόντων τους (Rajjou and Debeaujon 2008). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στις παρατηρήσεις του Harrington (1972), ο οποίος πρότεινε ότι κάτω από κανονικές συνθήκες αποθήκευσης (25°C, 50-70% σχετική υγρασία), για κάθε 1% μείωση της υγρασίας του σπόρου και για κάθε 5°C μείωση της θερμοκρασίας, η διάρκεια ζωής των σπερμάτων διπλασιάζεται. Η αξιολόγηση της ποιότητας του σπόρου βασίζεται στην αντιστροφή των συμπερασμάτων αυτών και έκθεση των σπερμάτων σε υψηλότερες θερμοκρασίες και σχετική υγρασία. Η επιταχυνόμενη γήρανση με βάση τις παραπάνω παρατηρήσεις, έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορες μελέτες σε διάφορα φυτά (Parish and Leopold 1978; Baily *et al.*, 1996) αλλά και στο βαμβάκι (Rathinavel and Dharmalingam 2001; Maqsood *et al.*, 2000). Η μέθοδος της επιταχυνόμενης γήρανσης, επιλέχτηκε και για την παρούσα μελέτη. Τα σπέρματα τοποθετήθηκαν σε κλίβανο σταθερής θερμοκρασίας 40°C για διαφορετικά χρονικά διαστήματα ώστε να μελετηθεί η επίδραση της παρατεταμένης αποθήκευσης στις φυσιολογικές διεργασίες.

Για τη μελέτη της επίδρασης του χειρισμού στις φυσιολογικές διεργασίες επιλέχθηκαν τα ένζυμα β-αμυλάση και NAD^+ ισοκιτρική αφυδρογονάση, ώστε να προσεγγιστεί η επίδραση της επιταχυνόμενης γήρανσης τόσο στην αναπνοή όσο και στην αποδόμηση του αμύλου που παρέχει δομικές μονάδες και ενέργεια για την ανάδυση των φυταρίων.

4.1. Επίδραση στη βλαστικότητα και ζωτικότητα των σπερμάτων

Στις συνθήκες του πειράματος αυτού (40°C), παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση της βλαστικότητας των σπερμάτων που ήταν αυξήθηκε με το χρόνο παραμονής 40°C . Η βλαστικότητα μειώθηκε από 92,3% στο μάρτυρα, στο 73,5% στη μεταχείριση 5 ημερών στους 40°C . Επίδραση όμως υπήρξε και στη ζωτικότητα των νέων φυταρίων όπως φαίνεται από τη δραστικότητα της ισοκιτρικής αφυδρογονάσης και την καθυστέρηση της ανάπτυξής των φυταρίων των μεταχειρίσεων 4d και 5d στους 40°C , κατά μία τουλάχιστον ημέρα.

4.2. Η NAD^+ ισοκιτρική αφυδρογονάση

Η δραστικότητα της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης μελετήθηκε μόνο στις κοτυληδόνες. Βρέθηκε να κυμαίνεται από 2,69 έως 0,26 nM $\text{NADH}/\text{min}\cdot\text{mg}$ πρωτεΐνης. Σε πείραμα με απομονωμένα μιτοχόνδρια εκ χλωρωτικών φυτών μπιζελιού (McIntosh and Oliver 1992) η δραστικότητα βρέθηκε 17,4 nM/mg καθορισθέντος ενζύμου. Στον καπνό, όπου είχε προηγηθεί χειρισμός με μειωμένη ποσότητα αζώτου από την αναγκαία, βρέθηκε δραστικότητα του ενζύμου από 1,91-2,05 $\mu\text{mol}/\text{h}/\text{mg}$ πρωτεΐνης (Lancien et al., 1999). Επίσης, στην πατάτα, οι Tezuka and Laties (1983) μέτρησαν δραστικότητα 1,20nM/mg πρωτεΐνης/min. Στο *Arabidopsis thaliana* όμως, η δραστικότητα του ενζύμου βρέθηκε 14,4 pmol $\text{NADH}/\text{min}\cdot\text{mg}$ πρωτεΐνης (Lemaitre et al., 2007). Το εύρος λοιπόν των τιμών που προσδιορίστηκε είναι κοντά στις τιμές που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Η δραστηριότητα της NAD^+ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης μειώθηκε όσο αυξάνεται ο χρόνος που τα σπέρματα παραμένουν στους 40°C . Οι μέσοι όροι της δραστηριότητας ήταν: 2,69; 1,48; 1,16; 0,32; 0,41; 0,26 nM NADH/min*mg για τις μεταχειρίσεις μάρτυρας, 1,2,3,4,5d στους 40°C αντίστοιχα. Δεν βρέθηκαν στη βιβλιογραφία πειράματα σχετικά με την επίδραση της καταπόνησης από υψηλές (αλλά ούτε και για χαμηλές) θερμοκρασίες, στην NAD^+ -IDH. Παρόλα αυτά, πειράματα με επίδραση άλλων αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης στα φυτά έδειξαν, για την επίδραση στη δραστηριότητα της NAD^+ IDH, τα εξής:

Τροφοπενία σιδήρου: Μείωση δραστηριότητας 11% (Oexle et al., 1999).

Έλλειψη γλυκόζης από το θρεπτικό διάλυμα: Μείωση δραστηριότητας 8% (Morkunas et al., 2002).

Τροφοπενία αζώτου: Μειωμένο mRNA για την NAD^+ IDH και πτώση της δραστηριότητας 5% στα φύλλα καπνού (Lancien et al., 1999).

Συνθήκες υποξίας: Σημαντική μείωση δραστηριότητας που συνδέεται με μείωση συνολικά της δραστηριότητας του συστήματος του κύκλου των τρικαρβονικών οξέων (Igamberdiev and Hill 2009).

Αντίστοιχα αποτελέσματα με την NAD^+ -IDH βρέθηκαν και για τη μηλική αφυδρογονάση στο παρόν πείραμα, γεγονός που καταδεικνύει ότι κάτω από την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών στα σπέρματα πιθανόν λαμβάνει χώρα μείωση της δραστηριότητας των μιτοχονδρίων που σχετίζεται με δομικές διαφοροποιήσεις σε αυτά. Πράγματι, οι Pareek et al., (1997) αναφέρουν ότι με επίδραση υψηλών θερμοκρασιών στο ρύζι, τα μιτοχόνδρια παρουσιάζουν διαστολή των cristae και αύξηση του περιεχομένου τους. Αυτές οι διαφοροποιήσεις στη δομή των μιτοχονδρίων του ρυζιού όσο και του καπνού (Kandasami and Kristen 1989), αποδίδονται στην αλλαγή της ενεργειακής κατάστασης των οργανιδίων και στην μειωμένη δυνατότητα παραγωγής ATP.

Αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου παρατηρήθηκε στην περίπτωση της αυξημένης αλατότητας, γεγονός που αποδίδεται στη συμμετοχή του ενζύμου στο μηχανισμό άμυνας απέναντι στα αυξημένα αμμωνιακά άλατα που παράγονται από πρωτεόλυση, μέσω του συστήματος της αφομοίωσης του αζώτου (Lutts et al., 1999; Skopelitis et al., 2006).

Όσον αφορά στον εντοπισμό του ενζύμου, οι Abiko et al., (2005) εντόπισαν την NAD⁺-ICD στις ρίζες ρυζιού, στον κεντρικό κύλινδρο, στο ακραίο μερίστωμα και στα κύτταρα της επιδερμίδας. Στο παρόν πείραμα, στις ρίζες, τα ευρήματα ταυτίζονται με τη βιβλιογραφία. Το ένζυμο εντοπίστηκε επίσης στον κεντρικό κύλινδρο, στην επιδερμίδα και σε μικρότερο βαθμό στα παρεγχυματικά κύτταρα.

Στα υποκοτύλια, το ένζυμο εντοπίζεται στον κεντρικό κύλινδρο και στις εξωτερικές στοιβάδες του φλοιώδους παρεγχύματος. Στις κοτύλες, εντοπίζεται παντού αλλά το σήμα είναι εντονότερο στην περιοχή των ηθμαγγειωδών δεσμίδων.

Τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού του ενζύμου καταδεικνύουν ιστούς στους οποίους παρουσιάζεται έντονη αναπνευστική δραστηριότητα. Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, ο κεντρικός κύλινδρος της ρίζας και οι αναπτυσσόμενες κοτύλες είναι περιοχές που παρατηρείται αυτή η έντονη αναπνευστική δραστηριότητα. Αντίστοιχα αποτελέσματα που προέκυψαν από μελέτη των ενζύμων της αναπνευστικής δραστηριότητας αναφέρονται και από το Mc Farlane (1995). Επίσης, αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα υπάρχει και στο φλοιώδες παρέγχυμα λόγω της παραγωγής κολλεγχύματος από αυτό (Temsah et al., 2008).

4.3. Η β-αμυλάση

Σύμφωνα με τους Swanston and Molina-Cano (2001), κατά το σχηματισμό των σπερμάτων κριθαριού, παρατηρείται συσσώρευση της β-αμυλάσης, η οποία παραμένει ενεργή και δεν αποδομείται άμεσα.

Η επίδραση της θερμοκρασιακής καταπόνησης έχει δειχθεί ότι οδηγεί στην επαγωγή της μεταγραφής και/ή στην αύξηση της δραστηριότητας της β-αμυλάσης (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999; Thomashow 2002; Jung et al., 2003; Seki et al., 2001). Αυτή η αύξηση συνδέθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης της μαλτόζης (Karlan and Guy 2004; Nielsen 1997). Η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου ακολουθείται από αύξηση της συσσώρευσης μαλτόζης (Nielsen et al., 1997) . Δεδομένης της γρήγορης συσσώρευσης, προτάθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης μαλτόζης αλλά και της φρουκτόζης και της γλυκόζης σε θερμοκρασιακής καταπόνησης, πιθανόν να βοηθά στην προστασία της

φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο στρώμα των χλωροπλαστών (Karlan and Guy 2005; Karlan *et al.*, 2006).

Στη μελέτη αυτή μετρήθηκε η δραστικότητα σε νεαρά φυτά, όχι στα σπέρματα, είναι ασφαλές να υποθέσουμε, σύμφωνα με το παραπάνω, ότι μεγάλο μέρος της δραστικότητας αυτής πιθανόν να οφείλεται στη συσσώρευση του ενζύμου κατά τη διάρκεια της θερμικής καταπόνησης.

Άμυλο εντοπίστηκε με διάλυμα KI-I (**Εικόνες 21,22,23**), μόνο στα ριζίδια και στα υποκοτύλια, ενώ στις κοτύλες δεν βρέθηκε άμυλο (Εικ. 23). Παρόλα αυτά στις κοτύλες υπήρχε σημαντική δραστικότητα της β-αμυλάσης. Οι Longe *et al.*, (1983) αναφέρουν ότι στα σπέρματα της κολοκυθιάς που περιέχουν μεγάλη συγκέντρωση λίπους που φτάνει μέχρι και το 40% του νωπού τους βάρους (αντίστοιχα το βαμβάκι παράγει σπέρματα με μεγάλη περιεκτικότητα σε λίπος), κατά τη διάρκεια της βλάστησης τα λίπη μετατρέπονται σε υδατάνθρακες μέσω της διαδικασίας της νεογλυκογένεσης. Η παρουσία της β-αμυλάσης στις κοτύλες πιθανόν να σχετίζεται με την υδρόλυση αμυλοπηκτίνης που πιθανόν συντίθεται στα όργανα αυτά.

		
<p>Εικόνα 21: Εγκάρσιες τομές και εντοπισμός αμύλου σε ρίζες βαμβακιού, με σκούρο χρώμα χρωματίζονται οι περιοχές που υπάρχει άμυλο. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει ύπαρξη αμυλοπηκτίνης.</p>	<p>Εικόνα 22: Εγκάρσιες τομές και εντοπισμός αμύλου σε υποκοτύλια βαμβακιού, με σκούρο χρώμα χρωματίζονται οι περιοχές που υπάρχει άμυλο. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει ύπαρξη αμυλοπηκτίνης.</p>	<p>Εικόνα 23: Εγκάρσιες τομές και εντοπισμός αμύλου σε κοτύλες βαμβακιού, δεν ανιχνευτεί άμυλο στη περιοχή αυτή. Το κόκκινο χρώμα υποδηλώνει ύπαρξη αμυλοπηκτίνης.</p>

Οι τιμές της δραστικότητας της β-αμυλάσης στο πείραμα, κυμάνθηκαν από 6,6 έως 87,7 nM/min*mg πρωτεΐνης. Οι τιμές διαφοροποιούνται σημαντικά ανάλογα με το μελετώμενο ιστό. Στα υποκοτύλια παρατηρήθηκε σημαντικά μεγαλύτερη δραστικότητα ενώ στις κοτυληδόνες, η μικρότερη αν και οι διαφορές

με τις ρίζες ήταν μικρές. Στον αραβόσιτος (Lauriere et al., 1992), η δραστικότητα της καθαρισμένης β-αμυλάσης μετρήθηκε περίπου στα 4,4 μM/min p-νιτροφαινόλης στους 30°C σε pH 6. Επίσης σε αρτίβλαστα κριθαριού η δραστικότητα του καθαρισμένου ενζύμου βρέθηκε γύρω στα 9,8 μM/min (Sorapanen and Lauriere 1989). Στο *Arabidopsis thaliana*, η δραστικότητα της β-αμυλάσης μετρήθηκε περίπου 36 μM/min*mg (Sparla et al., 2006). Το εύρος τιμών στο πείραμα μας, είναι εντός των τιμών που αναφέρεται από τους Sparla et al. (2006).

Στο πείραμα παρατηρήθηκε αύξηση της δραστικότητας της β-αμυλάσης μετά την επίδραση υψηλών θερμοκρασιών, στα υποκοτύλια και στις κοτύλες μετά την 1^η ημέρα στους 40°C και στις ρίζες μετά την 3^η ημέρα και στους τρεις ιστούς η αύξηση της δραστικότητας ήταν σημαντική. Τα ευρήματα είναι σε αντιστοιχία με αυτά των Karlan and Guy (2004) και των Dreier et al., (1995) που αναφέρουν οι μεν πρώτοι σημαντική αύξηση στην δραστικότητα του ενζύμου στους 40°C στο *Arabidopsis thaliana*, ενώ οι δεύτεροι αύξηση στο κριθάρι της δραστικότητας στους 35°C. Σύμφωνα με τους Karlan et al., (2006) η αύξηση στη δραστικότητα του ενζύμου οδηγεί στην αύξηση της μαλτόζης η οποία προστατεύει τις πρωτεΐνες, τις μεμβράνες και την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων της φωτοσύνθεσης απέναντι στις επιδράσεις των αβιοτικών παραγόντων καταπόνησης.

Η β-αμυλάση σε αντιστοιχία με τα προηγούμενα αυξάνεται σε καταστάσεις καταπόνησης, αυτό έχει βρεθεί και στις παρακάτω περιπτώσεις:

Επίδραση καταπόνησης έλλειψης νερού στο αγγούρι: Αύξηση 6 φορές στη δραστικότητα (Todaka et al., 2000).

Επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών στη πατάτα: αύξηση στη δραστικότητα από 16 mU(gFW)⁻¹ σε κονδύλους που δεν αποθηκεύτηκαν στους 3°C σε 56 mU(gFW)⁻¹ σε κονδύλους που αποθηκεύτηκαν στους 3°C για 10 ημέρες (Nielsen et al., 1997).

Η επίδραση αρσενικού σε συγκεντρώσεις της τάξης του 1mg/l οδηγεί σε αύξηση της δραστικότητας έως 4%, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρήθηκε μείωση που φτάνει το 49% σε συγκεντρώσεις της τάξης των 16mg/l (Liu et al., 2005).

Σε αντίθεση με την α-αμυλάση που παράγεται κατά την εκβλάστηση, η β-αμυλάση φαίνεται πως παράγεται κατά τον σχηματισμό του σπέρματος (Kreis and Shewry 1994 από Schmitt and Marinac 2008).

Η β-αμυλάση εντοπίστηκε στη ρίζα, έδωσε ομοιόμορφο σήμα σε όλα τα κύτταρα (καλύπτρα και ζώνη επιμήκυνσης), το γεγονός είναι αναμενόμενο αφού στη ρίζα υπάρχει έντονη δραστικότητα και αύξηση των κυττάρων που οδηγεί σε ανάγκη για διάσπαση του αμύλου. Στις κοτυληδόνες, ισχυρότερο σήμα υπήρξε στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Το εύρημα αυτό συνάδει με αυτά των Wang et al., (1995), που αναφέρουν ότι στο *Arabidopsis thaliana*, υπάρχει δραστικότητα του ενζύμου στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, λόγω των απαιτήσεων από αυτές για ενέργεια. Μάλιστα οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν πως ο τύπος της β-αμυλάσης που απαντά στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες είναι συγκεκριμένος και διαφορετικός από τους ήδη γνωστούς τύπους του ενζύμου. Στα υποκοτύλια το ένζυμο δίνει ισχυρότερο σήμα στη εξώτερη στοιβάδα του κεντρικού κυλίνδρου καθώς και στην περιοχή της επιδερμίδας. Οι περιοχές αυτές ταυτίζονται με τις ζώνες μεταφοράς καθώς και με τις περιοχές με την μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα.

4.4. Συμπεράσματα

- 1) Υπάρχει επίδραση της θερμοκρασίας 40°C στη βλαστικότητα και ιδίως στη ζωτικότητα των σπερμάτων.
- 2) Η β-αμυλάση και η ισοκιτρική αφυδρογονάση ανιχνεύθηκαν σε όλους τους ιστούς που εξετάστηκαν, με διαφορετική όμως ένταση σήματος στους διάφορους ιστούς.
- 3) Ο εντοπισμός και των δύο ενζύμων είναι πιο έντονος στις περιοχές με μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα.
- 4) Η δραστικότητα της β-αμυλάσης παρουσιάζει αύξηση στις μεταχειρίσεις (40°C) σε σχέση με το μάρτυρα, το γεγονός πιθανόν να συνδέεται με σύνθεση του ενζύμου κατά τη διάρκεια της καταπόνησης των σπερμάτων.
- 5) Η δραστικότητα της NAD⁺ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης παρουσιάζει σημαντική μείωση από την πρώτη κιάλας ημέρα. Οι υψηλές θερμοκρασίες επιδρούν είναι πιθανόν επί των μιτοχονδρίων προκαλώντας βλάβες σε αυτά.
- 6) Η μειωμένη ζωτικότητα φαίνεται ότι σχετίζεται με επίδραση στο μεταβολισμό και μείωση της δραστηριότητας των μιτοχονδρίων όπως προκύπτει από τη μείωση στη δραστικότητα τόσο της NAD⁺ ισοκιτρικής αφυδρογονάσης, όσο και της μηλικής αφυδρογονάσης.

5. Βιβλιογραφία

- Abiko T, Obara M, Ushioda A, Hayakawa T, Hodges M, Yamaya T** (2005) Localization of NAD-Isocitrate Dehydrogenase and Glutamate Dehydrogenase in Rice Roots: Candidates for Providing Carbon Skeletons to NADH-Glutamate. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1724–1734
- Avigad G, Dey M** (1997) *Plant Biochemistry*, Academic Press, London, New York, pp 143-203
- Baily C, Benamar A, Carbinov F, Come D** (1996). Changes in malondialdehyde content and superoxide dismutase catalase and glutathione reductase activities in sunflower as related to deterioration during accelerated aging. *Physiol. Plant.* **97**: 104–110
- Basra M, Rehman U, Iqbal S** (2000) Cotton Seed Deterioration: Assessment of some Physiological and Biochemical Aspects *Int. J. Agri. Biol.* **2**: 195-198
- Baunsgaard L, Lütken H, Mikkelsen R, Glaring MA, Pham TT, Blennow A** (2005) A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis*. *Plant J.* **41**: 595-605
- Beck E, Ziegler P** (1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **40**: 95-117
- Behal RH, Oliver DJ** (1998) NAD⁺dependent isocitrate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. Characterization of two closely related subunits. *Plant Molecular Biology* **36**: 691–698
- Bewley J, Black M** (1994). *Seeds: Physiology of Development and Germination*, 2nd ed. (New York: Plenum) pp 112
- Blennow A, Engelsen SB, Munck L, Møller BL** (2000) Starch molecular structure and phosphorylation investigated by a combined chromatographic and chemometric approach. *Carbohydr. Polymers* **41**: 163-174.
- Blennow A, Engelsen SB, Nielsen TH, Baunsgaard L, Mikkelsen R** (2002) Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends Plant Sci.* **7**: 445-450
- Brubaker C, Bourland F, Wendel J** (1999) The origin and domestication of cotton. In *Cotton: Origin, History, Technology, and Production*, C Smith, J Cothren, eds. John Wiley and Sons, Inc., New York, pp 3-31
- Brubaker C, Wendel J** (1994). Reevaluating the origin of domesticated cotton (*Gossypium hirsutum*; Malvaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Am. J. Botany* **81**: 1309-1326.
- Bureau D, Lauriere C, Mayer C, Sadowski J, Daussant J** (1989) Post-translational modifications of f3-amylases during germination of wheat and rye seeds. *J. Plant Physiol.* **134**: 678-684
- Caspar T, Lin TP, Kakefuda G, Benbow L, Preiss J, Somerville C** (1991) Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiol.* **95**: 1181-88

- Chen F, Bradford K** (2000). Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol.* **124**: 1265–1274
- Chen R-D, Gadal P** (1990) Do mitochondria provide the 2-oxoglutarate needed for glutamate synthesis in higher plant chloroplasts? *Plant Physiol. Biochem.* **28**: 141-145
- Christiansen M, Moore R** (1959). Seed coat structural differences that influence water uptake and seed quality in hard seed cotton. *Agron. J.* **51**: 582-584
- Christiansen MN , Rowland R.** (1981) Beltwide Cotton Prod. Res. Conf., New Orleans, LA. 4–8 Jan. 1981. Natl. Cotton Counc. Am., Memphis, TN. Cotton physiology. *Seed and germination.* **3**: 315–318
- Cole DF, Christiansen MN** (1975) Effect of Chilling Duration on Germination of Cottonseed. *Crop Sci.* **15**: 410-412
- Das G, Sen-Mandi S** (1992) Scutellar amylase activity in naturally aged and accelerated aged wheat seeds. *Ann. of Botany* **69**: 497-501
- Datta R, Selvi MT, Seetharama N, Sharma R** (1999) Stress-mediated enhancement of beta-amylase activity in pearl millet and maize leaves is dependent on light. *J. Plant Physiol.* **154**: 657–664
- Daussant J, Lauriere C** (1990) Detection and partial characterization of two antigenically distinct f-amylases in developing kernels of wheat. *Planta* **181**: 505-511
- Daussant J, Sadowski J, Rorat T, Mayer C, Lauriere C** (1991) Independent regulatory aspects and posttranslational modifications of two fl-amylases of rye. *Plant Physiol.* **96**: 84-90
- Debeaujon I, Leon-Kloosterziel KM, Koornneef M** (2000) Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **122**: 403–414
- Demchenko NP** (1989) Changes in DNA content in the cells of phloem complex of the wheat root during their development. *Tsitologiya* **31**: 664–676
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B** (1993) Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**: 71–84
- Downie AB, Zhang D, Dirk LM, Thacker RR, Pfeiffer JA, Drake JL, Levy AA, Butterfield DA, Buxton JW, Snyder JC** (2003) Communication between the maternal testa and the embryo and/or endosperm affect testa attributes in tomato. *Plant Physiol.* **133**: 145–160
- Dreier W, Schnarrenberger C, Borner T** (1995) Light- and stress-dependent enhancement of amylolytic activities in white and green barley leaves: beta-amylases are stress-induced proteins. *J. Plant Physiol.* **145**: 342–348
- Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, Graham IA** (2000) Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 5669–5674

- Endrizzi, JE, Turcotte, EL, Kohel, R** (1985) Genetics, cytology and evolution of *Gossypium*. *Advances in Genetics* **23**: 271-375
- Esau K, Gill RH** (1973) Correlation in differentiation of protophloem sieve elements of *Allium cepa* root. *J. Ultrastruct Res.* **44**: 310-328
- Falk KL, Behal RH, Xiang C, Oliver DJ** (1998) Metabolic Bypass of the Tricarboxylic Acid Cycle during Lipid Mobilization in Germinating Oilseeds. Regulation of NAD⁺-Dependent Isocitrate Dehydrogenase Versus Fumarase. *Plant Physiol.* **117**: 473-481
- Footitt S, Slocombe SP, Lerner V, Kurup S, Wu Y, Larson T, Graham I, Baker A, Holdsworth M** (2002) Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human *Aldp*. *Embo. J.* **21**: 2912-2922
- Foreign Agricultural Service (FAS) United States Department of Agriculture** (2008) World Markets and Trade Monthly Circular; <http://www.fas.usda.gov/>
- Fulda M, Schnurr J, Abbadi A, Heinz E, and Browse J** (2004) Peroxisomal Acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* **16**: 394-405
- Galvez S, Lancien M, Hodges M** (1999) Are isocitrate dehydrogenases and 2-oxoglutarate involved in the regulation of glutamate synthesis? *Trends in plant science* **4** : 1360-1385
- Germain V, Rylott EL, Larson TR, Sherson SM, Bechtold N, Carde JP, Bryce JH, Graham IA, Smith SM** (2001) Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of Arabidopsis seedlings. *Plant J.* **28**: 1-12
- Gibon Y, Blasing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JHM, Fisahn J, Hohne M, Gunther M, Stitt M** (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophosphorylase in the following light period. *Plant J.* **39**: 847-862
- Gomez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons MK, Ho TH** (2001) Gibberellin/abscisic acid antagonism in barley aleurone cells: Site of action of the protein kinase PKABA1 in relation to gibberellin signaling molecules. *Plant Cell* **13**: 667-679
- Gregory SR, Hernandez E, Savoy BR** (1999) Cottonseed processing. Chapter 4.5. In: CW Smith, JT Cothren, eds. Cotton: Origin, History, Technology and Production. John Wiley & Sons, New York. pp 793-819
- Grilli I, Bacci E, Lombardi T, Spano C, Floris C,** (1995) Natural Aging: Poly (A) polymerase in germination embryos of *Triticum* durum wheat. *Ann.of Botany* **76**: 15-21
- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, Jacobsen JV** (1995) Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: Evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* **7**: 1879-1891

- Gubler F, Chandler PM, White RG, Llewellyn DJ, Jacobsen JV** (2002) Gibberellin signalling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.* **129**: 191–200
- Harrington, JF** (1972) Seed storage and longevity. In: *Seed Biology*. Kozlowski, T.T. (ed.), Academic Press, New York. pp 145-148
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA** (2000) Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science* **290**: 2110–2113
- Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, Nishimura M** (1998) 2,4- Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of *Arabidopsis* have defects in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Cell* **10**: 183–195
- Heldt HW** (1991). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University press. pp. 137
- Hendrix DL, Grange RI** (1991) Carbon partitioning and export from mature cotton leaves. *Plant Physiol.* **95**: 228–233
- Hill SA, Grof CPL, Bryce JH, Leaver CJ** (1992) Regulation of mitochondrial function and biogenesis in cucumber cotyledons during early seedling growth. *Plant Physiol.* **99**: 60–66
- Hodges M, Flesch V, Galvez S, Bismuth E** (2003) Higher plant NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases, ammonium assimilation and NADPH production. *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 577–585
- Hoffpauir CL, Poe SE, Wiles LU, Hicks M** (1950) Germination and free fatty acids in seed stock lots of cottonseed. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **27**: 347-8
- Hopkins WG** (1995). *Introduction to plant physiology*. John Wiley and sons, INC. pp. 245
- Igamberdiev AU, Hill RD** (2009) REVIEW: Plant mitochondrial function during anaerobiosis *Annals of Botany* **103**: 259–268
- Ishiyama K, Inoue E, Tabuchi M, Yamaya T, Takahashi H** (2004) Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant Cell Physiol.* **45**: 1640–1647
- Iqbal MJ, Reddy OUK, El Zik KM, Pepper AE** (2001) A genetic bottleneck in the evolution under domestication' of upland cotton *Gossypium hirsutum* L. examined using DNA fingerprinting. *Theoretical and Applied Genetics* **103**: 547-554
- Jung SH, Lee JY, Lee DH** (2003) Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* leaves undergoing cold stress. *Plant Mol. Biol.* **52**: 553–567
- Igamberdiev AU, Gardestrom P** (2003) Regulation of NAD⁻ and NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* **1606**: 117–125
- Kandasami MK, Kristen U** (1989) Ultrastructural responses of tobacco pollen tubes to heat shock. *Protoplasma* **153**: 104-110

- Kaplan F, Guy CL** (2005) Beta-Amylase RNAi Lines Exhibit Increased Sensitivity Of Photosynthetic Electron Transport Chain To Freezing Stress. *Plant J.* **44**: 730-743
- Kaplan F, Sung SY, Guy CL** (2005) Roles of β -amylase and starch breakdown during temperatures stress *Physiologia Plantarum* **126**: 120-128
- Kerby TA, Johnson S, Hake KD** (1989) When to replant. Calif. Cotton Review. *Univ. of Calif. Cooperative Ext.* **9**: 7-8
- Kerby TA, Johnson S, Hake KD, Carter LM, Garber RH** (1996) Seed quality and planting environment. Division of Agricultural and Natural Resources, University of California
- Kornberg HL, Beevers H** (1957) A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature* **180**: 35–36
- Kossmann J, Lloyd J** (2000) Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**: 141-96
- Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G** (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiol.* **137**: 242-52
- Kreis M, Shewry PR** (1992) The control of protein synthesis in developing barley seeds. In: Shewry, P.R. (Ed.), *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. C.A.B. International, Wallingford, pp. 319–368
- Kruger JE** (1979) Modification of wheat f3-amylase by proteolytic enzymes. *Cereal Chem.* **56**: 298-302
- Laby RJ, Kim D, Gibson SI** (2001) The *ram1* mutant of *Arabidopsis* exhibits severely decreased b-amylase activity. *Plant Physiol.* **127**: 1798–1807
- Lancien M, Gadal P, Hodges M** (1998) Molecular characterization of higher plant NAD-dependent isocitrate dehydrogenase: evidence for a heteromeric structure by the complementation of yeast mutants. *The Plant Journal* **16**: 325–333
- Lancien M, Ferrario-Mery S, Roux Y, Bismuth E, Masclaux C, Hirel B, Gadal P, Hodges M** (1999) Simultaneous Expression of NAD-Dependent Isocitrate Dehydrogenase and Other Krebs Cycle Genes after Nitrate Resupply to Short-Term Nitrogen-Starved Tobacco. *Plant Physiol.* **120**: 717–725
- Lauriere C, Doyen C, Thevenot C, Daussant J** (1992) b-amylase in cereals: A Study of the Maize β -Amylase System *Plant Physiol.* **100**: 887–893
- Lea PG, Leegood RC** (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Wiley press. pp 223-225
- Lemaitre T, Hodges M** (2006) Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* NAD-dependent Isocitrate Dehydrogenase Genes Shows the Presence of a Functional Subunit That Is Mainly Expressed in the Pollen and Absent from Vegetative Organs. *Plant Cell Physiol.* **47**: 634–643

- Lemaitre T, Urbanczyk-Wochniak E, Flesch V, Bismuth E, Fernie AR, Hodges M** (2007) NAD-dependent isocitrate dehydrogenase mutants of Arabidopsis suggest the enzyme is not limiting for nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* **144**: 1546–1558
- Leubner-Metzger G, Frundt C, Vogeli-Lange R, Meins F Jr** (1995). Class I [beta]-1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol.* **109**: 751–759
- Leubner-Metzger G, Meins F Jr** (2000) Sense transformation reveals a novel role for class I beta-1,3-glucanase in tobacco seed germination. *Plant J.* **23**: 215–221
- Lin AP, McAlister-Henn L** (2003) Homologous binding sites in yeast isocitrate dehydrogenase for cofactor (NAD1) and allosteric activator (AMP). *J. Biol. Chem.* **278**: 12864–12872
- Lin M, Behal RH, Oliver DJ** (2004) Characterization of a mutation in the IDH-II subunit of the NAD1-dependent isocitrate dehydrogenase from Arabidopsis thaliana. *Plant Sci.* **166**: 983–988
- Liveslay M, Bray C** (1991) The effect of aging upon a-amylase production and protein synthesis by wheat aleurone layers. *Ann. of Botany* **68**: 69-73
- Liu X, Zhang S, Shan X, Zhu YG** (2005) Toxicity of arsenate and arsenite on germination, seedling growth and amyolytic activity of wheat. *Chemosphere* **61**: 293-301
- Longe G, Farinu G, Fetuga LB** (1983) Nutritional value of the fluted pumpkin (*Telfaria occidentalis*). *J. Agric. Food Chem.* **31**: 989-992.
- Losch R** (2004) Plant mitochondrial respiration under the influence of Heavy Metals. Springer Publications pp 64-68
- Lu Y, Gehan JP, Sharkey TD** (2005) Day-length and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol.* **138**: 2280–2291
- Lundgard R, Svensson B** (1986) Limited proteolysis in the carboxy-terminal region of barley b-amylase. Carlsberg Research Communications **51**: 487-491
- Lutts S, Majerus V, Kinet JM** (1999) NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiologia Plantarum* **105**: 450–458
- Martin C, Smith AM** (1995) Starch biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 971-985.
- Martínez-Rivas J, Vega J** (1998) Purification and Characterization of NAD-Isocitrate Dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii* *Plant Physiol.* **118**: 249-255
- Maqsood S, Basra A, Rehman KU, Iqbal S** (2000) Cotton Seed Deterioration: Assessment of some Physiological and Biochemical Aspects. *International Journal of Agriculture & Biology* **1560**: 195–198
- Maselli S, Perez-Garcia F, Aguinagalde I** (1999) Evaluation of Seed Storage Conditions and Genetic Diversity of Four Crucifers Endemic to Spain *Annals of Botany* **84**: 207–212

- McCluskey J, Herdman L, Skene KR** (2004) Iron deficiency induces changes in metabolism of citrate in lateral roots and cluster roots of *Lupinus albus*. *Physiologia Plantarum* **121**: 586–594
- McFarlane JC** (1995) Anatomy and Physiology of plant conductive systems. CRC Press Inc. pp 30-33
- McIntosh CA** (1997) Partial purification and characteristics of membrane-associated NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase activity from etiolated pea mitochondria. *Plant Science* **129**: 9-20
- McIntosh CA, Oliver DJ** (1992) NAD⁺-Linked Isocitrate Dehydrogenase: Isolation, Purification, and Characterization of the Protein from Pea Mitochondria. *Plant Physiol.* **100**: 69-75
- Mikkelsen R, Baunsgaard L, Blennow A** (2004) Functional characterisation of alpha-glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem. J.* **377**: 525-532.
- Millhouse J, Wiskich JT, Beevers H** (1983) Metabolite oxidation and transport in mitochondria of endosperm from germinating castor bean. *Aust. J. Plant. Physiol.* **10**: 167–177
- Morkunas I, Garnczarska M, Bednarski W, Ratajczak W, Waplak S** (2002) Metabolic and ultrastructural responses of lupine embryo axes to sugar starvation. *Journal of Plant Physiology* **160**: 311-319
- Moulherat C, Tengberg M, Haquet JF, Mille B** (2002) First evidence of cotton at neolithic Mehrgarh, Pakistan: Analysis of mineralized fibres from a copper bead. *Journal of Archaeological Science* **29**: 1393-1401.
- Nakazima R, Imanaka T, Aida S** (1986) Nucleotide sequence of the Bacillus stearothermophilus alpha-amylase gene. *Appl. Microbial. Biotechnol.* **23**: 355-360
- Nandi S, Gitali D, Sen-Mandi S** (1994) β -Amylase activity as an index for germination potential in rice. *Ann. of Botany* **75**: 463-467
- Neuhaus HE, Emes MJ** (2000) Non photosynthetic metabolism in plastids. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**: 111-140.
- Nichols BJ, Rigoulet M, Denton RM** (1994) Comparison of the effects of Ca²⁺, adenine nucleotides and pH on the kinetic properties of mitochondrial NAD(1)-isocitrate dehydrogenase and oxoglutarate dehydrogenase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and rat heart. *Biochem. J.* **303**: 461–465
- Nielsen TH, Deiting U, Stitt M** (1997) A P-Amylase in Potato Tubers 1s Induced by Storage at Low Temperature. *Plant Physiol.* **11**: 503-510
- Nielsen TH, Wischmann B, Enevoldsen K, Møller BL** (1994) Starch phosphorylation in potato tubers proceeds concurrently with de novo biosynthesis of starch. *Plant Physiol.* **105**: 111-117
- Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC** (2004) A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science.* **303**: 87-89

- Nonogaki H, Morohashi Y** (1996) An endo-[beta]-mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol.* **110**: 555–559
- Okamoto K, Akazawa T**, (1980) Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. *Plant Physiol.* **65**: 81–84
- Oexle H, Gnaiger E, Weiss G** (1999) Iron-dependent changes in cellular energy metabolism: influence on citric acid cycle and oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* **1413**: 99–107
- Pareek A, Singla SL, Grover A** (1997). Short term salinity and temperature stress associated ultrastructural alterations in young leaf cells of *Oriza Sativa* L. *Ann. of Botany* **80**: 629-639
- Parish DJ, Leopold AC** (1978) On the mechanism of aging in soybean seeds. *Plant Physiol.* **61**: 365–368
- Petruzzelli L, Taranto G** (1990) Amylase activity and loss of viability in wheat. *Ann. of Botany* **66**: 375-380
- Rajjou L, Debeaujon I** (2008) Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. *C. R. Biologies* **331**: 796–805
- Rathinavel K, Dharmalingam C** (2001) Efficacy of seed treatment on storability of cotton seeds and seedling vigor. *Journal of Tropical Agriculture* **39**: 128-133
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M** (2002) The starch-related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 7166-7171
- Rochalska M, Grabowska K** (2007) Influence of magnetic fields on the activity of enzymes: α - and β -amylase and glutathione S-transferase (GST) in wheat plants *Int. Agrophysics* **21**: 185-188
- Rylott EL, Gilday AD, Graham IA** (2003) The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Arabidopsis* is essential for seedling establishment. *Plant Physiol.* **131**: 1834–1842
- Scheidig A, Frolich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J** (2002) Down regulation of a chloroplast-targeted alpha-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J.* **30**: 581-591
- Schmitt M, Marinac L** (2008) Beta-amylase degradation by serine endoproteinases from green barley malt. *Journal of Cereal Science* **47**: 480–488
- Scopes R** (1987) Proteine purification Second Edition. Springer-Verlag. pp 112-114
- Sean EW, Weber APM, Sharkey TD** (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* **218**: 474–482
- Seelanan T, Schnabel A, Wendel JF** (1997) Congruence and consensus in the cotton tribe (Malvaceae). *Systematic Botany* **22**: 259-290

- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell* **13**: 61–72
- Shatters RG Jr., Abdelghany A, Elbagoury O, West SH** (1994). Soybean seed deterioration and response to osmotic priming: changes in specific enzyme activities in extracts from dry and germinating seeds. *Seed Sci. Res.* **4**: 33–41
- Shewry PR, Parmar S, Buxton B, Gale MD, Liu CJ, Hejgaard J, Kreis M** (1988) Multiple molecular forms of β -amylase in seeds and vegetative tissues of barley. *Planta* **176**: 127–134
- Shinke R, Mikami B, Morita Y, Takeda, Y**, (1988) Plant β -amylases. In: The Amylase Research Society of Japan (Ed.), Handbook of Amylases and Related Enzymes. Pergamon, Oxford. pp 211–213
- Sitrit Y, Hadfield KA, Bennett AB, Bradford KJ, Downie AB** (1999) Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. *Plant Physiol.* **121**: 419–428
- Skopelitis D, Paranychanakis N, Paschalidis K, Pliakonis E, Delis I, Yakoumakis D, Kouvarakis A, Papadakis A, Stephanou E, Roubelakis-Angelakis K** (2006) Abiotic Stress Generates ROS That Signal Expression of Anionic Glutamate Dehydrogenases to Form Glutamate for Proline Synthesis in Tobacco and Grapevine *The Plant Cell* **18**: 2767–2781
- Smith CE Jr, MacNeish RS** (1964) Antiquity of American Polyploid Cotton. *Science* **143**: 675–676
- Smith CW** (1995) Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Chapter 6. In: Crop Production: Evolution, History, and Technology. John Wiley and Sons, Inc., New York. pp 287–349
- Smith AM, Denyer K** (1992) Starch synthesis in developing pea embryos. *New Phytol.* **122**: 21–23
- Smith SM, Fulton DC, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Sparla F, Zaffagnini M, Wedel N, Scheibe R, Pupillo P, Trost P** (2005) Regulation of Photosynthetic GAPDH Dissected by Mutants *Plant Physiol.* **10**: 105–107
- Smith SM** (2002) Does the glyoxylate cycle have an anaplerotic function in plants. *Trends Plant Sci.* **7**: 12–13
- Sopanen T, Lauriere C** (1989) Release and activity of bound β -amylase in a germinating barley grain. *Plant Physiol.* **89**: 244–249
- Sparla F, Costa A, Schiavo FL, Pupillo P, Trost P** (2006) Redox Regulation of a Novel Plastid-Targeted β -Amylase of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **141**: 840–850
- Stephens SG, Moseley ME** (1973). Cotton remains from archeological sites in central Coastal Peru. *Science* **180**: 186–188
- Steup M, Robenek H, Melkonian M** (1983) In-vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts. *Planta* **158**: 28–36

- Stewart JM** (1995) Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering. Constable, G. A. and Forrester, N. W. eds, CSIRO, Melbourne. pp. 313-327
- Stryer L** (1988) Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, pp. 21-23
- Sun Z, Duke SH, Henson CA** (1995) The role of pea chloroplast alpha-glucosidase in transitory starch degradation. *Plant Physiol.* **108**: 211-17
- Sung DY** (2001) Characterization of Arabidopsis heat shock protein 70 (Hsp70) gene family and microarray analysis of gene expression in response to temperature extremes. PhD thesis. University of Florida, Gainesville, FL pp 156-158
- Swanston JS, Molina-Cano JL** (2001) Beta-Amylase Activity and Thermostability in Two Mutants Derived from the Malting Barley cv. Triumph. *Journal of Cereal Science* **33**:155–161
- Tanaka N, Kajimoto S, Mitani D, Kunugi S** (2002) Effects of guanidine hydrochloride and high pressure on substrate flexibility of α -amylase. *Acta Biochimica and Biophysica* **1596**: 318-325
- Tappel A** (1973) Lipid peroxidation damage to cell components. *Federation Proc.* **32**: 1870-1874
- Taylor A, Hu G, Hart J, McAllister-Henn L** (2008) Allosteric Motions in Structures of Yeast NAD⁺-specific Isocitrate Dehydrogenase *Journal of Biological Chemistry* **283**: 10872
- Temsah M, Hanna L, Saad AT** (2008). Anatomical pathogenesis of *Pseudomonas Savastanoi* on olive and genesis of knots. *Journal of Plant Pathol.* **90**: 225-232
- Tezuka T, Laties G** (1983) Isolation and Characterization of Inner Membrane-Associated and Matrix NAD-Specific Isocitrate Dehydrogenase in Potato Mitochondria. *Plant Physiol.* **72**: 959-963
- Thomashow LS, Bonsall RF, Weller DM** (2002) Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. *Manual of Environmental Microbiology* pp 636-647
- Τόλης Ι** (1986) Βαμβάκι. Εχθροί, ασθένειες, ζιζάνια. Αθήνα pp 10-14
- Todaka D, Matsushima H, Morohashi Y** (2000) Water stress enhances β -amylase activity in cucumber cotyledons. *Journal of Experimental Botany* **51**: 739-745
- Trelease IRN, Becker WM, Bruber PJ, Newcomb EH** (1971) Microbodies (glyoxysomes and peroxisomes) in cucumber cotyledons. Correlative biochemical and ultrastructural study in light- and dark-grown seedlings. *Plant Physiol.* **48**: 461-475
- Trawatha SE, Tekrony DM, Hildebrand DF** (1995) Relationship of soybean quality to fatty acid and C6-aldehyde levels during storage. *Crop Sci.* **35**: 1415-1422
- USDA, NRCS.** (2009) The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 26 January 2009). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
- Yamasaki Y** (2003) α -Amylase in germinating millet seeds. *Phytochemistry* **64**: 935–939

- Wendel JF, Albert VA** (1992) Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium*): Character-State Weighted Parsimony Analysis of chloroplast DNA restriction sitedata and its systematic and biogeographic implications. *Systematic Botany* **17**: 115-143
- Yu S, Wang K, Li F, Kohel RJ, Percy RG, Yu J** (2008) Sequencing of the cultivated tetraploid cotton genome - *Gossypium hirsutum* In: Proceedings of the International Cotton Genome Initiative Workshop, July 8-11, 2008, Anyang, China. pp. 4-6.
- Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge UI et al** (2001) The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *The Plant Cell* **13**: 1907-1918
- Van der Maarel MJEC, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L** (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *J. Biotechn.* **94**: 137-155
- www.Wikipedia.org** (2009) Article: cotton
- Zeeman SC, Smith AM** (2004) Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **136**: 2687–2699
- Ziegler P** (1999) Cereal beta-amylases. *J. Cereal Sci.* **29**: 195–204
- Zolman BK, Silva ID, Bartel B** (2001) The *Arabidopsis* *pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Physiol.* **127**: 1266–1278
- Wang Q, Monroe J, Sjolund RD** (1995) Identification and Characterization of a Phloem-Specific [beta]-Amylase. *Plant Physiol.* **109**: 743-750
- Wischmann B, Nielsen TH, Møller BL** (1999) In vitro biosynthesis of phosphorylated starch in intact potato amyloplasts. *Plant Physiol.* **119**: 1-8
- Zeeman SC, Rees T** (1999) Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Env.* **22**: 1445-1453

