

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

«Ανοσοεντοπισμός και δραστικότητα της συνθάσης της
φωσφοροσακχαρόζης σε αρτίβλαστα βαμβακιού που αναπτύχθηκαν
σε 25⁰C και σε 13⁰C»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ
ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ
ΓΕΩΠΟΝΙΑ,
ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗ Γ. ΑΪΒΑΛΑΚΙ

ΠΑΠΑΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2010

**«Ανοσοεντοπισμός και δραστικότητα της συνθάσης της
φωσφοροσακχαρόζης σε αρτίβλαστα βαμβακιού που
αναπτύχθηκαν σε 25⁰C και σε 13 ⁰C»**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Αν. Καθηγητής, Γ. Αϊβαλάκις, Επιβλέπων

Καθηγητής, Δ. Μπουράνης, Μέλος

Καθηγητής, Κ. Φασσέας, Μέλος

**Η ανάθεση της παρούσας μελέτης
έγινε με απόφαση της υπ' αριθ.7 της
27/1/2009 Γενικής Συνέλευσης του
τμήματος Γεωπονικής
Βιοτεχνολογίας.**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση επίβλεψη του Αν. Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας. Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον Αν. Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και τη μεταφορά της εμπειρίας του.

Τα μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής Καθηγητές κ. Δ. Μπουράνη και κ. Κ. Φασσέα για τις πολύτιμες διορθώσεις που εισηγήθηκαν διαβάζοντας αυτήν την εργασία και την ουσιαστική συμβολή τους στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Το Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών για την παραχώρηση του εργαστηριακού εξοπλισμού και την άριστη συνεργασία μας και ιδιαίτερα το Δρ. Ι. Καραπάνο, τη Δρ. Μ. Νικολοπούλου, το Δρ. Α. Αλεξόπουλο και το Δρ. Π. Διαμαντόπουλο.

Τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μ. Θάνου, Κ. Σκαρμούτσο και Γ. Τσανικλίδη για την άψογη συνεργασία μας στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την ηθική συμπαράσταση, δίχως τη στήριξή τους δε θα μπορούσα να πραγματοποιήσω το στόχο μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT.....	6
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
1.1. Το βαμβάκι: το φυτό, ιστορικό, είδη και εξέλιξη.....	8
1.1.1. Είδη και Καταγωγή του βαμβακιού.....	8
1.1.2. Μορφολογία του είδους <i>Gossypium hirsutum</i> L.....	9
1.1.3. Εμπορικές χρήσεις, η καλλιέργεια στην Ελλάδα και στον κόσμο.....	10
1.2. Η σύσταση, η ανατομία και η βλάστηση των σπερμάτων του βαμβακιού.....	12
1.2.1. Η σύσταση των σπερμάτων.....	12
1.2.2. Η ανατομία των σπερμάτων.....	12
1.2.3 Η επίδραση της θερμοκρασίας στη βλάστηση των σπερμάτων και την αύξηση των φυτών.....	13
1.2.4. Η βλαστικότητα των σπερμάτων.....	14
1.3 Η σακχαρόζη.....	19
1.3.1 Η σημασία της σακχαρόζης στα φυτά.....	19
1.3.2 Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της σακχαρόζης.....	20
1.4 Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS).....	21
1.4.1 Δομή του ενζύμου.....	21
1.4.2 Εντοπισμός του ενζύμου.....	23
1.4.3 Σημασία του ενζύμου.....	23
1.4.4 Ρύθμιση του ενζύμου.....	24
1.4.4.1 Ρόλος της 2,6 διφώσφορο-φρουκτόζης.....	25
1.4.4.2 Ενδογενείς ρυθμοί.....	25
1.4.4.3 Εναλλαγές φωτός/σκότους.....	27
1.4.4.4 Ωσμωτική καταπόνηση.....	27
1.4.4.5 Καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών.....	29
1.4.4.6 Έλεγχος μέσω αντιστρεπτής πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης.....	31
1.4.4.7 Ενδείξεις για την παρουσία μεταβολογόνου SPS-SPP στη βιοσύνθεση της σακχαρόζης.....	33
1.5 Οικογένειες SPS γονιδίων στα φυτά.....	34
1.5.1 Έκφραση των γονιδίων της SPS.....	36
1.5.2. Το γονίδιο C θεωρείται το γονίδιο κλειδί για τη σύνθεση της σακχαρόζης τη νύχτα.....	37
ΣΚΟΠΟΣ.....	39
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	40
2.1 Η πειραματική διαδικασία.....	41
2.2 Βλάστηση σπερμάτων και έκθεση των φυταρίων στο ψύχος.....	41
2.3 Η εκχύλιση του ενζύμου.....	42
2.4 Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.....	43

2.5 Η μέτρηση της δραστικότητας της SPS.....	44
2.6 Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών.....	45
2.7 Η ανοσοβιοχημική μελέτη - Επεξεργασία των ιστών.....	48
2.8 Ο ανοσοεντοπισμός της SPS στις τομές.....	51
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	53
3. Η δραστικότητα της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης στα εκχυλίσματα οργάνων.....	54
3.1 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων.....	54
3.2 Ανοσοεντοπισμός της SPS.....	55
3.3 Ο προσδιορισμός της in vitro δραστικότητας της SPS.....	57
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	66

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BCIP: 5-βρωμο-3-χλωρο-ινδολυλο-φωσφορικό

BSA: Πρωτεΐνη ορού μόσχου

PVP: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη

SDS: Sodium dodecyl sulfate

SPS: Συνθάση της φωσφοροσακχαρόζης

SPP: Φωσφατάση της φωσφοροσακχαρόζης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η συνθάση της φωσφοροσακχαρόζης (SPS) σε αρτίβλαστα βαμβακιού μετά την έκθεση φυταρίων ηλικίας πέντε ημερών στους 13°C για χρονικό διάστημα μιας, τριών και πέντε ημερών. Η θερμοκρασία αυτή επιλέχθηκε επειδή η ανάπτυξη των φυταρίων του βαμβακιού από το έδαφος αναστέλλεται όταν οι θερμοκρασία του εδάφους είναι μικρότερη από 15°C.

Για τη μελέτη του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ο ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης και η εκτίμηση της δραστηριότητας του ενζύμου σε εκχυλίσματα ριζών, υποκοτυλίων και κοτυληδόνων των φυταρίων.

Η SPS εντοπίστηκε έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες σε όλα τα υπό μελέτη όργανα. Στη ρίζα, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε έντονα στην καλύπτρα και λιγότερο έντονα σε όλα τα κύτταρα του ακρορριζίου στο ύψος του σχηματισμού του ξύλου. Στο υποκοτύλιο εντοπίστηκε στο φλοιώδες παρέγχυμα και στα αγγεία του ξύλου με διαφορετική, όμως, ένταση σήματος. Στις κοτυληδόνες η ένταση του σήματος ήταν πιο έντονη στο πασσαλώδες και λιγότερο έντονο στο σπογγώδες παρέγχυμα.

Οι μετρήσεις στα δείγματα ρίζας, έδειξαν ότι την πρώτη ημέρα παραμονής στους 13°C, η συνθάση της φωσφοροσακχαρόζης εμφανίζει τριπλάσια αύξηση στη δραστηριότητάς της συγκριτικά με το μάρτυρα των 25°C. Την τρίτη ημέρα παρατηρείται μία ανεπαίσθητη μείωση της δραστηριότητας, ενώ, την πέμπτη ημέρα φαίνεται μία απότομη αύξηση σχεδόν τετραπλάσια από αυτή της τρίτης ημέρας.

Στο υποκοτύλιο, την πρώτη ημέρα, παρατηρείται μία ελαφριά μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου συγκριτικά με το μάρτυρα, αλλά την τρίτη ημέρα διπλασιάζεται και την πέμπτη ημέρα, παρουσιάζεται κατακόρυφη πτώση.

Στις κοτυληδόνες κατά την πρώτη ημέρα, η δραστηριότητα του ενζύμου υποδιπλασιάζεται συγκριτικά με το μάρτυρα, την τρίτη ημέρα φθάνει στο ίδιο επίπεδο με μάρτυρα, και συνεχίζει να παραμένει σταθερή και την πέμπτη ημέρα.

Τα αποτελέσματα αυτά συζητούνται.

ABSTRACT

The sucrose phosphate synthase (SPS) in cotton seedlings after exposure at low temperature was studied.

Five day old seedlings were grown at 13°C for one, three and five days. The chosen temperature, was well under the critical temperature of cotton seedlings emergence from the soil, which is around 16°C.

Immunolocalization and estimation of enzyme activity were measured in extracts of roots, hypocotyls and cotyledons of seedlings to study the enzyme.

SPS was found to be localized in vascular bundles of all organs studied. In root, the protein was detected strongly in the root cap and less intense in all cells of the root apex. In the hypocotyl, it was detected in cortical parenchyma and in xylem vessels, with different signal strength. In cotyledons, the signal was more intense in pallisade parenchyma than in spongy parenchyma.

The estimation of enzyme activity in root samples, showed that there was about a threefold increase after one day at 13°C compared to the control of 25°C. On the third day, there is a slight decrease in activity, while the fifth day seems a sharp increase of almost four times than that of the third day.

In the hypocotyl, the first day, there was a slight decrease of enzyme activity compared to the control, but the third day doubled, while the fifth day decreased sharply.

In the cotyledons in the first day, the enzyme activity was halved compared to the control, the third day reached the same level of the control and remained stable until the fifth day.

These results are discussed.



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

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. Το γένος περιλαμβάνει περίπου 50 είδη φυτών, από αυτά τα τέσσερα 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 barbadence* 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 τη 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 π.Χ. Μία βαμβακερή κλωστή βρέθηκε ότι είχε χρησιμοποιηθεί για να δεθούν χάλκινες σφαίρες στο Mehrgarh του Πακιστάν την 6^η χιλιετία π.Χ., αν και είναι άγνωστο αν η ίνα προέρχεται από καλλιεργούμενη ποικιλία (Moulherat *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 π.Χ., ενώ υπολείμματα από κάψες στο Περού τοποθετούν εκεί την έναρξη χρήσης καλλιεργούμενων ποικιλιών του είδους *Gossypium barbadence* L. Ευρήματα δείχνουν επίσης ότι

από το 2500 π.Χ. έως το 1000 π.Χ. 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 καλλιέργειά 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, 2002). 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 (Stewart, 1995). Τα είδη *Gossypium hirsutum* L. και *Gossypium barbadence* 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) (Wendel *et al.*, 1992; 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 ευδοκούν 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) ανήκει το αμερικάνικο βαμβάκι που είναι γνωστό 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 γκοσυπιόλη. Η ρίζα είναι

πασσαλώδης και αρχίζει να διακλαδίζεται όταν φτάσει σε μήκος τα 15cm δίνοντας πολλές δευτερεύουσες ρίζες και φτάνοντας σε βάθος τα 2m (Γαλανοπούλου και 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 μεσολαμβάνουν 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 και το χνούδι. Οι νηματοποιήσιμες επιμηκύνονται για 20 περίπου ημέρες μετά την άνθιση και μετά την 16^η ημέρα διογκώνονται. Το χνούδι (λίντα ή λίντερ) επιμηκύνεται 2-5 ημέρες μετά την άνθιση και παραμένει προσκολλημένο στο σπόρο (Γαλανοπούλου και Σενδουκά, 2002). Οι ποικιλίες του είδους αυτού 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).

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, χρησιμοποιείται για παραγωγή ζωοτροφών (γνωστό ως βαμβακόπιτα), μιας και το προϊόν αυτό περιέχει έως 41% πρωτεΐνη (Smith, 1995). 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), (**Εικ. 1**).



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

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).

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

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

1.2. Η σύσταση, η ανατομία 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:

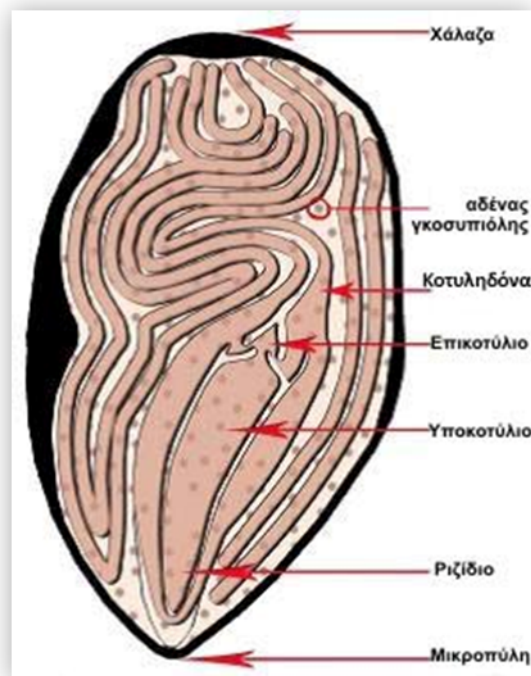
Πίνακας 2. Χημική σύσταση του σπόρου του βαμβακιού μετά την αφαίρεση της λίντας (ή λίντερ) (Kohel and Lewis 1984).

Ξηρά ουσία	90%
Ολική πρωτεΐνη	25,6%
Λιπαρά	23,6%
Ασβέστιο	0,12%
Φώσφορος	0,50%
Κάλιο	1,18%
Μαγνήσιο	0,41%
Μη ινώδεις υδατάνθρακες	9,4%
Ολικά σάκχαρα	6,8%
Τέφρα	4,4%
Ίνες διαφόρων ειδών	13,8%
Λυσίνη	3,2%
Ολική γκοσυπιόλη	0,99%

1.2.2. Η ανατομία των σπερμάτων.

Το σπέρμα του βαμβακιού περιέχει όλα τα απαραίτητα όργανα για την ανάδυση και ανάπτυξη του φυταρίου. Το σπέρμα είναι σφηνοειδές στο ένα άκρο (μικροπύλη) και στρογγυλοποιείται, από την άλλη (χάλαζα). Η άκρη της

πρωτογενούς ρίζας, ή ριζίδιο, τοποθετείται απέναντι από τη μικροπύλη, και οι πρόδρομοι του μίσχου και των κοτυληδόνων είναι εμφανή εντός του σπέρματος (Εικ. 2). Η χάλαζα είναι η κύρια περιοχή απορρόφησης του νερού και του οξυγόνου κατά τη διάρκεια της βλάστησης. Η άκρη του ριζιδίου, είναι το πρώτο μέρος του φυτού που αναδύεται μέσα από τη μικροπύλη. Οι κοτυληδόνες αναλαμβάνουν τη θρέψη του νέου σπορόφυτου και βρίσκονται διπλωμένες στο εσωτερικό του σπέρματος, με το υποκοτύλιο κάτω από αυτές που θα επιμηκυνθεί και θα ωθήσει το σπορόφυτο προς την επιφάνεια του εδάφους. Οι αδένες γκοσσυπιόλης είναι ορατοί σε όλο το εσωτερικό του σπέρματος, αλλά και στους ιστούς των αρτιβλάστων.



Εικ. 2. Ανατομία του σπέρματος βαμβακιού, Ritchie *et al.*, 2004.

1.2.3 Η επίδραση της θερμοκρασίας στη βλάστηση των σπερμάτων και την αύξηση των φυτών.

Σε μια κανονική περίοδο καλλιέργειας των 200 ημερών, το βαμβάκι απαιτεί σχετικά υψηλές θερμοκρασίες στο μεγαλύτερο μέρος της καλλιεργητικής περιόδου. Θερμοκρασίες εδάφους κάτω από 15,5°C επιβραδύνουν την ανάπτυξη των φυτών, ειδικά κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας και στο στάδιο σχηματισμού της κάψας. Στην πράξη, χαμηλές θερμοκρασίες λίγο μετά τη φύτευση, κατά τη

διάρκεια της ανάδυσης των φυταρίων από το έδαφος καθώς και χαμηλές θερμοκρασίες νυκτός σε οποιοδήποτε στάδιο της καλλιέργειας, μπορεί να είναι δυνητικά επιβλαβείς για το φυτό. Για να εξασφαλιστεί επαρκής βλαστική ικανότητα, η θερμοκρασία του εδάφους, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 18°C. Ιδιαίτερα χαμηλές θερμοκρασίες εδαφικού περιβάλλοντος (15°C ή χαμηλότερες) κατά τη διάρκεια της βλάστησης αναστέλλουν την ανάδυση του φυταρίου (Ritchie *et al.*, 2004).

Ο ρυθμός ανάπτυξης του βαμβακιού επηρεάζεται σημαντικά από τη θερμοκρασία. Στις δροσερές ημέρες η ανάπτυξη του βαμβακιού επιβραδύνεται σημαντικά, συγκριτικά με τις ζεστές ημέρες, οπότε μετρήσεις της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της καλλιεργητικής περιόδου προσφέρουν σημαντικές πληροφορίες για την εκτίμηση του σταδίου ανάπτυξης στο φυτό. Οι μονάδες θερμότητας, ή DD_{15.5}, είναι μια εκτίμηση της επίδρασης της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια μίας ημέρας, με βάση το μέσο όρο των μέγιστων και ελάχιστων ημερησίων θερμοκρασιών σε βαθμούς Κελσίου ($^{\circ}\text{C}_{\text{max}}$ και $^{\circ}\text{C}_{\text{min}}$, αντίστοιχα), (Stewart, 1986). Ο αριθμός 15,5 αφαιρείται από το μέσο όρο, γιατί οι 15,5°C, είναι γενικά αποδεκτό ως η χαμηλότερη θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται αύξηση του βάμβακος. Ο τύπος για τον υπολογισμό θερμότητας μονάδες ανά ημέρα έχει ως εξής:

$$[(^{\circ}\text{C}_{\text{max}} \text{ ημερήσια} + ^{\circ}\text{C}_{\text{min}} \text{ ημερήσια}) \div 2] - 15,5^{\circ}\text{C} = \text{DD}_{15.5}$$

Πίνακας 3. Μονάδες θερμότητας για κάθε στάδιο ανάπτυξης.

Στάδιο ανάπτυξης	Ημέρες	Μονάδες θερμότητας DD _{15.5}
Φύτευση μέχρι ανάδυση	4 με 9	1.5 με 1.8
Ανάδυση μέχρι 1 ^ο οφθαλμό	27 με 38	12.6 με 14.5
Οφθαλμό μέχρι άνθος	20 με 25	9 με 11
Φύτευση εως πρώτο άνθος	60 με 70	23 με 27

1.2.4. Η βλαστικότητα των σπερμάτων.

Ως βλαστικότητα των σπερμάτων ορίζεται η ικανότητα του εμβρύου να αναπτύσσεται σε σπορόφυτο μετά την παράκαμψη του λήθαργου που συνήθως ακολουθεί την ωρίμανση του εμβρύου. Στο βαμβάκι, ως εμπειρικός δείκτης ποιότητας του σπόρου, χρησιμοποιείται συχνά η περιεκτικότητά 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).

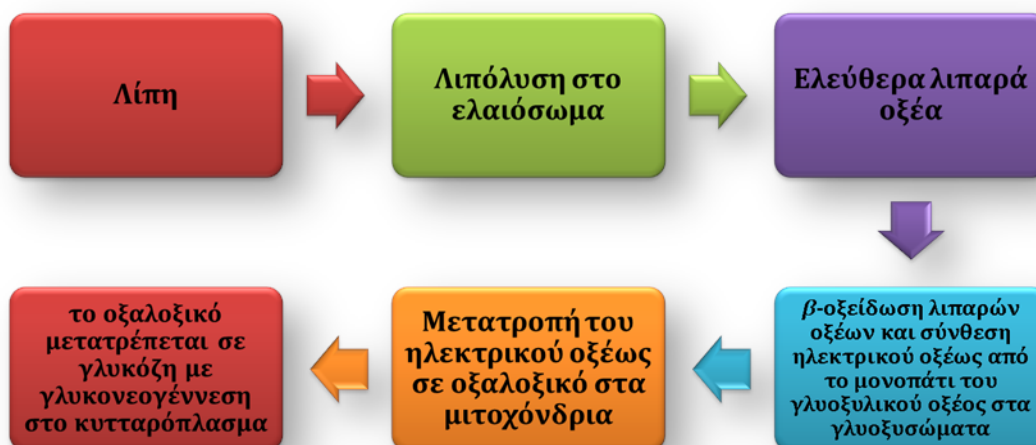
Πριν από τη βλάστηση, το ώριμο σπέρμα είναι αφυδατωμένο (περιέχει περίπου 11% υγρασία) και είναι μεταβολικά αδρανές. Η διαδικασία βλάστησης, αρχίζει με ταχεία απορρόφηση νερού η οποία συνεχίζεται αργότερα με μικρότερη ταχύτητα. Η απορρόφηση νερού συνεχίζεται έως ότου το ποσοστό νερού στο σπέρμα φτάσει 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 (Bewley 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 αύξησή 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 αμπισικό 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 and Cadenas *et al.*, 2001).

Πολλά φυτά, όπως το βαμβάκι, αποθηκεύουν στα σπέρματά 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 (Kohel and Lewis 1984). Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα για την αποδόμηση των λιπαρών οξέων των αποθεμάτων, στο βαμβάκι, αποτυπώνονται παρακάτω (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Το μονοπάτι της γλυκονεογένεση (Kohel and Lewis 1984).

Στα βλαστώνοντα 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.*, 1971). 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 κατ'αυτόν τον τρόπο τα μηχανικά εμπόδια για την ανάδυση των ριζιδίων. Αυτά περιλαμβάνουν β-1,3-γλουκανάσες, ενδομανανάσες, πολυγαλακτουρονάσες και εξπανσίνες (Leubner and Metzger *et al.*, 1995; Nonogaki 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 ενυδάτωσή 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 ανάδυση του ριζιδίου και τη βλάστηση (Hayashi *et al.*, 1998; Germain *et al.*, 2001). Χαρακτηριστικά η εγκατάσταση των φυταρίων στη μετάλλαξη *ped1* μπορεί να αποκατασταθεί με την παροχή μιας εναλλακτικής πηγής άνθρακα.

Σε αντίθεση, στα ελλειπή στο ένζυμο του γλυοξυλικού κύκλου ισοκιτρικής λυάσης (ICL) φυτάρια του *Arabidopsis thaliana* 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 φώσφορο-ένολο-πυροσταφυλικού (*PCK1*) που έχει υποστεί σίγηση με το αντινοσηματικό RNA (Rylott *et al.*, 2003). Η διαφορά μεταξύ του *Arabidopsis thaliana* και των ελαιούχων σπερμάτων, όπως είναι η ρετινολαδιά, 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).

1.3 Η σακχαρόζη.

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια από τις πιο άφθονες ομάδες οργανικών συστατικών του φυτικού βασιλείου. Απαντούν σε διάφορες μορφές: μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, πολυσακχαρίτες καθώς και τα παράγωγά τους. Ο δισακχαρίτης σακχαρόζη [α -D-γλυκοπυρανόζυλο (1,2) β -D φρουκτοφουρανοσίδιο] είναι το τελικό προϊόν καθήλωσης του άνθρακα κατά τη διάρκεια της φωτοσυνθετικής λειτουργίας. Η σακχαρόζη αποτελεί ένα μη αναγωγικό, πολύ διαλυτό στο νερό μόριο. Το μόριο της σακχαρόζης έχει υψηλή ελεύθερη ενέργεια υδρόλυσης ($\Delta G^0 = - 7.0 \text{ Kcal mol}^{-1}$) το οποίο αποτελεί και τον υψηλότερο διαγλυκοσιδικό δεσμό (Avigad and Dey, 1997).

1.3.1 Η σημασία της σακχαρόζης στα φυτά.

Η σακχαρόζη αποτελεί το κύριο προϊόν της φωτοσύνθεσης που διακινείται από τα φύλλα με σκοπό να τροφοδοτήσει το υπόλοιπο φυτό με άνθρακα και ενέργεια, απαραίτητα για την ανάπτυξη και το σχηματισμό αποθησαυριστικών ουσιών, όπως το άμυλο και τα λίπη (Lunn and Furbank, 1999). Άλλωστε, η σακχαρόζη από μόνη της αποτελεί την κύρια αποθησαυριστική ουσία σε ορισμένα φυτά, όπως στα στελέχη του ζαχαροκάλαμου (*Saccharum officinarum*), στις ρίζες του τεύτλου (*Beta vulgaris*) και στους καρπούς πολλών ειδών. Επίσης, τα φυτικά κύτταρα συσσωρεύουν σακχαρόζη ως αποτέλεσμα της επικράτησης χαμηλών θερμοκρασιών (Strand *et al.*, 2003) και ξηρασίας (Yang *et al.*, 2001). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι η σακχαρόζη σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες και τις μεμβράνες, σχηματίζοντας έτσι ένα ενεργειακό απόθεμα ικανό να προκαλέσει ταχύτατη έναρξη του μεταβολισμού, όταν οι συνθήκες καταπόνησης βελτιωθούν (Lunn and Mac Rae, 2003). Επιπλέον, αναφέρεται ότι η σακχαρόζη διαδραματίζει και ρόλο σηματοδότη στα φυτά, έχοντας μάλιστα αποκαλυφτεί πως ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα (Ciereszko *et al.*, 2001; Stitt *et al.*, 2002), μεταφορείς (Vaughn *et al.*, 2002) και αποθησαυριστικές πρωτεΐνες (Zourelidou *et al.*, 2002). Η σακχαρόζη επηρεάζει και την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση (Gaudin *et al.*, 2000; Blazquez *et al.*, 1998). Εμπλέκεται, επίσης, και στον έλεγχο διαφόρων διαδικασιών ανάπτυξης

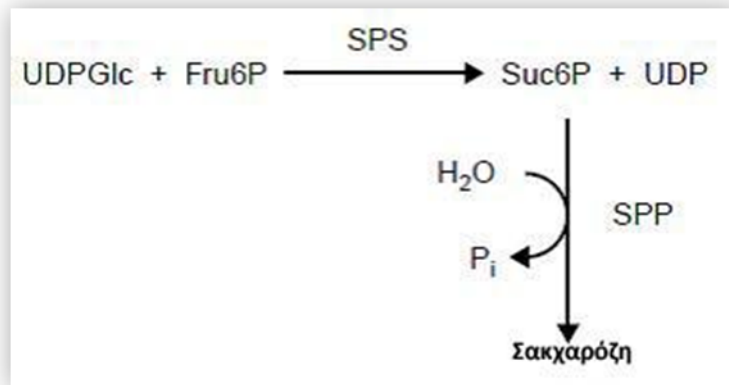
όπως η επαγωγή της άνθησης (Ohno *et al.*, 2001; King *et al.*, 2001), η διαφοροποίηση του αγγειωδών ιστών (Uggla *et al.*, 2001), η ανάπτυξη των σπερμάτων (Iraqi and Tremblay, 2001) και η συσσώρευση αποθηκευτικών ουσιών (Rook *et al.*, 2001; Davoren *et al.*, 2002). Γι' αυτό το λόγο, η σημασία της σακχαρόζης δεν περιορίζεται μόνο ως κυτταρικό «καύσιμο» για την ανάπτυξη του φυτού, αλλά είναι πιθανό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τύχη της (Lunn and Mac Rae, 2003).

1.3.2 Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της σακχαρόζης.

Ο σχηματισμός της σακχαρόζης, μια διαδικασία η οποία πιστεύεται ότι απαντάται μόνο στα φυτά, στα κυανοβακτήρια και σε ορισμένα πρωτεοβακτήρια (Chua *et al.*, 2008), βασίζεται στη δράση των παρακάτω κυτοπλασματικών ενζύμων: της συνθάσης της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS) και της φωσφατάσης της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPP).

Το ένζυμο της συνθάσης της 6-φωσφοροσακχαρόζης (EC 2.4.1.14) καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της σακχαρόζης μεταφέροντας την ομάδα γλυκόζης από έναν ενεργοποιημένο δότη σακχάρων, όπως είναι η ουρίδινο διφώσφορο γλυκόζη (UDP-Glc), σε ένα δέκτη σακχάρων την 6-φωσφορο-φρουκτόζη με αποτέλεσμα το σχηματισμό UDP και 6-φωσφορο-σακχαρόζης (**Εικ. 3**). Την αντίδραση αυτή ακολουθεί η αποφωσφορυλίωση της 6-φωσφορο-σακχαρόζης ολοκληρώνοντας έτσι το μονοπάτι βιοσύνθεσής της.

Η υδρόλυση της 6-φωσφοροσακχαρόζης πραγματοποιείται με τη δράση του ενζύμου φωσφατάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (EC 3.1.3.24), (**Εικ. 3**). Με τον τρόπο αυτό εμποδίζεται η συσσώρευση της 6-φωσφορο-σακχαρόζης ενώ πραγματοποιείται μια ικανή παραγωγή σακχαρόζης ακόμη και με χαμηλά επίπεδα UDP-γλυκόζης και 6-φωσφορο-φρουκτόζης ή σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης (Avigad and Dey, 1997).



Εικ. 3. Η πορεία σύνθεσης της σακχαρόζης.

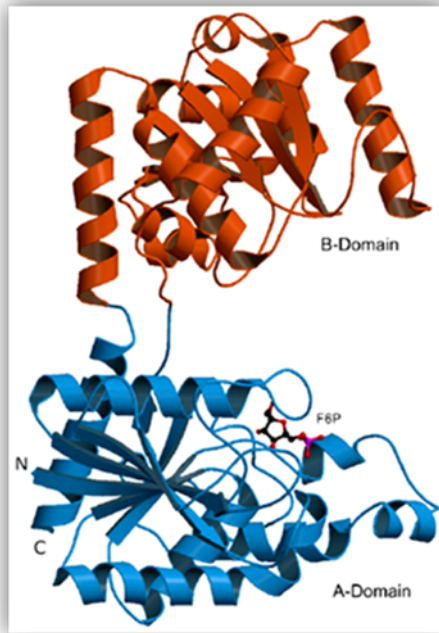
1.4 Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS).

Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS) καταλύει μία σημαντική και ρυθμιζόμενη αντίδραση στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της σακχαρόζης (Stitt *et al.*, 1988). Στους φωτοσυνθετικούς ιστούς, όπως τα φύλλα, η δραστικότητα του ενζύμου έχει μελετηθεί διεξοδικά τόσο ως προς τη λειτουργία του όσο και ως προς τη ρύθμισή του (Huber and Huber, 1996; Lunn and Mac Rae, 2003). Αντίθετα, ο ρόλος του ενζύμου στους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς, όπου λαμβάνει χώρα η εισαγωγή και η αποδόμηση της σακχαρόζης, αρχίζει τώρα να γίνεται αντιληπτός (Park *et al.*, 2008).

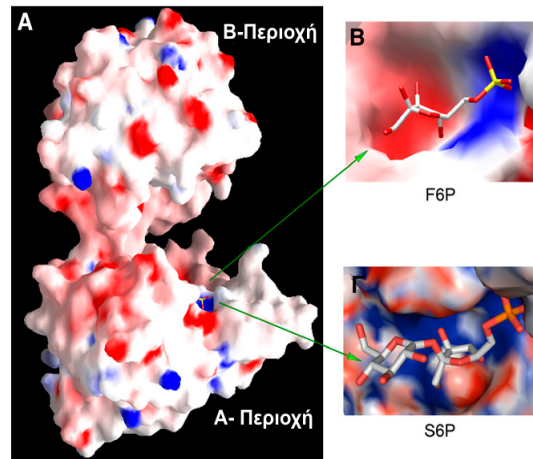
1.4.1 Δομή του ενζύμου.

Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης είναι ένα διμερές ή τετραμερές μόριο με μονομερή 138kD (Worrell *et al.*, 1991), (Εικ. 4). Όλες οι μέχρι σήμερα γνωστές SPS και όμοιες με SPS αλληλουχίες των φυτών έχουν δύο υψηλά συντηρημένες περιοχές οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρή ομοιότητα με τη συνθάση της σακχαρόζης και τις άλλες γλυκοζυλοτρανφεράσες (Winter and Huber, 2000). Η περιοχή της γλυκοζυλοτρανφεράσης περιλαμβάνει την

υποπεριοχή της σύνδεσης της UDP-γλυκόζης και μοτίβο σύνδεσης της 6-φωσφορο-γλυκόζης (**Εικ. 5**). Η SPS πιστεύεται πως διαθέτει την ίδια βασική τρισδιάστατη δομή, όπως οι διάφορες γλυκοζυλοτρανφεράσες, σε ορισμένες εκ των οποίων η δομή έχει καθορισθεί με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ (Gibson *et al.*, 2002).



Εικ. 4. Τεταρτοταγής δομή της SPS



Εικ. 5. (Α) Η μοριακή επιφάνεια της SPS. Απεικονίζονται οι δύο δομικές περιοχές που διαχωρίζονται από τη μεγάλη εσοχπρόσδεσης του υποστρώματος. Παρατηρείται το δεσμευμένο μόριο F6P/S6P στην περιοχή πρόσδεσης. Ο προσανατολισμός είναι ίδιος όπως στην **Εικ. 4. (Β)** Σε μεγέθυνση η περιοχή πρόσδεσης της F6P. Τα άτομα απεικονίζονται με γκρι (C), κόκκινο (O), και κίτρινο (P). **(Γ)** Σε μεγέθυνση η περιοχή πρόσδεσης της S6P. Τα άτομα απεικονίζονται με γκρι (C), κόκκινο (O), και πορτοκαλί (P). Η επεξεργασία των εικόνων έγινε με το πρόγραμμα RgMOL (Nicholls *et al.*, 1991; DeLano, 2002) με τη χρήση ηλεκτροστατικού δυναμικού που παρήχθει με APBS (Baker *et al.*,2001).

1.4.2 Εντοπισμός του ενζύμου.

Οι Cheng *et al.* (1996) ανοσοεντόπισαν την SPS σε εγκάρσιες τομές φύλλων αραβόσιτου. Οι τομές από τα νεαρά πράσινα φύλλα (ηλικίας 7 έως 10 ημερών) έδειξαν ισχυρό σήμα κυρίως στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού και λιγότερο στα κύτταρα του μεσόφυλλου. Αντίθετα, στα ώριμα φύλλα (ηλικίας 6 εβδομάδων) το ένζυμο εντοπίστηκε εξίσου, τόσο στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού όσο και στα κύτταρα του μεσόφυλλου.

Οι Lunn and Furbank (1999) μελέτησαν τον εντοπισμό του ενζύμου στα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα των C4 φυτών και βρήκαν πως στον αραβόσιτο (*Zea mays* L.) και στο φυτό *Atriplex spongiosa* F. Muell., η SPS εντοπίστηκε σχεδόν αποκλειστικά στα κύτταρα του μεσόφυλλου. Σε άλλα είδη, το ένζυμο εντοπίστηκε σε διάφορους ιστούς, με την δραστηριότητα στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού να κυμαίνεται από 5% της ολικής δραστηριότητας του φύλλου στο *Echinochloa crus-galli* (L.) Beav. και μέχρι 35% στο *Sorghum bicolor* Moench. Επίσης, οι Pagnussat *et al.* (2000) αναφέρουν διαφορετικά σημεία εντοπισμού της SPS πρωτεΐνης σε ιστούς από φωτοσυνθετικά και εκχλωιωτικά φύλλα ρυζιού (*Oryza sativa*). Ισχυρά σήματα εντοπίστηκαν στην επιδερμίδα και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και ασθενή στα κύτταρα του μεσόφυλλου στα εκχλωιωτικά φύλλα. Αντίθετα, στα ώριμα φύλλα η παρουσία της SPS πρωτεΐνης στους ιστούς του μεσόφυλλου ήταν χαρακτηριστικά υψηλότερη σε σχέση με τα νεαρά και τα εκχλωιωτικά φύλλα, αλλά στα κύτταρα της επιδερμίδας και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες μόλις που ανιχνεύτηκε.

1.4.3 Σημασία του ενζύμου.

Η σημασία του ενζύμου στη βιοσύνθεση της σακχαρόζης έχει επιβεβαιωθεί μέσω της τεχνολογίας ανασυνδιασμού του DNA. Υπερ-έκφραση του ενζύμου του καλαμποκιού σε φυτό τομάτας είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή σακχαρόζης, αυξημένη αναλογία σακχαρόζης/αμύλου στα φύλλα καθώς και αυξημένη φωτοσυνθετική ικανότητα, αποδεικνύοντας πως η SPS αποτελεί σημαντικό σημείο ελέγχου της φωτοσύνθεσης, κυρίως κάτω από συνθήκες αυξημένου CO₂, υπό συνθήκες κορεσμού φωτισμού (Galtier *et al.*, 1993, 1995; Micallef *et al.*, 1995). Αντιστρόφως, μείωση της έκφρασης της SPS

στα φύλλα πατάτας μέσω καταστολής της μεταγραφής του ενζύμου οδήγησε στην παρεμπόδιση σχηματισμού σακχαρόζης και στην παράλληλη αύξηση της ροής του άνθρακα προς την κατεύθυνση σχηματισμού αμύλου και αμινοξέων (Krause, 1998). Μελέτες σε διαγονιδιακά φυτά έδειξαν ότι ο συντελεστής ελέγχου της SPS στη σύνθεση της σακχαρόζης βρέθηκε μεταξύ 0,3 μέχρι 0,45 (Krause, 1994; Geigenberger *et al.*, 1995) αποκαλύπτοντας ότι η SPS αποτελεί ένα από τα ένζυμα που συμμετέχουν στον έλεγχο της βιοσύνθεσης σακχαρόζης. Μάλιστα, οι Winter and Huber (2000) αναφέρουν πως σε ορισμένες περιπτώσεις υπερ-έκφρασης του ενζύμου της SPS δεν επετεύχθει αύξηση της δράσης της, εξαιτίας μετα-μεταφραστικής ρύθμισης αυτού.

1.4.4 Ρύθμιση του ενζύμου.

Το επίπεδο δραστηριότητας του ενζύμου ελέγχεται από μια σειρά ρυθμιστικών μηχανισμών (Huber and Huber, 1992a). Σε επίπεδο μεταβολικού ελέγχου το ένζυμο υφίσταται αλλοστερική ρύθμιση από την παρουσία ανόργανων φωσφορικών (Pi), που παρεμποδίζουν την αντίδραση, ενώ αντίθετα η 6-φωσφορο-γλυκόζη την προάγει. Γι' αυτό το λόγο, η αναλογία 6-φωσφορο-γλυκόζη/Pi στο κύτταρο παρουσιάζει σημαντική επίδραση στο επίπεδο κατάλυσης του ενζύμου (Doehlert and Huber, 1985; Stitt *et al.*, 1988). Σε μία λοιπόν κατάσταση, στην οποία τα Pi έχουν διαμερισματοποιηθεί και οι φωσφορικές εξόζες βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα η SPS ενεργοποιείται επιταχύνοντας το σχηματισμό σακχαρόζης. Ωστόσο, εξαιτίας των πολύπλοκων μεταβολικών επιδράσεων που επιφέρει η στέρηση των Pi σε ολόκληρο τον κυτταρικό μεταβολισμό, το αποτέλεσμα της παραπάνω κατάστασης στο ρυθμό σχηματισμού σακχαρόζης *in vivo* δεν μπορεί να προβλεφτεί με απλό τρόπο (Usuda and Shimogawara, 1993; Cakmak *et al.*, 1994; Huber *et al.*, 1994a).

Παράλληλα, σε πολλές μελέτες βρέθηκε ότι έλλειψη των Pi συνοδευόμενη από περιορισμό της ολικής ανάπτυξης του φωτοσυνθετικού ιστού, δεν οδήγησε στη μείωση (ή την αύξηση) της συσσώρευσης σακχαρόζης και αμύλου σε μη φωτοσυνθετικές αποθηκευτικές περιοχές του φυτού, όπως ρίζες και σπέρματα.

Η έλλειψη ανόργανων φωσφορικών μπορεί να έχει και άμεσο αποτέλεσμα, ως μεταγραφικό σήμα, το οποίο αυξάνει τη σύνθεση της SPS

(Usuda and Shimogawara, 1993; Huber *et al.*, 1994a). Παρόμοια σηματοδοτική επίδραση για τα Pi αποδείχθηκε και για τη σύνθεση της ρυθμιστικής α-υπομονάδας της πρωτεΐνης PFP (Theodorou *et al.*, 1992) και για τη χυμοτοπιακή όξινη φωσφατάση (VspB), (Sadka *et al.*, 1994), δύο ένζυμα των οποίων οι δραστηριότητες εμπλέκονται στενά στο μεταβολισμό της σακχαρόζης.

1.4.4.1 Ρόλος της 2,6 διφώσφορο-φρουκτόζης.

Ένας ακόμη παράγοντας που ρυθμίζει την ταχύτητα της αντίδρασης σύνθεσης της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης αποτελεί η διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων της, καθώς και οι συγκεντρώσεις τους στο κυτταρόπλασμα (Avigad and Dey, 1997). Στην περίπτωση αυτή, σημαντικό ρόλο στο ρυθμό σχηματισμού σακχαρόζης έχει το έμμεσο ρυθμιστικό αποτέλεσμα της 2,6 διφώσφορο-φρουκτόζης (fructose-2,6-P₂).

Η 2,6 διφωσφορο-φρουκτόζη πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ροής υδατανθράκων και στην κατανομή τους στους φυτικούς ιστούς. Ως μεταβολίτης του κυτταροπλάσματος, αποτελεί ισχυρό αναστολέα της διφωσφατάσης της 1,6-διφώσφορο-φρουκτόζης και συνεπώς μπορεί να διαμορφώσει το ρυθμό με τον οποίο παρέχονται οι φωσφορικές εξόζες προς το σχηματισμό σακχαρόζης. Βέβαια, πολλές μελέτες καταδεικνύουν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ φυσιολογικών επιπέδων της 2,6 διφώσφορο-φρουκτόζης στους ιστούς και αυτών της σύνθεσης σακχαρόζης. Οι παράγοντες που θα μπορούσαν να επιδράσουν στο μεταβολισμό της 2,6 διφώσφορο-φρουκτόζης και στην αποδόμησή της, όπως λ.χ. η διάρκεια φωτεινών και σκοτεινών περιόδων, θα μπορούσαν επίσης να επηρεάσουν το ρυθμό σύνθεσης σακχαρόζης και την κατανομή του άνθρακα (Stitt, 1987; Huber *et al.*, 1990).

1.4.4.2 Ενδογενείς ρυθμοί.

Ημερήσιες διακυμάνσεις της δραστικότητας του ενζύμου παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στη σόγια. Οι αλλαγές αυτές ήταν ιδιαίτερα σημαντικές, καθώς κανένα άλλο ένζυμο που συμμετέχει στη βιοσύνθεση σακχαρόζης, δεν τις παρουσίαζε (Rufty *et al.*, 1983; Huber *et al.*, 1985). Το ημερήσιο πρότυπο της δραστικότητας της SPS σε βλαστικά όργανα φυτών σόγιας θερμοκηπίου και αγρού τυπικά παρουσιάζουν διπλό μέγιστο, με τη μία κορυφή

στο πρώτο μέρος της φωτοπεριόδου και από μια δεύτερη κορυφή 12 ώρες αργότερα. Γι' αυτό άλλωστε και η δραστικότητα του ενζύμου παρουσιάζεται συχνά μικρότερη κατά τις απογευματινές ώρες. Βέβαια, αποτελεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι αλλαγές στη δραστικότητα του ενζύμου κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου γενικά συμβάδίζουν με τις αλλαγές στο ρυθμό της διακίνησης των φωτοσυνθετικών προϊόντων (Huber *et al.*, 1985).

Ημερήσιες αλλαγές στη δραστικότητα της SPS παρατηρήθηκαν επίσης και σε πλήρως εκπτυγμένα φύλλα βαμβακιού, όπου και εκεί η δράση του ενζύμου βρέθηκε ότι συσχετίζεται θετικά με το ρυθμό της διακίνησης των φωτοσυνθετικών προϊόντων κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου (Hendrix and Huber, 1986). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την άποψη πως η δραστικότητα της SPS συμβάλλει στον έλεγχο της ροής άνθρακα προς σακχαρόζη (Huber *et al.*, 1985).

Η βάση διάκρισης ενός ενδογενούς ρυθμού ρύθμισης της δραστικότητας της SPS από τη ρύθμισή της μέσω κύκλων φωτός/σκότους είναι ότι στην πρώτη περίπτωση αλλαγές στη δραστικότητα του ενζύμου δε συμβαδίζουν αυστηρά με τις μεταβολές σκότους/φωτός. Επιπρόσθετα, οι ενδογενείς ρυθμοί διατηρούνται όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες παραμένουν σταθερές. Η ημερήσια διακύμανση της δραστικότητας του ενζύμου στα φύλλα σόγιας (Kerr *et al.*, 1985) και τομάτας (Jones and Ort, 1997) έχει αποδειχθεί ότι διατηρείται κάτω από σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες, παρέχοντας ενδείξεις για τη ρύθμισή της από βιολογικά ρολόγια.

Στην περίπτωση της σόγιας, η δραστικότητα του ενζύμου διακυμάνθηκε σε μία περίοδο περίπου 12 ωρών σε συνθήκες είτε σταθερού φωτός ή εκτεταμένου σκοταδιού πράγμα που επιβεβαιώνει τη σχετική ανεξαρτησία της από τους κύκλους φωτός-σκότους (Kerr *et al.*, 1985). Η βάση για τις μεταβολές της δραστικότητας της SPS έχει προταθεί ότι περιλαμβάνει σταθερή παρουσία της πρωτεΐνης ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν μόνο τη μέγιστη καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου και όχι τις ρυθμιστικές ιδιότητες ή τις συγγένειες με τα υποστρώματα (Kerr *et al.*, 1987). Η δραστικότητα λ.χ. της SPS στα φύλλα τομάτας που εκτέθηκαν σε συνεχές φωτισμό χαμηλής έντασης, διακυμάνθηκε με περίοδο περίπου 24ωρών φανερώνοντας έναν κερκαδικό

ρυθμό (Jones and Ort, 1997) και η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης θεωρήθηκε ως ο βιοχημικός μηχανισμός πίσω από αυτό το φαινόμενο. Οι φωσφατάσες της SPS πιστεύεται ότι ελέγχονται από κίρκαδικό ρολόι σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης (Jones and Ort, 1997). Ο κίρκαδικός ρυθμός που ελέγχει τη δραστικότητα του ενζύμου στην τομάτα μπορεί να επιβραδυνθεί με ολονύκτια έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία (Jones *et al.*, 1998), αλλά όχι στο σόργο.

Συνεπώς, είναι φανερό πως το σόργο και η τομάτα παρουσιάζουν ομοιότητα όσον αφορά στη ρύθμιση της δραστικότητας του ενζύμου από έναν ενδογενή ρυθμό, αλλά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και ο μηχανισμός αυτής της ρύθμισης φαίνεται να είναι διαφορετικός για τα δύο αυτά είδη (Winter and Huber, 2000).

1.4.4.3 Εναλλαγές φωτός/σκότους.

Σε πολλά είδη, αντίθετα με τη σόγια και την τομάτα, παρατηρούνται ταχύτατες και αναστρέψιμες αλλαγές της δραστικότητας της SPS εξαιτίας των εναλλαγών σκότους και φωτός. Στα φύλλα του σπανακιού η τροποποίηση της SPS (Walker *et al.*, 1989), η οποία περιλαμβάνει την αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της, έχει δειχθεί πως επηρεάζει τη συγγένειά της με την 6-φώσφορο-φρουκτόζη και τους αλλοστερικούς παράγοντες Glc-6-P (ενεργοποιητής) και Pi (αναστολέας) (Stitt *et al.*, 1988). Γι' αυτό, η ρύθμιση που προκαλούν οι εναλλαγές ημέρας/νύκτας στη δραστικότητα είναι παρατηρήσιμη.

Η ρύθμιση της δραστικότητας της SPS μέσω του φωτός μπορεί να παρατηρηθεί σε μία ποικιλία ειδών αλλά υπάρχουν διαφορές στην έκταση με την οποία επηρεάζεται. Επίσης, πιστεύεται πως η ρύθμιση της δραστικότητας του ενζύμου μέσω του φωτός αποτελεί ένα μηχανισμό ρύθμισης της δυναμικότητας σύνθεσης σακχαρόζης σε σχέση με το ρυθμό φωτοσύνθεσης, διαδικασίας που περιλαμβάνει ακτινοβολία, CO₂ και άλλους παράγοντες (Winter and Huber, 2000).

1.4.4.4 Ωσμωτική καταπόνηση.

Έχει βρεθεί ότι όταν φύλλα σπανακιού (Quick *et al.*, 1989; Zrenner and Stitt, 1991; Toroser *et al.*, 1997) ή κόνδυλοι πατάτας (Reimholz *et al.*, 1994; Geigenberger *et al.*, 1995) επωαστούν σε υπερτονικά διαλύματα μαννιτόλης ή

σορβιτόλης ώστε να προαχθεί η ωσμωτική καταπόνηση, παρατηρείται ταυτόχρονη ενεργοποίηση της SPS. Στο φυτό του φασολιού η κατάσταση ενεργοποίησης της SPS αυξήθηκε επίσης δραματικά (Castrillo, 1992) παρόλο που η ωσμωτική καταπόνηση οδηγεί σε αξιοσημείωτη μείωση της μέγιστης δραστηριότητας της SPS (Vassey *et al.*, 1989; Castrillo, 1992) γεγονός που φανερώνει ότι περισσότερες της μιας διαδικασίες υφίστανται ταυτόχρονα στο φυτό αυτό.

Η ενεργοποίηση που υφίσταται το ένζυμο όταν βρεθεί κάτω από ωσμωτικές συνθήκες καταπόνησης οφείλεται στη φωσφορυλίωση μιας μοναδικής περιοχής αυτού στη Ser424 (Toroser *et al.*, 1999). Είναι γνωστό πως η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ανταποκρίνεται στην καταπόνηση από ξηρασία και αλατότητα, περιλαμβάνοντας και γονίδια που κωδικοποιούν Ca^{+2} εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (Urao *et al.*, 1994). Μία Ca^{+2} εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση, επίσης, εμφανίζεται να συμμετέχει στη διαδικασία ενεργοποίησης της ωσμωτικής καταπόνησης, αλλά πιθανόν διαχωρίζεται από τις κινάσες που έχουν κλωνοποιηθεί μέχρι σήμερα (Winter and Huber, 2000). Επίσης οι Winter και Huber (2000) αναφέρουν πως εάν η ενεργοποίηση της SPS ως αποτέλεσμα της ωσμωτικής καταπόνησης περιλαμβάνει μηχανισμό μεταγωγής σήματος τότε είναι πιθανό να αλληλοσχετίζεται με άλλα μονοπάτια. Μια ενδιαφέρουσα πιθανότητα είναι η χαμηλή θερμοκρασία και η ωσμωτική καταπόνηση (ξηρασία) να προκαλούν ενεργοποίηση της SPS μέσω ενός κοινού μηχανισμού. Είναι άλλωστε γνωστό πως η έκφραση ενός αριθμού γονιδίων μπορεί να προαχθεί από κοινού, τόσο από τη ξηρασία, όσο και από χαμηλή θερμοκρασία, ακόμη και όταν οι συνθήκες καταπόνησης διαφέρουν μεταξύ τους (Liu *et al.*, 1998). Ωστόσο, χρειάζεται ακόμη έρευνα προκειμένου εάν υφίσταται όντως τέτοιος κοινός μοριακός μηχανισμός που να ενεργοποιεί τη δραστηριότητα της SPS (Winter and Huber, 2000). Γενικά, η ωσμωτική καταπόνηση οδηγεί στην αύξηση των διαλυτών σακχάρων, ιδιαίτερα της σακχαρόζης και στη μείωση του αμύλου, διότι προάγει τη σύνθεση σακχάρων και αποτρέπει τη σύνθεση αμύλου. Η συσσώρευση σακχαρόζης θα μπορούσε να παίξει άμεσο ρόλο στην ωσμωρύθμιση και θα μπορούσε επίσης να προάγει τον ταχύτατο μεταβολισμό

των υδατανθράκων προς την παραγωγή ενέργειας όταν μειώνεται η καθήλωση του άνθρακα και υπάρχει μια μεταβολή της ροής του από την ανάπτυξη σε άλλες λειτουργίες (Iyer *et al.*, 1998).

1.4.4.5 Καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών.

Προκειμένου τα φυτά να προσαρμοστούν στις χαμηλές θερμοκρασίες συχνά απαιτείται η συσσώρευση διαλυτών σακχάρων, με τη σακχαρόζη να αποτελεί το πιο κοινό και πιο άφθονο από αυτά (Steponkus and Lanphear, 1968; Kaurin *et al.*, 1981; Guy *et al.*, 1992). Η αυξημένη συσσώρευση σακχαρόζης σε φωτοσυνθετικούς (Jeong and Housley, 1990; Tongetti *et al.*, 1990; Guy *et al.*, 1992; Holaday *et al.*, 1992) και μη φωτοσυνθετικούς (Geigenberger *et al.*, 1995) ιστούς έχει συνδεθεί με την αύξηση της δραστηριότητας της SPS. Τόσο στα φύλλα του σπανακιού όσο και στους κονδύλους πατάτας η αυξημένη μέγιστη δραστηριότητα της SPS που παρατηρήθηκε λόγω έκθεσης σε ψύχος παραλληλίστηκε με μια αυξημένη παρουσία της πρωτεΐνης.

Αντίθετα, η αυξημένη δραστηριότητα της SPS σε κονδύλους πατάτας εκτεθειμένους σε χαμηλές θερμοκρασίες συνδέθηκε με την εμφάνιση ενός νέου ισότυπου SPS (Reimholz *et al.*, 1997). Έχει βρεθεί πως στην πατάτα περιέχει τέσσερις ισότυπους SPS οι οποίοι διαφέρουν στο μέγεθος της υπομονάδας: SPS-1a (125kDa), SPS-1b (127kDa), SPS-2 (135kDa) και SPS-3 (145kDa). Οι τέσσερις αυτοί ισότυποι έχουν διαφορετική κατανομή στους ιστούς αλλά τα SPS-1a/b αποτελούν τους πιο συχνά απαντώμενους. Έκθεση στο ψύχος οδήγησε σε μία αντιστρεπτή αύξηση στην SPS-1b που συνέπεσε με μία αλλαγή στις κινητικές ιδιότητες της SPS. Επειδή η SPS ρυθμίζεται από την παρουσία υποστρωμάτων *in vivo*, μεταβολές στις κινητικές ιδιότητες θεωρείται ότι παρέχουν έναν αποτελεσματικό μηχανισμό για τη διαφοροποίηση της καταλυτικής ιδιότητας του ενζύμου. Σε αντινοσηματικά φυτά με 75% μείωση της έκφρασης της SPS, μειώθηκε κατά 10-40% η συγκέντρωση των διαλυτών σακχάρων ως αντίδραση στη χαμηλή θερμοκρασία (Krause *et al.*, 1998), αποδεικνύοντας πως η επί τις εκατό έκφραση της SPS δεν αποτελεί το μοναδικό παράγοντα ελέγχου της συσσώρευσης σακχαρόζης. Η αύξηση της SPS-1b, ως αντίδραση στην αποθήκευση στο ψύχος συνοδεύτηκε με μείωση της SPS-1a

(Reimholz *et al.*, 1997), που είναι σύμφωνη με την παρατήρηση πως η μέγιστη δραστικότητα της SPS δεν αυξήθηκε με την καταπόνηση.

Είναι πιθανόν, δίχως να έχει αποδειχθεί, ότι οι SPS-1a και SPS-1b κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο, καθώς και οι δύο ισότυποι παρουσίασαν μείωση σε αντινοηματικά φυτά σε αντίθεση με τις SPS-2 και -3 που δεν έδειξαν μείωση (Krause *et al.*, 1998). Εάν συμβαίνει αυτό, τότε οι δύο αυτοί ισότυποι είναι δυνατόν να προέρχονται από διαφορετική “ωρίμανση”, ή κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση δεν φαίνεται να αποτελεί τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που εμπλέκεται σε αυτή την περίπτωση (Reimholz *et al.*, 1997). Είναι επίσης πιθανόν να κωδικοποιούνται από διαφορετικά, αλλά, σχεδόν πανομοιότυπα γονίδια.

Μετά από έρευνα στη βάση δεδομένων GENEVESTIGATOR που αφορά την έκφραση των γονιδίων του *Arabidopsis thaliana*, προέκυψε ότι όλα τα γονίδια της SPS παρουσίασαν αυξημένη έκφραση μετά από χειρισμό των φυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η μεγαλύτερη όμως αύξηση της έκφραση εντοπίστηκε στο γονίδιο At5g11110 του οποίου η έκφραση βρέθηκε μέχρι και 8πλάσια σε σχέση με το μάρτυρα.

Πίνακας 4. Αναλογία έκφρασης των γονιδίων της SPS του *Arabidopsis thaliana* μετά την καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών σε σχέση με το μάρτυρα.

Γονίδια *Arabidopsis thaliana*

Θερμοκρασία °C	at5g20280	at5g11110	at4g10120	at1g04920
4 °C	0.91 – 3.09	0.94 – 8.00	0.54 – 2.77	0.54 – 1.52
8 °C	0.93 – 1.07	1.04 – 1.33	0.5 – 1.53	1.11 – 1.19
10 °C	1.08 – 1.32	1.37 – 1.66	0.59 – 1.53	0.81 – 1.23
12 °C	1.12 – 1.21	1.04 – 1.20	0.49 – 1.10	0.77 – 1.18
14 °C	0.83 – 1.00	0.84 – 1.13	0.46 – 1.10	1.29 – 1.39
17 °C	0.94 – 1.12	1.05 – 1.06	0.66 – 1.15	1.04 – 1.57

1.4.4.6 Έλεγχος μέσω αντιστρεπτής πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης.

Η SPS φωσφορυλιώνεται *in vivo* σε πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης, αλλά φαίνεται πως σε τρεις θέσεις από αυτές μπορεί να προκληθεί ρύθμιση του ενζύμου κάτω από κατάλληλες συνθήκες (Winter and Huber, 2000). Οι τρεις αυτές θέσεις φωσφορυλίωσης πιστεύεται πως απαντούν στους βρόγχους της πρωτεΐνης και είναι η Ser158, Ser424 και η Ser229 (Salvucci *et al.*, 1995). Παρακάτω παρουσιάζεται μόνο η επίδραση της φωσφορυλίωσης στη θέση Ser158. Στα φύλλα του σπανακιού, η φωσφορυλίωση της Ser158 είναι αυτή που συμμετέχει στην απενεργοποίηση του ενζύμου στο σκοτάδι (McMichael *et al.*, 1993). Κατά τους Huber *et al.* (1996) το κατάλοιπο αυτό συντηρείται μεταξύ των ειδών. Η φωσφορυλίωση της Ser158 μειώνει τη δραστηριότητα της SPS μεταβάλλοντας τις συγγένειες με τα υποστρώματα και τους τροποποιητές δίχως να επηρεάζει τη μέγιστη καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου. Σημειακές μεταλλάξεις της Ser158 της SPS των φύλλων του σπανακιού επιβεβαίωσε το ρόλο του κατάλοιπου σερίνης στη ρύθμιση της δραστηριότητας του ενζύμου τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Toroser *et al.*, 1999). Διαγονιδιακά φυτά καπνού με μεταλλαγμένο ένζυμο στη θέση της Ser158 παρουσίαζε μια σχετικά αυξημένη κατάσταση ενεργοποίησης και δεν απενεργοποιείται στο σκοτάδι. Αντίθετα, εισαγωγή μίας όξινης ομάδας στην θέση 158 στο διπλό μετάλλαγμα S157F/S158E παρήγε ένζυμο που δεν ενεργοποιείται από το φως. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν το ρυθμιστικό ρόλο της Ser158 ως την κυρία υπεύθυνη περιοχή για την *in vivo* απενεργοποίηση της SPS, και παρέχει ενδείξεις ότι η συνεισφορά της φωσφορυλίωσης είναι η εισαγωγή αρνητικού φορτίου σε αυτή τη θέση.

Μια από τις κύριες πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν την Ser158 έχει οριστεί η PKIII η οποία τείνει να συν-απομονώνεται με την SPS (McMichael *et al.*, 1995). Η PKIII είναι ανεξάρτητης παρουσία του Ca^{+2} και έχει Mr 150kD. Η καταλυτική της υπομονάδα είναι 60kDa και αναγνωρίζεται από αντισώματα εναντίον της RKIN1, μιας ομόλογης της SNF1 των φυτών (Douglas *et al.*, 1996). Ένα χαρακτηριστικό των κινασών που είναι όμοιες με την SNF1 είναι

ότι συχνά ρυθμίζονται από φωσφορυλίωση και αυτό έχει αποδειχθεί για την PKIII (Winter and Huber, 2000). Ωστόσο, οι ίδιοι αναφέρουν πως δεν είναι γνωστό εάν η κατάσταση φωσφορυλίωσης και κατ' επέκταση η δράση της PKIII μεταβάλλεται *in vivo*. Εάν συμβαίνει αυτό, θα μπορούσε να συμβάλλει απευθείας στον έλεγχο της δραστηριότητας της SPS.

Η ρύθμιση της καταλυομένης από την PKIII φωσφορυλίωσης /ανενεργοποίησης της SPS πιστεύεται ότι περιλαμβάνει μεταβολίτες και ιδιαίτερα την 6-φωσφορογλυκόζη (Weiner *et al.*, 1992). Η 6-φωσφορογλυκόζη θα μπορούσε να δράσει είτε με την πρόσδεσή της στην αλλοστερική θέση της SPS είτε επιδρώντας κατευθείαν στην κινάση PKIII, πιθανόν διαμέσου μιας υποτιθέμενης ρυθμιστικής θέσης που πιστεύεται ότι συνδέεται με την καταλυτική θέση των 60 kDa. Η μεταβολική ρύθμιση της κινάσης/ων που δρουν στην SPS θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ της κατάστασης ενεργοποίησης της SPS και της αναλογίας της 6-φωσφορογλυκόζης σε κονδύλους πατάτας σε *in vivo* κατάσταση (Giegenberger *et al.*, 1998).

Η φωσφορορυλιωμένη στη θέση Ser158 SPS μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί και να ενεργοποιηθεί *in vitro* από την καταλυτική υπομονάδα φωσφατασών του τύπου 2A, αλλά όχι από την πρωτεϊνική φωσφατάση τύπου 1, (PP2A) (Siegl *et al.*, 1990). Ωστόσο, πιθανότατα οι PP2A να υφίστανται *in vivo* ως ολιγομερείς πρωτεΐνες με την καταλυτική υπομονάδα 35 kDa να είναι συνδεδεμένη με μία ή και περισσότερες ρυθμιστικές υπομονάδες.

Μία από τις ενδιαφέρουσες ρυθμιστικές ιδιότητες της PP2A που ενεργεί στην SPS είναι η παρεμπόδιση από τα ανόργανα φωσφορικά (Weiner *et al.*, 1992). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η δραστηριότητα και οι ρυθμιστικές ιδιότητες της SPS-PP2A φαίνεται να αλλάζουν με το χειρισμό φωτός/σκότους των φύλλων. Το ένζυμο στα φωτισμένα φύλλα παρουσιάζει ελαφρώς υψηλότερη δραστηριότητα και πολλαπλάσια μείωση της ευαισθησίας στην παρεμπόδιση από τα ανόργανα φωσφορικά (Weiner *et al.*, 1993). Η μοριακή βάση αυτής της μεταβολής των ιδιοτήτων δεν είναι γνωστή, αλλά εμπλέκει τη σύνθεση κυτοπλασματικών πρωτεϊνών (Weiner *et al.*, 1992; Weiner *et al.*, 1993). Η αποφωσφορυλίωση της SPS από τις PP2A μπορεί επίσης να επηρεαστεί και από

αμινοξέα. Έχει παρατηρηθεί πως η ενεργοποίηση της SPS από το φως σε αποκομμένα φύλλα μπορεί να μειωθεί με τη χορήγηση αμινοξέων μέσω του ρεύματος της διαπνοής. Παρεμπόδιση της δραστηριότητας της SPS-PP2A από αμινοξέα έχει παρατηρηθεί και *in vitro* (Huber *et al.*, 1996).

1.4.4.7 Ενδείξεις για την παρουσία μεταβολονίου SPS-SPP στη βιοσύνθεση της σακχαρόζης.

Μελέτες σε SPS και SPP εκχυλίσματα από φύλλα ρυζιού υποστηρίζουν ότι η SPS μπορεί να σχηματίσει ένα σταθερό σύμπλεγμα με την φωσφατάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPP) (Echeverria *et al.*, 1997). Η ύπαρξη ενός μεταβολονίου ενισχύεται από πολλαπλές ενδείξεις που σχετίζονται με τη συμμετανάστευση της SPS και της SPP κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Echeverria *et al.*, 1997) και τη διέγερση της δραστηριότητας της SPS και της μειωμένης παρεμπόδισης από τα ανόργανα φωσφορικά παρουσία της SPP (Salerno *et al.*, 1996; Echeverria *et al.*, 1997).

1.5 Οικογένειες SPS γονιδίων στα φυτά.

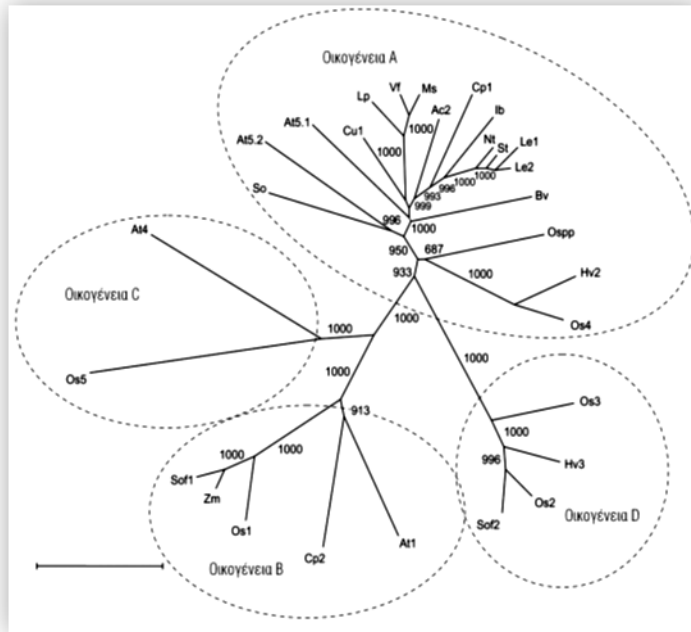
Τα πρώτα γονίδια SPS που κλωνοποιήθηκαν προήλθαν από το καλαμπόκι (Worrell *et al.*, 1991) και το σπανάκι (Klein *et al.*, 1993; Sonnwald *et al.*, 1993). Ακολούθησε κλωνοποίηση και άλλων SPS γονιδίων από 20 περίπου φυτά (κυρίως δικοτυλήδονα) όπως επίσης και κυανοβακτήρια (Lunn and MacRae, 2003). Καθώς προχωρούσε η κατάθεση νέων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του ενζύμου από όλο και περισσότερα είδη, προέκυψε η ιδέα κατηγοριοποίησης των αλληλουχιών σε δύο ομάδες, μία ομάδα από τα δικοτυλήδονα και μία από τα μονοκοτυλήδονα. Βασισμένοι σε αναλύσεις υβριδισμού αρχικά υιοθετήθηκε η άποψη πως κάθε είδος περιείχε ένα μόνο SPS γονίδιο (Worrell *et al.*, 1991; Valdez-Alarcon *et al.*, 1996). Ωστόσο, οι Sugiharto *et al.* (1997) κλωνοποίησαν δύο διαφορετικά cDNA της SPS από ζαχαροκάλαμο, ένα από τα οποία παρουσίαζε μεγάλη ομοιότητα με το γονίδιο του καλαμποκιού, ενώ το άλλο κωδικοποιούσε μια μικρότερη πρωτεΐνη που έδειχνε να έχει ομοιότητα με τα SPS δικότυλων φυτών που ήταν γνωστά μέχρι τότε. Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειχναν ότι τουλάχιστον κάποια φυτά περιέχουν πολλαπλά γονίδια SPS και διαφώνουσαν με μία φυλογένεια βασισμένη σε διαχωρισμό δικοτυλήδονων-μονοκοτυλήδονων (Castleden *et al.*, 2004). Οι Langenkämper *et al.* (2002) αναλύοντας τις αλληλουχίες όλων των γνωστών SPS ανακάλυψαν πως αυτές συναθροίζονται σε τρεις διαφορετικές οικογένειες, τις οποίες και ονόμασαν Α, Β και C. Σε αυτές προστέθηκε και η D οικογένεια η οποία περιλαμβάνει αλληλουχίες που ανήκουν μόνο στην οικογένεια Ροσεία (Εικ. 6). Μάλιστα, στην D οικογένεια οι πρωτεΐνες είναι μικρότερες από εκείνες των υπολοίπων οικογενειών με μοριακές μάζες 108 - 109 kD έναντι 114 – 119 kD (Castleden *et al.*, 2004).

Μέχρι σήμερα τρία διαφορετικά γονίδια SPS έχουν εκφραστεί στα φύλλα του φυτού *Citrus unshiu* (Komatsu *et al.*, 1996) και τέσσερα στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (SPS1, At1g04920; SPS4, At4g10120; SPS5a, At5g11110; SPS5b, At5g20280) (Langenkämper *et al.*, 2002). Τόσο το *Citrus unshiu* όσο και το *Arabidopsis thaliana* (SPS5a και 5b) περιλαμβάνουν γονίδια που ανήκουν στην Α οικογένεια, αλλά και τα δύο είδη έχουν από ένα γονίδιο της οικογένειας Β και C.

Οι Lunn and MacRae (2003) υπέθεσαν πως όλα τα ανώτερα φυτά περιλαμβάνουν τουλάχιστον έναν αντιπρόσωπο από κάθε SPS οικογένεια στο γένωμα τους και ότι το μέλος κάθε οικογένειας εκφράζεται παρόλο που κάποιος ισόμορφος μπορεί να κυριαρχεί.

Οι περισσότερες από τις διαθέσιμες αλληλουχίες δικότυλων φυτών ανήκουν στην Α οικογένεια. Για παράδειγμα, το φυτό της τομάτας έχει δύο γονίδια SPS στην οικογένεια αυτή. Επίσης, τα περισσότερα από τα διαθέσιμα γονίδια SPS των μονοκότυλων φυτών ανήκουν στην Β οικογένεια εκτός από εκείνο της μπανάνας (*Musa acuminata*) που ανήκει στην Α (Εικ. 6).

Οι περισσότερες προσπάθειες υπερ-έκφρασης του ενζύμου της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης σε διαγονιδιακά φυτά έγιναν με τη χρήση γονιδίων είτε από την Β οικογένεια του καλαμποκιού (Baxter *et al.*, 2001; Laporte *et al.*, 2001; Strand *et al.*, 2003) είτε από την Α οικογένεια του σπανακιού (Lunn *et al.*, 2003). Οι Lunn and MacRae (2003) αναφέρουν πως ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της Β οικογένειας του καλαμποκιού σε δικότυλα φυτά, όπου η Α οικογένεια πιθανόν κυριαρχεί, αποτελεί την πλέον επιτυχημένη περίπτωση αύξησης της δραστηριότητας της SPS με αναφορές μάλιστα αύξησης της απόδοσης και της ανθεκτικότητας στον παγετό (Lunn *et al.*, 2003).



Εικ. 6. Δενδρόγραμμα των οικογενειών της SPS.

1.5.1 Έκφραση των γονιδίων της SPS.

Οι Lehmann *et al.* (2008) αναφέρουν πως στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η SPS1 πρωτεΐνη εκφράζεται στα φύλλα και τα άνθη και μάλιστα στα άνθη αποτελεί και τον κυρίαρχο ισόμορφο, ενώ απουσίαζε από το βλαστό. Οι SPS5a και 5b ήταν οι κυρίαρχοι ισόμορφοι σε φύλλα και βλαστό. Στο σιτάρι οι Castleden *et al.* (2004) βρήκαν πως από τα πέντε SPS γονίδια, το *TaSPS1* (οικογένεια C) εκφράζεται πιο έντονα στους σπόρους των βλαστανόντων σποροφύτων και στον κολεό. Τα *TaSPSII* (οικογένεια A) εκφράζονται σε όλα τα μέρη των βλαστανόντων σποροφύτων και στα φύλλα που περιβάλλουν το στάχυ, ενώ λιγότερο στα εκπτυγμένα φύλλα νεαρών φυτών. Τα γονίδια *TaSPSIII* (οικογένεια D) εκφράστηκαν περισσότερο στα βλαστανόντα σπορόφυτα, στους στάχεις και λιγότερο στους αναπτυσσόμενους σπόρους κατά τα πρώτα στάδια

ανάπτυξης τους. Σε αντίθεση, τα γονίδια *TaSPSIV* (οικογένεια D) εκφράστηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό στα σπέρματα κατά τα τελευταία στάδια ανάπτυξης και λιγότερο στα βλαστώντα σπέρματα.

Πειράματα που έγιναν σε μικροσυστοιχίες του *Arabidopsis* αναδεικνύουν ότι καθένα από τα τέσσερα γονίδια της SPS έχει διαφορετική χωροχρονική έκφραση (Gibbon *et al.*, 2004; Harmer *et al.*, 2000; Hennig *et al.*, 2004). Αντίστοιχα, η κατά Northern ανάλυση στο σιτάρι και η *in silico* ανάλυση ESTs άλλων ειδών σε διάφορα ιστοειδικά και αναπτυξιακά στάδια, κατέδειξαν το ίδιο. Μέχρι σήμερα παραμένει άγνωστη η συν-έκφραση των ισόμορφων SPS γονιδίων στο ίδιο κύτταρο, διότι τα δείγματα ιστών περιλαμβάνουν διάφορους κυτταρικούς τύπους. Ανάλυση των μικροσυστοιχιών του *Arabidopsis* (<http://www.weigelworld.org>; <http://web.uni-franfurt.de/fb15/botanik/>) υποδεικνύουν ότι η έκφραση κάθε γονιδίου SPS αντιδρά σε διάφορα ερεθίσματα. Το γονίδιο *AtSPS4* της C-οικογένειας δείχνει ένα ημερήσιο πρότυπο έκφρασης στα φύλλα, με μέγιστο κατά τη διάρκεια της νύχτας, ενώ τα μεταγραφήματα του γονιδίου *AtSPS5b* (A-οικογένεια) έδειξαν μέγιστο κατά τη διάρκεια της ημέρας και ελάχιστο κατά τη διάρκεια της νύχτας (Gibbon *et al.*, 2004; Harmer *et al.*, 2000). Τα επίπεδα των μεταγραφημάτων του άλλου γονιδίου της A-οικογένειας, *AtSPS5a*, δεν μεταβλήθηκαν κατά τον ημερήσιο κύκλο, αλλά σημείωσαν σημαντική αύξηση σε συνθήκες ωσμωτικής καταπόνησης λόγω μεταχείρισης με χαμηλές θερμοκρασίες. Προτείνεται δηλαδή, ότι το γονίδιο *AtSPS5a* κωδικοποιεί μία επαγόμενη από καταπονήσεις ισομορφή, που ενδεχομένως συνεισφέρει στα αυξημένα επίπεδα συσσώρευσης και σύνθεσης σακχαρόζης κάτω από ωσμωτική ή ψυχρή καταπόνηση (Quick *et al.*, 1989; Hurry *et al.*, 1995; Hurry *et al.*, 2000; Winter and Huber, 2000). Το ίδιο γονίδιο φαίνεται ότι ρυθμίζεται θετικά από την παρουσία γλυκόζης σε τέτοιο τρόπο ώστε να χρειάζεται εκ νέου πρωτεϊνική σύνθεση.

Οι Chen *et al.* (2005) μετά από ανάλυση σε RNA από διάφορους ιστούς φυτών καπνού, χρησιμοποιώντας ανιχνευτές cDNA των γονιδίων *NtSPS*, έδειξαν ότι όλοι οι ιστοί εκφράζουν το γονίδιο *NtSPSA* σε διάφορα επίπεδα. Υψηλότερη έκφραση βρέθηκε στα πέταλα και στο βλαστό, ενώ στα φύλλα και στις ωθήκες

υπήρξε μέτρια έκφραση. Σημαντικά επίπεδα του *NtSPSA* μεταγραφήματος βρέθηκαν σε ετερότροφους ιστούς, όπως ρίζες, στα αναπτυσσόμενα φύλλα και στους ανθήρες. Η έκφραση του *NtSPSB* περιορίστηκε κυρίως στα αναπαραγωγικά όργανα (ανθήρες και ωοθήκες) αν και παρατηρήθηκε ένα μικρό σήμα και στα ώριμα φύλλα.

1.5.2. Το γονίδιο C θεωρείται το γονίδιο κλειδί για τη σύνθεση της σακχαρόζης τη νύχτα.

Καταστολή του *NtSPSC* με RNAi σε διαγονιδιακά φυτά καπνού, οδήγησε σε αύξηση των επιπέδων του αμύλου, κάτι που δεν παρατηρήθηκε κατά την καταστολή του γονιδίου *NtSPSA*. Υπάρχουν πολλά στοιχεία που καταδεικνύουν ότι η συσσώρευση αμύλου σε *NtSPSCi* φυτά δεν οφείλεται σε αλλαγές στην κατανομή του άνθρακα κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης, αλλά μάλλον στη διατάραξη του μηχανισμού της κινητοποίησης του αμύλου κατά τη διάρκεια της νύχτας. Αλλαγές στη διαμερισματοποίηση του φωτοσυνθετικού άνθρακα σε συνθήκες κορεσμού φωτός και CO₂ δεν παρατηρήθηκαν σε *NtSPSAi* και *NtSPSCi* φυτά αντίστοιχα, σε σύγκριση με αυτά του αγρίου τύπου. Αυτό συνάδει με την υπόθεση ότι κατά τη διάρκεια της ημέρας κάθε ισομορφή μπορεί να αντισταθμίσει την απώλεια των άλλων και ως εκ τούτου δεν θα πρέπει να υφίσταται κανένας περιορισμός στη σύνθεση της σακχαρόζης.

Είναι ενδιαφέρον ότι η αντινοσηματική αναστολή του γονιδίου της *AtSPSA* στο *Arabidopsis*, δεν επηρεάζει την αναλογία της σύνθεσης σακχαρόζης/αμύλου στα φύλλα (Strand *et al.*, 2000). Ωστόσο, μεταχείριση των *NtSPSCi* φυτών με παρατεταμένη περίοδο σκότους και η ακόλουθη χρώση με ιώδιο των φύλλων, έδειξε ότι η κινητοποίηση του αμύλου ήταν μειωμένη. Η συσσώρευση μαλτόζης προς το τέλος της σκοτεινής περιόδου αποδεικνύει ότι η αποδόμηση του αμύλου καθ'εαυτή, λειτουργούσε σε *NtSPSCi* φυτά, αλλά ο μετέπειτα μεταβολισμός των προϊόντων διάσπασής του είχε διαταραχθεί.

Τα μεταλλαγμένα φυτά *Arabidopsis* που απουσιάζει ο μεταφορέας MEX1 της μαλτόζης, εμφάνισαν επίπεδα μαλτόζης τουλάχιστον 40 φορές υψηλότερα από εκείνα στα αγρίου τύπου φύλλα (Niittyla *et al.*, 2004), και η 2-πλάσια συσσώρευση μαλτόζης που παρατηρήθηκε σε *NtSPSCi* φυτά ήταν σχετικά μέτρια.

Επιπλέον, οι ημερήσιες μεταβολές του αμύλου στα φύλλα, ήταν παρόμοιες σε NtSPSCi και αγρίου τύπου φυτά, αν και η περιεκτικότητα σε άμυλο στα διαγονιδιακά φυτά ήταν αυξημένη σε όλα τα χρονικά σημεία. Φαίνεται ότι η καταστολή της NtSPSC δεν οδηγεί σε παρεμπόδιση μετατροπής του αμύλου σε σακχαρόζη κατά τη διάρκεια της νύχτας, αλλά μάλλον περιορίζει τη διαδικασία, σε βαθμό που οδηγεί στη συσσώρευση του αμύλου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Οι αλλαγές στα επίπεδα αμύλου και μαλτόζης που παρατηρήθηκαν κατά την αποσιώπηση της NtSPSC δεν εμφανίστηκαν στα NtSPSAi φυτά, αποδεικνύοντας ότι η λειτουργία της NtSPSA, δεν είναι απαραίτητη για τη διατήρηση σύνθεσης της σακχαρόζης κατά την σκοτεινή περίοδο. Στο σύνολό τους, τα δεδομένα υποδεικνύουν έντονα την καίρια λειτουργία της NtSPSC στη σύνθεση της σακχαρόζης κατά τη διάρκεια της κινητοποίησης του αμύλου τη νύχτα. Σε αντίθεση με τη φωτεινή περίοδο, η λειτουργία της NtSPSC δεν μπορεί να υποκατασταθεί εντελώς από τις άλλες οικογένειες των SPS κατά τη διάρκεια της νύχτας.

ΣΚΟΠΟΣ

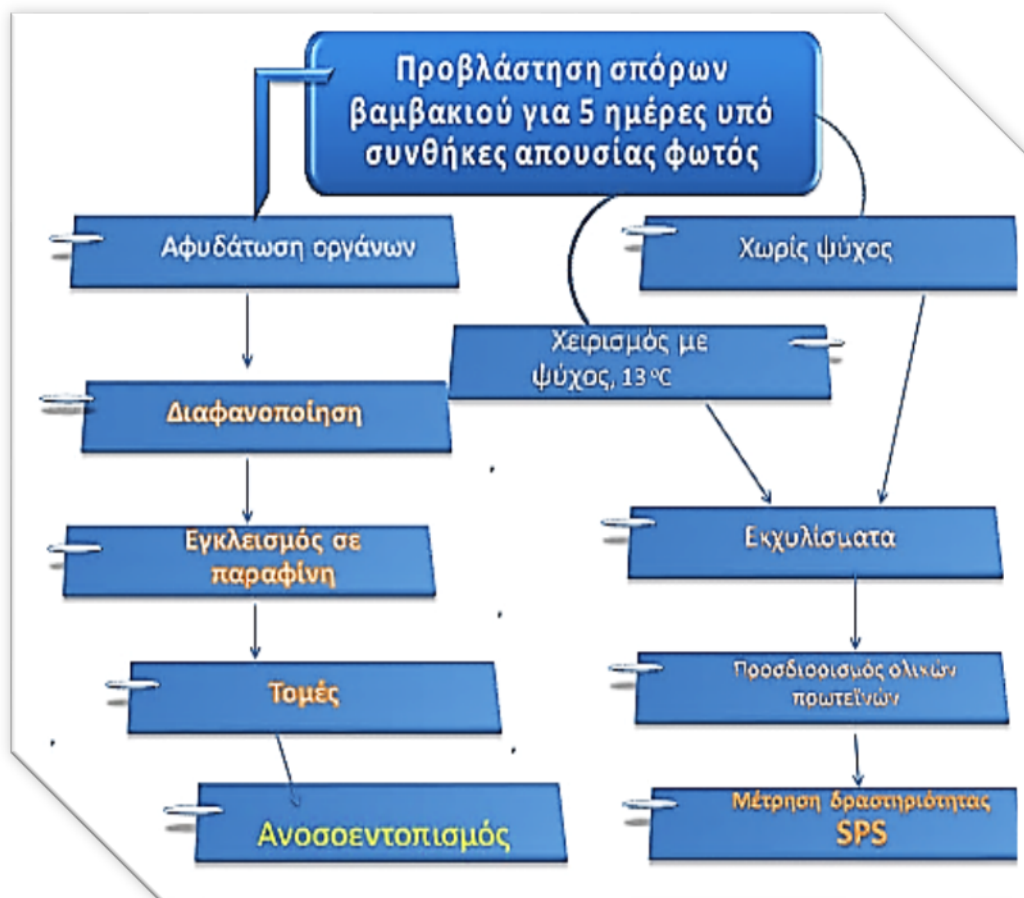
Όπως προαναφέρθηκε στην εισαγωγή, θερμοκρασίες εδάφους χαμηλότερες των 15°C αποτρέπουν την ανάδυση των φυταρίων και επιβραδύνουν σημαντικά την ανάπτυξη των εγκατεστημένων φυτών. Για να εξασφαλιστεί επαρκής βλαστική ικανότητα, η θερμοκρασία του εδάφους, θα πρέπει να είναι τουλάχιστον 18 °C.

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκε να μελετηθεί, η επίπτωση των χαμηλών θερμοκρασιών στην ανάπτυξη των φυταρίων μέσω της μελέτης της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης, ενός ενζύμου-κλειδιού στο μεταβολισμό του φυτού.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Η πειραματική διαδικασία.



2.2 Βλάστηση σπερμάτων και έκθεση των φυταρίων στο ψύχος.

Η βλάστηση των σπερμάτων του βαμβακιού έγινε μεταξύ υγραμένων φύλλων χαρτιού κουζίνας σε τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο κουτιά στο σκοτάδι, σε

θερμοκρασία 25°C. Έξι ημέρες μετά τη βλάστηση των σπερμάτων ακολουθούσε συλλογή, φωτογράφιση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν είτε για τομές είτε για την εκχύλιση των πρωτεϊνών (Εικ. 7). Παράλληλα, δείγματα απο μοιόμορφα βλαστημένα φυτάρια μεταφέρθηκαν στο ψυγείο στους 13°C, όπου και αφέθηκαν να αναπτυχθούν για επιπλέον πέντε ημέρες.

Μετά το πέρας της πρώτης, τρίτης και πέμπτης ημέρας στο ψύχος συλλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά δείγματα τα οποία φωτογραφήθηκαν και ακολούθησε εκχύλιση πρωτεϊνών.



Εικ. 7 . Αρτίβλαστα βαμβακιού που αναπτύχθηκαν σε συνθήκες απουσίας φωτός στους 25°C (δεξιά), και αρτίβλαστα μετά την τρίτη ημέρα στους 13 °C (αριστερά).

2.3 Η εκχύλιση του ενζύμου.

Αρχικά, σπέρματα βαμβακιού προβλαστήθηκαν με τον τρόπο και με τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω. Μετά από επτά ημέρες, έγιναν τομές των αρτίβλαστων ξεχωρίζοντας τα δείγματα σε ρίζες, κοτύλες και υποκοτύλια. Στη συνέχεια, τα δείγματα ζυγίστηκαν, ψύχθηκαν άμεσα με υγρό άζωτο και λειοτριβήθηκαν σε γουδί στους 4°C προσθέτοντας τον αντίστοιχο όγκο εκχυλιστικού ως εξής: 1,4:1 (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 στους 4°C. Στο εκχύλισμα των κοτυληδόνων παρατηρήθηκε συσσώρευση λιπιδίων στην επιφάνεια του υπερκείμενου υγρού. Γι' αυτό το λόγο το λίπος «αφαιρέθηκε» με χρήση πιπέτας και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν εκ νέου 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 δραστικότητας της SPS.

Πίνακας 5. Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών

Σχ. 1. Σχηματική παράσταση των διαδικασιών του

Tris-HCl pH 7.5	50mM
Γλυκερόλη	15%
BSA (πρωτεΐνη ορού μόσχου)	0.02%
Ανοιγμένη γλουταθειόνη	2mM
Πολυβινυλοπυρρολιδόνη	4%
Triton X	0.1%
Na ₂ SO ₃	20mM

2.4 Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της SPS κρίθηκε απαραίτητος ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με τη μέθοδο Bearden (1978).

Διάλυμα Bearden

- I. Ζύγιση 10mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva 17524).
- II. Το παραπάνω αραιώνεται σε 40ml 85% φωσφορικού οξέος.
- III. Προσθήκη 200ml αποσταγμένο νερό (dH₂O).
- IV. 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 ετοιμάστηκαν 3 σωλήνες για κάθε δείγμα (ρίζα, υποκοτύλιο, κοτύλη) που περιείχαν 1,5ml dH₂O, 100μl εκχυλίσματος και 1,5ml διαλύματος Bearden. Ως μάρτυρας

χρησιμοποιήθηκε ένας σωλήνας που περιείχε 1,5ml dH₂O και 1,5ml διαλύματος Bearden. Ακολούθως, μετρήθηκε η απορρόφηση των δειγμάτων 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 Η μέτρηση της δραστηριότητας της SPS.

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης έγινε σε δείγματα από ρίζες, υποκοτύλια και κοτύλες φυταρίων βαμβακιού για κάθε ημέρα ανάπτυξης στους 13°C και βασίστηκε στους Babb and Haigler (2001).

Σύμφωνα με τη μέθοδο, η SPS παράγει φωσφοροσακχαρόζη από UDP-γλυκόζη και φωσφοροφρουκτόζη. Συνεπώς, η δραστηριότητα της SPS μπορεί να μετρηθεί με μέσο που περιέχει UDP-γλυκόζη, φωσφοροφρουκτόζη και 6-φωσφορογλυκόζη, η οποία και θεωρείται ενεργοποιητής του ενζύμου. Για καθένα από τα 36 δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 200ml ενζυμικού εκχυλίσματος, 400ml απεσταγμένου νερού και 400ml διαλύματος προσδιορισμού της δραστηριότητας της SPS. Μετά την επώαση του ενζυμικού εκχυλίσματος με τα αντιδραστήρια για ορισμένο χρόνο, παράγεται φωσφοροσακχαρόζη. Ακολουθεί τοποθέτηση των δειγμάτων για 60min σε υδατόλουτρο στους 40°C και προσθήκη 200ml KOH με σκοπό τον τερματισμό της αντίδρασης και την απομάκρυνση των εξοζών. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν πάλι σε υδατόλουτρο για 10min στους 100°C και ακολούθησε προσθήκη 800ml HCl για την υδρόλυση της φωσφοροσακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 15000g για 15min. Επειδή στο εκχύλισμα των δειγμάτων παρατηρήθηκε συσσώρευση λιπιδίων στην επιφάνεια του υπερκείμενου υγρού, ακολούθησε φιλτράρισμα αυτών με τη χρήση ειδικών φίλτρων (CHROMAFILPET-20/15 MS, MACHEREY-NAGEL). Ακολούθησε προσθήκη 40ml 1% ρεσορκινόλης σε 30% HCl και τα δείγματα τοποθετήθηκαν και πάλι στο υδατόλουτρο για 10min στους 80°C. Η ρεσορκινόλη

αντιδρά με φρουκτόζη και παράγει ροζ χρώμα και μετά από 10min ακολούθησε η μέτρηση της δραστηκότητας της SPS στα 520nm. Όλες οι φωτομετρήσεις έγιναν με σπεκτροφωτόμετρο UV-160A (Shimadzu).

Το διάλυμα προσδιορισμού της δραστηκότητας της SPS, σύμφωνα με τους Babb and Haigler (2001) περιείχε:

Πίνακας 6. Διάλυμα προσδιορισμού δραστηκότητας της SPS

Hepes- NaOH pH 7.4	50mM
UDP-Glucose	8mM
6-P-Fructose	4mM
Glucose-6-P	20mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	10mM
EDTA	1mM
EGTA	0.4mM
Triton X	0.04%

**Ο μάρτυρας δεν περιείχε UDP-Glucose και 6-P-Fructose.*

2.6 Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% 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 40μg πρωτεΐνης από κάθε ιστό. Η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 70V για μία ώρα, 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, οι πηκτές φωτογραφήθηκαν.

Παρακάτω παρατίθενται πίνακες με τη σύσταση των διαλυμάτων.

Α. Πηκτή ανάλυσης (Resolving Gel) 8%T, 2.7%C	
Μητρικό διάλυμα Ακρυλαμιδίου, Bis-Ακρυλαμιδίου (30%, 2.7%)	2.87ml
Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης	2.50ml
Αποσταγμένο νερό	4.45ml
10% Υπερθειικό Αμμώνιο	50μl
TEMED	10μl

Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης	
Tris-HCl pH 8.9	378mM

B. Πηκτική 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% Υπερθεϊκό Αμμώνιο	150μl
TEMED	10μl

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης	
Tris-HCl pH 6.8	63mM

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών	
Tris	25mM
Γλυκίνη	192mM

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 2 φύλλων χαρτιού 3MM που έχει κορεσθεί με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Αφαίρεση τυχόν φυσαλίδων αέρα με χρήση πιπέτας.
- Τοποθέτηση των φύλλων νιτροκυτταρίνης και της πηκτής αντίστοιχα.
- Πάνω από αυτά τοποθετούνται 2 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.

Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.

- Κόβονται ταινίες νιτροκυτταρίνης από το φύλλο της νιτροκυτταρίνης αποφεύγοντας την επαφή με τα χέρια.
- Η λωρίδα αφήνεται να επιπλεύσει σε TBST (0.01% Tween 20) για 5min με τέτοιο τρόπο ώστε να μην παγιδευτεί αέρας.
- Δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της νιτροκυτταρίνης σε 1% ζελατίνης (BDH).
- Επώαση της ταινίας με πρωτογενές αντίσωμα (Rabbit polyclonal anti-SPS, Agrisera AS03 035A), με αραιώση 1:1000. Οι αραιώσεις γίνονται σε TBST 1% ζελατίνης. Επώαση όλη τη νύχτα σε 25°C.
- Ξέπλυμα των ταινιών με TBST 1% ζελατίνης.
- Απομάκρυνση της περίσσειας του πρωτογενούς αντισώματος με TBST 1% ζελατίνης, τρεις φορές επί 5min.
- Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος mouse anti-rabbit IgG (Fc) συζευγμένου με αλκαλική φωσφατάση σε αραιώση 1:5000 για 1h και 30min.
-

- Απομάκρυνση της περίσσειας του δευτερογενούς αντισώματος με TBST 1% ζελατίνης, τρεις φορές επί 5min.
- Ανίχνευση της β-αμυλάσης με την επώαση των ταινιών σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης για 3min παρουσία χρωμοφόρου.
- Αφυδάτωση και φύλαξη της νιτροκυτταρίνης μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.
- Φωτογράφιση της νιτροκυτταρίνης μέσω σάρωσής τους με επίπεδο σαρωτή.

2.7 Η ανοσοβιοχημική μελέτη - Επεξεργασία των ιστών.

Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν τομές από ρίζες, υποκοτύλια και κοτύλες από δείγματα που είχαν υποστεί την παρακάτω επεξεργασία:

Προσήλωση

Οι τομές από τα πέντε στάδια των κανονικών και παρθενοκαρπικών καρπών προσηλώθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα που περιείχε 4% παραφολμαλδεΐδη και 0,5% γλουταραλδεΐδη για χρονικό διάστημα 48h σε θερμοκρασία δωματίου.

Αφυδάτωση

Ακολούθως, οι τομές αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων αιθανόλης (50%, 70%, 80%, 90%, 95% και 100%) με σκοπό την απομάκρυνση του προσηλωτικού διαλύματος. Ο χρόνος εμβάπτισης των δειγμάτων στα παραπάνω διαλύματα ήταν για μία ώρα το καθένα εκτός από την καθαρή αλκοόλη όπου και παρέμειναν για 3h.

Διαφανοποίηση

Στη συνέχεια, ακολούθησε απομάκρυνση της αλκοόλης από τα δείγματα με εμβάπτισή τους σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ξυλένιου, διαδοχικά ως εξής:

- 25% ξυλένιο – 75% αιθανόλη
- 50% ξυλένιο – 50% αιθανόλη
- 75% ξυλένιο – 25% αιθανόλη και
- 100% ξυλένιο.

Τα τρία πρώτα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για χρονικό διάστημα μίας ώρας το καθένα, ενώ εκείνο του καθαρού ξυλένιου χρησιμοποιήθηκε για τρεις εμβαπτίσεις της μίας ώρας.

Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη

Στις τομές των οργάνων των αρτιβλάστων βαμβακιού που βρίσκονταν μέσα σε μικρά γυάλινα δοχεία με ξυλένιο, προστέθηκαν μικρά τεμάχια παραφίνης (Paramat BDH) σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το λιώσιμό της (2 με 3 κόκκοι την κάθε φορά) ακολούθησε διαδοχική προσθήκη παραφίνης μέχρι να διαπιστωθεί πως αυτή δεν μπορούσε να διαλυθεί περαιτέρω. Κατόπιν τα μικρά δοχεία μεταφέρθηκαν στους 42°C (hot plate), όπου συνεχίστηκε η προσθήκη παραφίνης έως ότου επέλθει κορεσμός του διαλύματος. Στη συνέχεια, το μίγμα παραφίνης-ξυλένιου μεταφέρθηκε στους 60°C. Η λιωμένη παραφίνη αντικαταστάθηκε με καινούργια τρεις φορές τουλάχιστον. Για τον εγκλεισμό των δειγμάτων σε παραφίνη δημιουργούσαμε με τη βοήθεια μεταλλικών πλακών και εκμαγείων, σχήματα κύβου μέσα σε δοχεία που περιείχαν θρυμματισμένο πάγο. Σε αυτά τοποθετούσαμε τα δείγματα με τον προσανατολισμό που θέλαμε να έχουμε και περιμέναμε έως ότου πήξει η παραφίνη και δημιουργηθούν οι κύβοι. 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

- Οι αντικειμενοφόροι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν πλένονται σε διάλυμα 1% SDS (Sodium Dodecylsulfate) για 2h περίπου, για να απομακρυνθούν από αυτές οι τυχόν λιποδιαλυτές ουσίες.
- Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό σε συνεχή ροή.
- Ακολουθεί πλύσιμό τους, επίσης για 2h, σε διάλυμα 5% HCl.
- Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό.
- Ακολουθεί εμβάπτισή τους σε διάλυμα 1% w/v πολυλυσίνης (10ml πολυλυσίνη-Sigma Polyglycine HCl και 90ml απεσταγμένο νερό).
- Τέλος, αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου καλυμμένες με χαρτί για 2 ημέρες.

Μικροτομήσεις

Αρχικά ο κύβος διαμορφωνόταν σε σχήμα κολουρης πυραμίδας. Το δείγμα τοποθετείται σε χειροκίνητο μικροτόμο (LEIKA). Οι τομές που έγιναν ήταν πάχους 10μm εξαιτίας του μικρού μεγέθους των κυττάρων. Στην αρχή κάναμε ορισμένες δοκιμαστικές τομές. Μετά τη λήψη συγκεκριμένου αριθμού τομών, τις τοποθετούσαμε στις αντικειμενοφόρους. Ακολούθησε επιλογή των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι επιλεγμένες τομές τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους επεξεργασμένες με πολυλυσίνη. Στις αντικειμενοφόρους που περιείχαν αντιπροσωπευτικές τομές, χαράσσονταν αριθμοί για την αναγνώρισή τους και διευκόλυνση του πειράματος. Σε αυτές προστέθηκε μικρή ποσότητα αποσταγμένου νερού κατά τέτοιο τρόπο ώστε οι τομές να επιπλέουν στις αντικειμενοφόρους. Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε θερμαινόμενη πλάκα στους 42°C. Μετά την πάροδο 10min το νερό αφαιρέθηκε προσεκτικά με απορροφητικό χαρτί και οι αντικειμενοφόροι παρέμειναν στους 42°C για 48h για να εξατμιστεί το νερό και να προσκολληθούν οι τομές στις αντικειμενοφόρους και μετά φυλάσσονταν σε ειδικά κουτιά.

Αποπαραφίνωση

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

- 100% ξυλένιο για 10 λεπτά (x2)
- 75% ξυλένιο – 25% αλκοόλη για 10 λεπτά
- 50% ξυλένιο – 50% αλκοόλη για 10 λεπτά
- 25% ξυλένιο – 75% αλκοόλη για 10 λεπτά και
- 100% αλκοόλη για 10 λεπτά.

Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν σε μικροσκόπιο Zeiss AxioLab με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Canon, Powershot A620.

2.8 Ο ανοσοεντοπισμός της SPS στις τομές.

Μετά την αποπαραφίνωση ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Οι τομές καλύπτονται με διάλυμα δεσμεύσεως μη ειδικών θέσεων και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h.
- Ακολουθεί επώαση των τομών σε 1:1000 αραίωση του πρωτογενούς αντισώματος (Agrisera AS03 035A), σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST με 1% BSA (πρωτεΐνη ορού μόσχου), και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για τουλάχιστον 12h σε θερμοκρασία 4°C.
- Το μη δεσμευμένο αντίσωμα ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα TBST για 15min 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 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα προέρχεται από ποντίκι έναντι των αντισωμάτων κουνελιών (IgG).
- Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος ξεπλένεται με διάλυμα TBST για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές εξισορροπούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης αλκαλικής φωσφατάσης για 2min, και καλύπτονται με διάλυμα χρωματικής αντίδρασης.
- 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 70%, 90%, 95% και δύο φορές σε 100% για ένα λεπτό σε κάθε διάλυμα.
- Τέλος, αφού στεγνώσουν καλά οι τομές, καλύπτονται με DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας, ώστε να μονιμοποιηθούν.

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

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

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών	
Tris	24mM
Γλυκίνη	192mM
Μεθανόλη	20%

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης	
Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης αλκαλικής φωσφατάσης	10ml
5-βρωμο-3-χλωρο-ινδολυλο-φωσφορικό (BCIP)	33μl
Νιτρομπλέ του τετραζολίου (NBT)	66μl

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης αλκαλικής φωσφατάσης	
Tris-HCl pH 9.5	10mM
NaCl	100mM
MgCl ₂	50mM

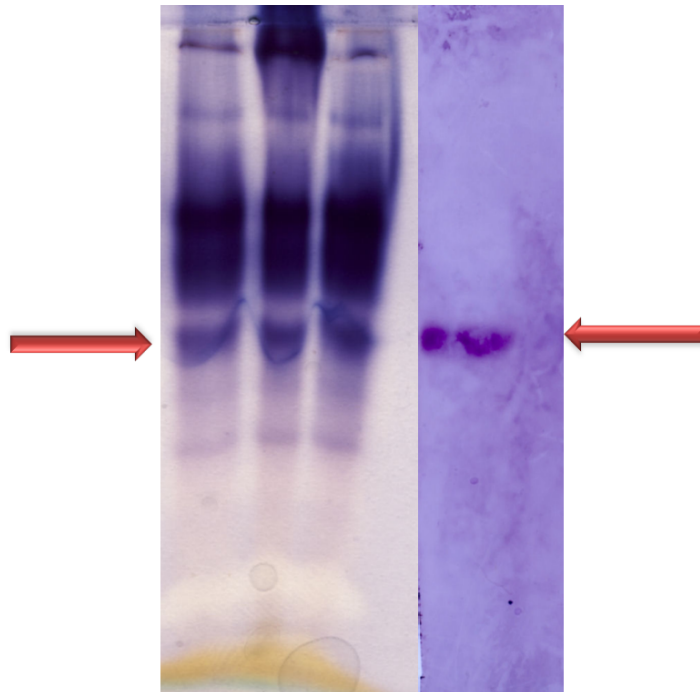


3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3. Η δραστηριότητα της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης στα εκχυλίσματα οργάνων.

3.1 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων.

Για τον έλεγχο της καταλληλότητας των αντισωμάτων χρησιμοποιήθηκαν εκχυλίσματα κοτυλών. Οι φωτογραφίες των ηλεκτροφορημάτων των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών παρατίθενται στην **Εικ. 8**. Στην αριστερή πλευρά φαίνεται φωτογραφία του ηλεκτροφορήματος των ολικών πρωτεϊνών χρωματισμένο με Coomassie. Δεξιά, παρουσιάζεται μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών και ανοσοεντοπισμό του ενζύμου.

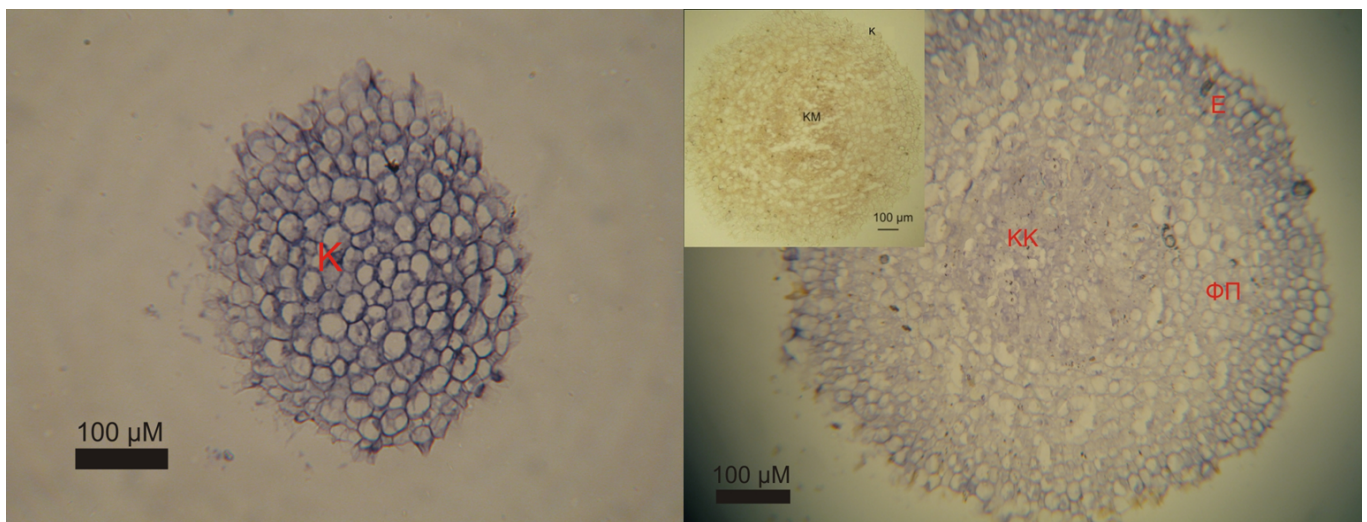


Εικ. 8. Ανοσοεντοπισμός της SPS σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

Τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα κατά της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης αναγνώρισαν ένα πεπτίδιο (βέλη).

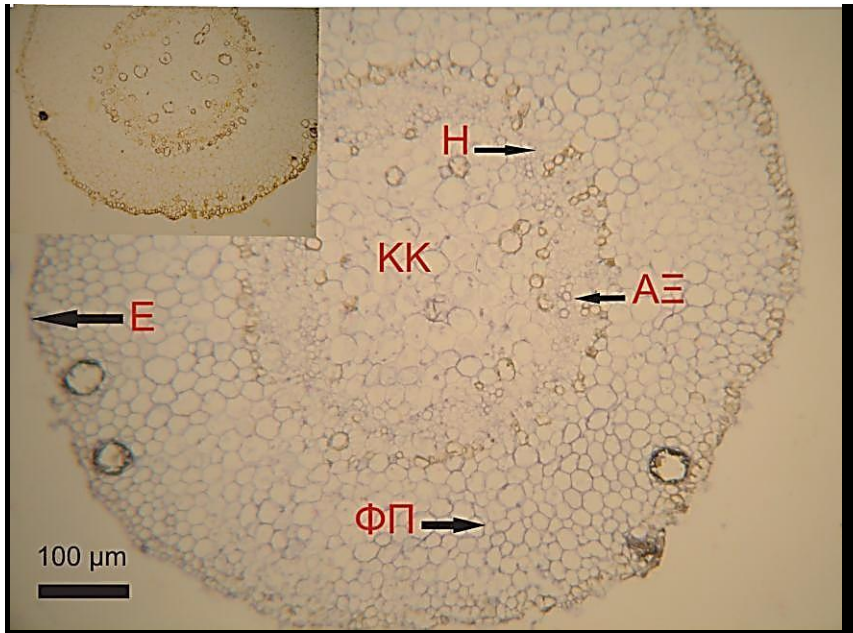
3.2 Ανοσοεντοπισμός της SPS.

Ο ανοσοεντοπισμός της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης δείχνει τους ιστούς στους οποίους κατά τη στιγμή της προσήλωσης υπάρχει το ένζυμο καθώς και τη σχετική αφθονία του. Η παρουσία μωβ-μπλε χρωματισμού σηματοδοτεί την παρουσία της συνθάσης της SPS στους φυτικούς ιστούς. Το ένζυμο εντοπίστηκε σε εγκάρσιες τομές ρίζας, υποκοτυλίου και των κοτυλών. Ο ανοσοεντοπισμός του ενζύμου στις ρίζες, σε εγκάρσιες τομές στην περιοχή του ακρορριζίου, έδειξε ότι παρατηρείται έντονος χρωματισμός στην καλύπτρα (Κ) καθώς και σε όλους τους ιστούς του ακρορριζίου (ΚΚ, κεντρικός κύλινδρος, ΦΠ φλοιώδες παρέγχυμα Ε, επιδερμίδα) (Εικ. 9.).

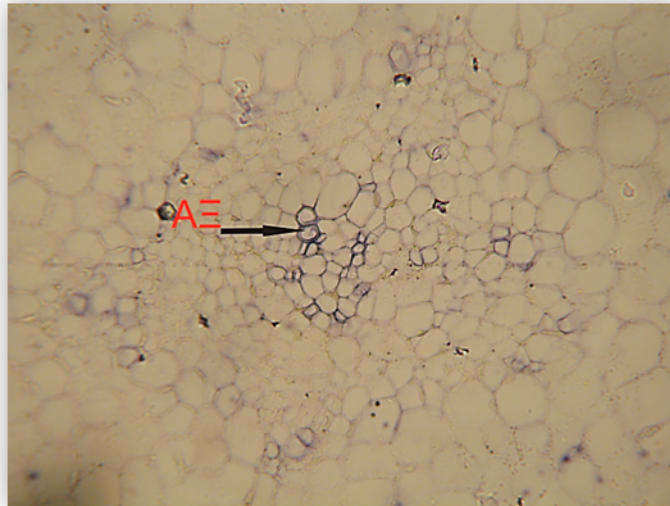


Εικ. 9. Εγκάρσιες τομές ρίζας. Αριστερά τομή από την περιοχή της καλύπτρας με έντονο χρωματισμό και δεξιά τομή από το ακρορριζίο με χρωματισμό στον κεντρικό κύλινδρο (ΚΚ), στο φλοιώδες παρέγχυμα (ΦΠ) και στην επιδερμίδα (Ε).

Στο υποκοτύλιο (Εικ. 10) η SPS εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και λιγότερο στην εξωτερική στοιβάδα του φλοιώδους παρεγχύματος (ΦΠ). Στην περιοχή της ηθμαγγειώδους δεσμίδας (Εικ. 11) το σήμα είναι εντονότερο στα αυξανόμενα αγγεία του ξύλου (ΑΞ).

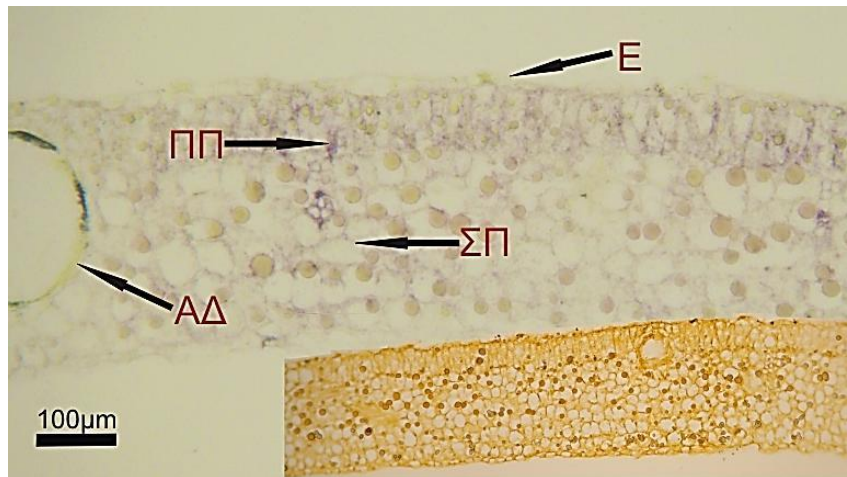


Εικ. 10. Εγκάρσια τομή υποκοτυλίου. Παρατηρείται χρωματισμός στις ημιαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και λιγότερο στην εξωτερική στοιβάδα του φλοιώδους παρεγχύματος (ΦΠ)

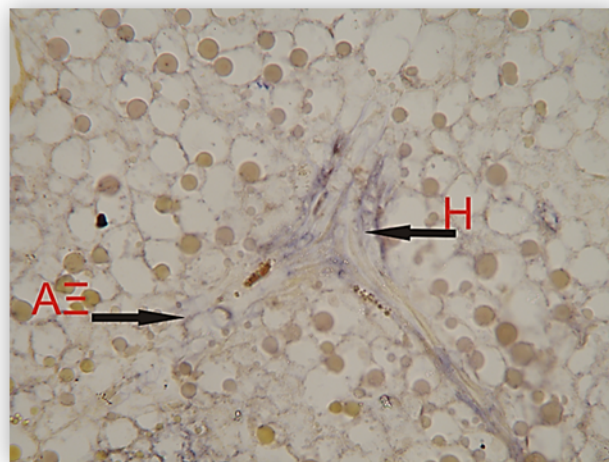


Εικ. 11. Εγκάρσια τομή υποκοτυλίου σε μεγέθυνση 40x. Παρατηρείται χρωματισμός στα αυξανόμενα αγγεία του ξύλου (ΑΞ)

Στις κοτυληδόνες, παρατηρείται γενικευμένος εντοπισμός της SPS σε όλη τη τομή με τα ένζυμα να εντοπίζονται έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) (**Εικ. 12**) καθώς και στο πασσαλώδες παρέγχυμα (ΠΠ) και με σχετικά χαμηλότερο σήμα στις στοιβάδες του σπογγώδους παρεγχύματος (ΣΠ) (**Εικ. 13**).



Εικ. 12. Εγκάρσια τομή κοτυληδόνας. Παρατηρείται χρωματισμός στο πασσαλώδες παρέγχυμα (ΠΠ) και σχετικά χαμηλότερο σήμα στις στοιβάδες του σπογγώδους παρεγχύματος (ΣΠ).



Εικ. 13. Επιμήκης τομή στην κοτύλη σε μεγέθυνση. Παρατηρείται χρωματισμός στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ).

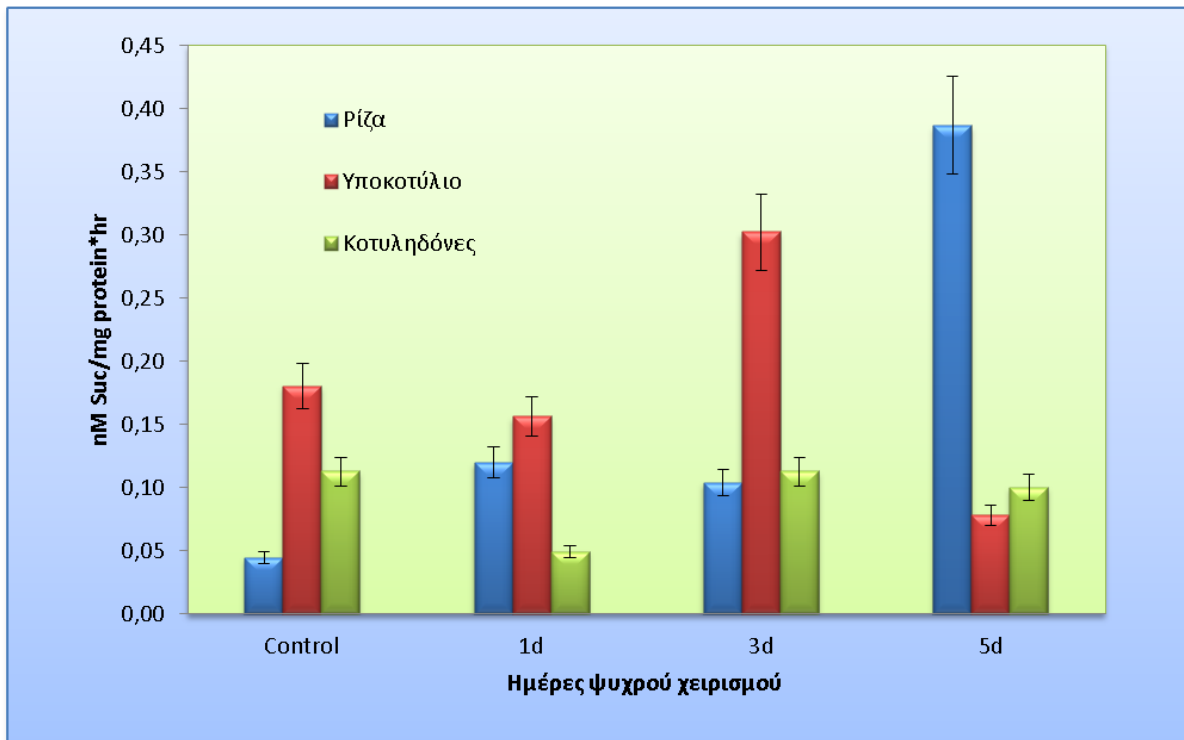
3.3 Ο προσδιορισμός της *in vitro* δραστηρότητας της SPS.

Η δραστικότητα της συνθάσης της φωσφορογλυκόζης προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε τρεις επαναλήψεις στα δείγματα από τρία διαφορετικά φυτικά όργανα σε τέσσερα διαφορετικά χρονικά διαστήματα παραμονής στους 25°C και 13°C.

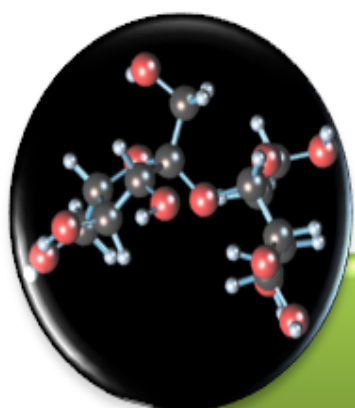
Οι μετρήσεις στα δείγματα ρίζας, έδειξαν ότι την πρώτη ημέρα παραμονής στους 13°C, η SPS εμφανίζει τριπλάσια αύξηση στη δραστικότητά της συγκριτικά με το μάρτυρα των 25°C. Την τρίτη ημέρα, παρατηρείται μία ανεπαίσθητη μείωση της δραστικότητας ενώ την πέμπτη ημέρα όμως, φαίνεται μία απότομη αύξηση σχεδόν, τετραπλάσια από αυτή της τρίτης ημέρας.

Στο υποκοτύλιο, την πρώτη ημέρα, παρατηρείται μία ελαφριά μείωση της δραστικότητας του ενζύμου συγκριτικά με το μάρτυρα, αλλά την τρίτη ημέρα διπλασιάζεται και την πέμπτη ημέρα, παρουσιάζεται κατακόρυφη πτώση.

Στις κοτύλες κατά την πρώτη ημέρα παραμονής στους 13°C, η δραστικότητα της SPS υποδιπλασιάζεται συγκριτικά με το μάρτυρα. Την τρίτη ημέρα διπλασιάζει την δραστικότητά της σε σχέση με την πρώτη ημέρα και φθάνει στο ίδιο επίπεδο με την δραστικότητά στο μάρτυρα και συνεχίζει να παραμένει σταθερή και την πέμπτη ημέρα στους 13°C.



Διάγραμμα 1. Ηδραστικότητα της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης σε διάρκεια 5 ημέρων παραμονής στους 13 °C.



4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

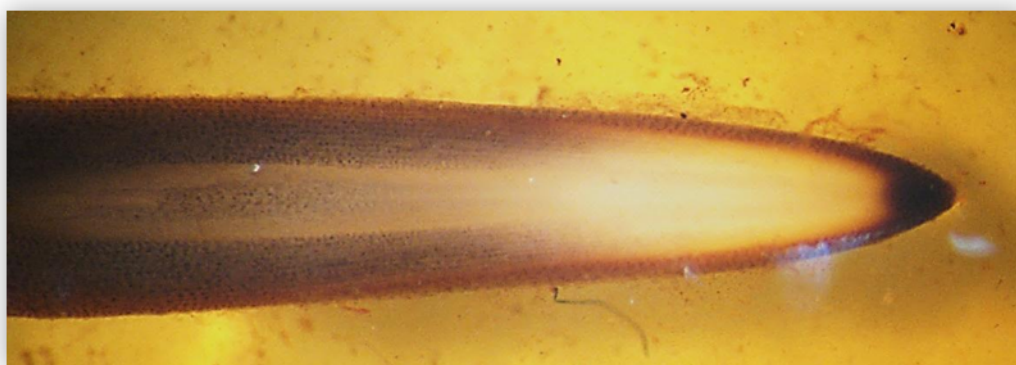
Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης καταλύει μία σημαντική και ρυθμιζόμενη αντίδραση στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της σακχαρόζης τόσο στους αυτότροφους όσο και στους ετερότροφους ιστούς (Stitt *et al.*, 1987). Στους φωτοσυνθετικούς ιστούς το ένζυμο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης σακχαρόζης και του ρυθμού καθήλωσης του CO₂, καθώς και στο ρυθμό με τον οποίο ο άνθρακας διακινείται από το χλωροπλάστη, μέσω της επίτευξης μιας ισορροπίας ανάμεσα σε μηχανισμούς μείωσης της 2,6 διφωφορο-φρουκτόζης (και συνεπώς ενεργοποίησης της SPS) και μηχανισμών ανάδρομης ανάσχεσης που αυξάνουν την 2,6 διφωφορο-φρουκτόζη και αναστέλλουν τη δραστικότητα της SPS (Obiadalla-Ali *et al.*, 2003).

Τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού έδειξαν ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην καλύπτρα (**Εικ. 9**) και σε όλους του ιστούς του ακρορριζίου (**Εικ. 9**), στο φλοιώδες παρέγχυμα του υποκοτυλίου (**Εικ. 10**) και στο μεσόφυλλο των κοτυλών (**Εικ. 12**). Ιδιαίτερα έντονο ήταν το σήμα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (**Εικ. 13**).

Οι Cheng *et al.* (1996) ανοσοεντόπισαν την SPS σε εγκάρσιες τομές φύλλων αραβόσιτου. Στις τομές από τα νεαρά πράσινα φύλλα (ηλικίας 7 έως 10 ημερών) το σήμα εντοπισμού ήταν έντονο κυρίως στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού και λιγότερο στα κύτταρα του μεσόφυλλου. Αντίθετα, στα ώριμα φύλλα (ηλικίας 6 εβδομάδων) το ένζυμο εντοπίστηκε εξίσου τόσο στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού όσο και στα κύτταρα του μεσόφυλλου. Επίσης, οι Lunn and Furbank (1997) μελέτησαν τον εντοπισμό του ενζύμου στα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα των C4 φυτών και ανέφεραν ότι στον αραβόσιτο και στο φυτό *Atriplex spongiosa* F. Muell., η SPS εντοπίστηκε σχεδόν αποκλειστικά στα κύτταρα του μεσόφυλλου. Σε άλλα είδη, το ένζυμο εντοπίστηκε σε διάφορους ιστούς, με τη δραστικότητα στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού να κυμαίνεται από 5% της ολικής δραστικότητας του φύλλου στο *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. και μέχρι 35% στο *Sorghum bicolor* Moench. Επίσης, οι Pagnussat *et al.* (2000) αναφέρουν διαφορετικά σημεία εντοπισμού της SPS πρωτεΐνης σε ιστούς από φωτοσυνθετικά και εκχλωιωτικά φύλλα ρυζιού (*Oryza sativa*). Ισχυρά σήματα εντοπίστηκαν στην επιδερμίδα και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και ασθενή στα κύτταρα του μεσόφυλλου στα εκχλωιωτικά

φύλλα. Αντίθετα, στα ώριμα φύλλα η παρουσία της SPS πρωτεΐνης στους ιστούς του μεσόφυλλου ήταν χαρακτηριστικά υψηλότερη σε σχέση με τα νεαρά και τα εκχλωτικά φύλλα, αλλά στα κύτταρα της επιδερμίδας και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες μόλις που ανιχνεύτηκε.

Στις ρίζες δεν υπάρχουν αναφορές σχετικές με τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης. Δραστικότητα όμως του ενζύμου έχει μετρηθεί τόσο σε διαγονιδιακά όσο και σε φυτά αγρίου τύπου (Galtier 1993). Ο ρόλος που αποδίδεται στο ένζυμο είναι η σύνθεση της σακχαρόζης από την υδρόλυση του αμύλου (Ohsugi, 1987). Ο προτεινόμενος αυτός ρόλος της SPS είναι δυνατόν να ερμηνεύσει την παρουσία του ενζύμου τόσο στην καλύπτρα όσο και στους υπόλοιπους ιστούς του ακρορριζίου, δεδομένης της παρουσίας του αμύλου σε αυτές τις περιοχές της ρίζας (Εικ. 14).



Εικόνα 14. Επιμήκης τομή ρίζας βαμβακιού. Εντοπισμός αμύλου με διάλυμα KI-I. Το άμυλο εντοπίζεται στην καλύπτρα, την επιδερμίδα και το φλοιώδες παρέγχυμα του ακρορριζίου.

Παρόμοιος θα μπορούσε να είναι ο ρόλος του ενζύμου και στο φλοιώδες παρέγχυμα του αναπτυσσόμενου υποκοτυλίου. Στο όργανο αυτό η δραστικότητα της SPS έχει συσχετιστεί με την αύξηση των αγγείων του ξύλου σε εκχλωτικά υποκοτύλια φασολιού (Babb, 2001). Τα δεδομένα αυτά ερμηνεύουν και την παρουσία της πρωτεΐνης στα αναπτυσσόμενα αγγεία του ξύλου.

Δεδομένης της μή ανίχνευσης αμύλου (μέσω της αντίδρασης με το ιώδιο) στις κοτυληδόνες του βαμβακιού είναι δυνατόν να λεχθεί ότι το ένζυμο σχετίζεται με τη σύνθεση της σακχαρόζης από τα προϊόντα της γλυκονεογένεσης. Η γλυκονεογένεση είναι γνωστό ότι συμβαίνει κατά τη βλάστηση των ελαιούχων σπερμάτων, όπως και το βαμβάκι κατά τη βλάστησή τους (Kobr and Beevers, 1971).

Το ότι το ένζυμο υπάρχει στους ιστούς που το εντοπίσαμε, ενισχύεται από το γεγονός ότι στη βάση δεδομένων GENEVESTIGATOR ανιχνεύτηκε η έκφραση και των τεσσάρων γονιδίων του *Arabidopsis* σε διαφορετικό βαθμό στους διαφόρους ιστούς του φυτού (Πίνακας 3).

Πίνακας 7. Ενταση σήματος μεταγραφημάτων ιστών του *Arabidopsis thaliana*

Ιστός	AT5G20280	AT5G11110	AT4G10120	AT1G04920
Καλύπτρα	483	2463	28	78
Ακρορρίζιο	1250	1121	166	54
Κοτυληδόνες	3565	444	3071	152
Υποκοτύλιο	1386	851	60	38

Η δραστικότητα του ενζύμου.

Σε πολλά φυτά η ενεργή κατάσταση της SPS στα φύλλα, αυξάνει στο φώς και μειώνεται στο σκοτάδι. Στα φύλλα του σπανακιού η SPS (A-οικογένεια) απενεργοποιείται στο σκοτάδι με φωσφορυλίωση στη θέση Ser158, και καταλύεται από διάφορες πρωτεϊνικές κινάσες, όπως η εξαρτώμενη από Ca^{+2}

πρωτεϊνική κινάση (CDPK) και η σχετιζόμενη με την SNF1 πρωτεϊνική κινάση [94]. Επιπλέον, η SPS των φύλλων του σπανακιού περιέχει μία δεύτερη θέση φωσφορυλίωσης στη θέση Ser424, παρόμοια με αυτή της Ser158, που σχετίζεται με την ενεργοποίηση του ενζύμου υπό συνθήκες ψυχρής μεταχείρισης ή ωσμωτικής καταπόνησης. Όμως, σε αυτή την περίπτωση, η φωσφορυλίωση στη θέση Ser424 ενεργοποιεί την SPS. Όλες οι γνωστές SPS των οικογενειών A-, B- και C-, έχουν αυτό το πρότυπο εκτός από τη D- οικογένεια SPSs στα αγρωστώδη και την οικογένεια B- της SPS των δικότυλων φυτών.

Οι Rosa *et al.* (2009) αναφέρουν ότι στις κοτύλες αρτιβλάστων του *Chenopodium* που αναπτύχθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες, η δραστηριότητα της SPS έδειξε αρχικά μία ταχεία αύξηση μέχρι την τέταρτη ημέρα μετά το χειρισμό, φθάνοντας μια μέγιστη τιμή των $2,28 \text{ mmol g}^{-1} \text{ DW min}^{-1}$ (2,2 φορές υψηλότερη από το μάρτυρα), ακολουθούμενη από μια σταδιακή μείωση μέχρι την ένατη ημέρα. Μετά από αυτό, η δραστηριότητα της SPS έδειξε μια βραδεία αύξηση έως το τέλος της δέκατης πέμπτης ημέρας. Το ίδιο σχεδόν πρότυπο μεταβολής της δραστηριότητας του ενζύμου παρατηρήθηκε και στα δικά μας πειράματα (**Διάγραμμα 1**). Η δραστηριότητα της SPS φαίνεται να συσχετίζεται θετικά με τη σύνθεση σακχαρόζης, όπως διαπιστώνουν οι Guy *et al.* (1992) και Djanaguiraman *et al.* (2006), οι οποίοι αναφέρουν αύξηση της δραστηριότητας της SPS και της συγκέντρωσης της σακχαρόζης σε καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών ή αλατότητας (Djanaguiraman *et al.* 2006; Marangoni *et al.*, 1997; Nykiforuk *et al.*, 1999; Rosa *et al.*, 2004). Οι Rosa *et al.* (2009) έδειξαν επίσης ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες επάγουν τη σύνθεση πολυολών και κυκλιτολών από άμυλο και σακχαρόζη (Gill *et al.*, 2003; Gounaris *et al.*, 2001). Οι ερευνητές προτείνουν ότι οι αλλαγές στα επίπεδα των υδατανθράκων, μπορεί να έχουν ικανότητα προσαρμογής, επιτρέποντας στα αρτίβλαστα να επιβιώσουν σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών (Toit *et al.*, 2004; Nykiforuk *et al.*, 1999; Rejskova *et al.*, 2007; Rosa *et al.*, 2004)

Μελέτες του ενζύμου σε υποκοτύλια φυτών που έχουν χειριστεί υπό χαμηλές θερμοκρασίες δεν έχουν εντοπιστεί στη διεθνή βιβλιογραφία. Από τα πειραματικά δεδομένα μας, φαίνεται σημαντική αύξηση της δραστηριότητας του

ενζύμου την τρίτη ημέρα του ψυχρού χειρισμού των φυτών, η οποία είναι δυνατόν να αποδοθεί στην αυξημένη σύνθεση της σακχαρόζης στο όργανο αυτό για την αντιμετώπιση της ψυχρής καταπόνησης.

Έρευνες μεταβολής της δραστικότητας του ενζύμου στο ριζικό σύστημα των φυτών αφορούν μόνο τα αγρωστώδη. Οι Santoiani *et al.*, (1993) αναφέρουν ότι η δραστικότητα της SPS αυξήθηκε κατά τέσσερις φορές μετά από 4 ημέρες χειρισμού των φυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες και συνεχίζει να αυξάνει μέχρι τη δέκατη ημέρα όπου και 14πλασιάζεται. Αντίστοιχο πρότυπο δραστικότητας του ενζύμου διαπιστώθηκε στις ρίζες του βαμβακιού όπου μετρήθηκε 4πλάσια αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου μετά από χειρισμό των φυτών για πέντε ημέρες στις χαμηλές θερμοκρασίες (**Διάγραμμα 1**). Η αύξηση της δραστικότητας της SPS, μπορεί να σχετίζεται με την επανασύνθεση της σακχαρόζης, πιθανόν από άμυλο. Παράλληλα είναι δυνατόν να χρησιμοποιείται για τη σύνθεση φρουκτοζύλο σακχαρόζης από την SST (συνθάση της φρουκτόζυλο-σακχαρόζης) και να καταλήγει στη σύνθεση μεγαλύτερου μοριακού βάρους φρουκτανών που συσσωρεύονται κατά τα τελευταία στάδια της ψυχρής μεταχείρισης (Santoiani, 1993).

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Ο ψυχρός χειρισμός των αρτιβλάστων βαμβακιού, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστικότητάς της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης σε διαφορετικό βαθμό στο ακρορρίζιο, στο υποκοτύλιο και στις κοτυληδόνες.
- Το ένζυμο εντοπίζεται έντονα στην καλύπτρα. Μικρότερη ένταση σήματος στον κεντρικό κύλινδρο, το φλοιώδες παρέγχυμα και την επιδερμίδα του ακρορριζίου.
- Στο υποκοτύλιο, το ένζυμο εντοπίζεται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες - στα αγγεία του ξύλου - και δευτερευόντως στο φλοιώδες παρέγχυμα.
- Στις κοτυληδόνες, το ενζύμο ανιχνεύεται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, στο πασσαλώδες παρέγχυμα και με ασθενέστερο σήμα στο σπογγώδες παρέγχυμα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΔΙΕΘΝΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Avigad G, Dey PM** (1997) Carbohydrate metabolism: Storage carbohydrates. in: plant biochemistry (ed. Dey PM & Harborne JB). *Academic Press* 143–204
- Babb VM, Haigler CH** (2001) Sucrose phosphate synthase activity rises in correlation with high rate cellulose synthesis in three heterotrophic systems. *Plant Physiol* **127**: 1234-1242
- Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst, MJ and McCammon JA** (2001). Electrostatics of nano systems: Application to microtubules and the ribosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 10037–10041.
- Baxter CJ, Foyer CH, Rolfe SA, Quick WP** (2001) A comparison of the carbohydrate composition and kinetic properties of sucrose phosphate synthase (SPS) in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves expressing maize SPS protein with untransformed controls. *Ann Appl Biol* **138**: 47-55
- Bearden JC** (1978) Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved proteindye binding assay. *Biochi & Biophys Acta* **533**: 525-529
- Bewley J, Black M** (1994) Seeds: Physiology of Development and Germination, 2nd ed. *New York: Plenum*. pp. 112
- Blazquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR, Weigel D** (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the LEAFY promoter. *Plant Cell* **10**: 791-800
- Brubaker C, Bourland F, Wendel J** (1999) The origin and domestication of cotton. In Cotton: Origin, History, Technology, and Production, Smith C, Cothren J, 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
- Cakmak I, Hengeler C, Marschner H** (1994) Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. *J Exp Bot* **45**: 1251-1257
- Castleden CK, Aoki N, Gillespie VJ, MacRae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT, Lunn JE** (2004) Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. *Plant Physiol* **135**: 1–12

- Castrillo, M** (1992) Sucrose metabolism in bean plants under water deficit. *J Exp Botany* **43**:1557-1561
- Chen F, Bradford K** (2000) Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol* **124**: 1265–1274
- Chen S, Hajirezaei M and Bornke F** (2005) Differential expression of sucrose-phosphate synthase isoenzymes in tobacco reflects their functional specialization during dark-governed starch mobilization in source leaves. *Plant Physiology* **139**: 1163–1174
- Cheng WH, Im KH, Chourey PS** (1996) Sucrose-phosphate synthase expression at the cell and tissue level is coordinated with sucrose sink-to-source transition in maize leaf. *Plant Physiol* **111**: 1021-1029
- 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
- Chua TK, Bujnicki JM, Tan TC, Huynh F, Patel BK, Sivaramana J** (2008) The structure of sucrose phosphate synthase from *Halothermothrix orenii* reveals its mechanism of action and binding mode. *Plant Cell* **20**: 1059-1072
- Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA** (2001) Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem J* **354**: 67-72
- Cole DF, Christiansen MN** (1975) Effect of chilling duration on germination of cottonseed. *Crop Sci* **15**: 410-412
- Davoren JD, Nykiforuk CL, Laroche A, Weselake RJ** (2002) Sucrose-induced changes in the transcriptome of cell suspension cultures of oilseed rape reveal genes associated with lipid biosynthesis. *Plant Physiol Biochem* **40**: 719-725
- 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
- DeLano WL** (2002) The PyMOL Molecular Graphics System. (San Carlos, CA: Delano Scientific).
- Demchenko NP** (1989) Changes in DNA content in the cells of phloem complex of the wheat root during their development. *Tsitologiya* **31**: 664–676
- Djanaguiraman M, Sheeba JA, Shanker AK, Devi DD, Bangarusamy U** (2006) Rice
- Doehlert DC, Huber SC** (1985) The role of sulfhydryl groups in the regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase. *Biochim Biophys Acta* **830**: 267-273
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K, Scheres B** (1993) Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71–84
- Douglas P, Pigaglio E, Ferrer A, Halford NG, MacKintosh C** (1996) Three spinach leaf nitrate reductase/3-hydroxy-3-methylglutarylCoA reductase kinases that are

- regulated by reversible phosphorylation and/or calcium ions. *Biochem J* **325**: 101-109
- 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
- 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
- Echeverria E, Salvucci ME, Gonzalez P, Paris G, Salerno G** (1997) Physical and kinetic evidence for an association between sucrose phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase. *Plant Physiol* **115**: 223–227
- 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
- Footitt S, Slocombe SP, Larner 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
- Fulda M, Schnurr J, Abbadì 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
- Galtier N, Foyer CH, Huber J, Voelker TA, Huber SC** (1993) Effects of elevated sucrose phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var. UC82B). *Plant Physiol* **101**: 535-543
- Gaudin V, Lunness PA, Fobert PR, Towers M, Riou-Khamlichi C, Murray JAH, Coen E, Doonan JH** (2000) The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene. *Plant Physiol* **122**: 1137-1148
- Geigenberger P, Krause KP, Hill LM, Reimholz R, MacRae E, Quick P, Sonnewald U, Stitt M Eds.** (1995) The regulation of sucrose synthesis in leaves and tubers of potato plants in: Sucrose Metabolism, Biochemistry, *Physiology and Molecular Biology*. Rockville, MD, American Society of Plant Physiologists
- 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
- Gibbon Y, Blasing oe, Palacios-Rojas N et al.** (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. *The Plant Journal* **39**: 847-862

- Gibson RP, Lloyd RM, Charnock SJ, Davies GJ** (2002) Characterization of *Escherichia coli* OtsA, a trehalose-6-phosphate synthase from glycosyltransferase family 20. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **58**: 349-351
- Gill PK, Sharma AD, Singh P, Bhullar SS** (2003) Changes in germination, growth and soluble sugar contents of *Sorghum bicolor* (L.) Moench seeds under various abiotic stresses. *Plant Growth Regul* **40**: 157–162
- 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* pp 793-819
- 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
- 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
- Guy CL, Huber JL, Huber SC** (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. *Plant Physiol* **100**: 502-508
- 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
- Hendrix DL, Huber SC** (1986) Diurnal fluctuations in cotton leaf carbon export, carbohydrate content, and sucrose synthesizing enzymes. *Plant Physiol* **81**: 584-586
- Hennig L, Grisse W, Grossniklaus U and Kohler C** (2004) Transcriptional programs of early stages of plant reproduction. *Plant Physiology* **135**: 1765-1775
- Holaday AS, Martindale W, Alred R, Brooks A, Leegood RC** (1992) Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. *Plant Physiol* **98**: 1105-1114
- Huber JL, Huber SC** (1992a) Site-specific serine phosphorylation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. *Biochem J* **283**: 877-882

- Huber SC, Huber JL** (1990) In vitro phosphorylation and inactivation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase by an endogenous protein kinase. *Biochim Biophys Acta* **1091**: 393-400
- Huber SC, Huber JL** (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **47**: 431-444
- Huber SC, Huber JL, Kaiser WM** (1994a) Differential response of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase-activation to inorganic and organic salts, in vitro and *in situ*. *Plant Physiol* **92**: 302-310
- Huber SC, Kerr PS, Kalt-Torres W** (1985) Regulation of sucrose formation and movement. In: Regulation of Carbohydrate Partitioning in Photosynthetic Tissue. (ed. Preiss J & Heath R). *Waverly Press, Baltimore, MD*. pp. 199-214
- Huber SC, McMichael RW, Jr. Bachmann M, Huber JL, Shannon JC, Kang KK, Paul M** (1996) Regulation of leaf sucrose phosphate synthase and nitrate reductase by reversible protein phosphorylation. In: Protein Phosphorylation in Plants. (ed. Shewry PR, Halford NG, Hooley R). *Clarendon Press, Oxford*. pp. 19-34
- Hurry VM, Strand A, Furbank R and Stitt M** (2000) The role of phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the pho mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **24**: 383-396
- Hurry VM, Strand A, Tobiaeson M, Gardestrom P and Oquist G** (1995) Cold hardening of spring and winter wheat and rape results in differential effects on growth, carbon metabolism, and carbohydrate content. *Plant Physiology* **109**: 697-706
- 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
- Iraqi D, Tremblay FM** (2001) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *J Exp Bot* **52**: 2301-2311
- Iyer S, Caplan A** (1998) Products of praline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiol* **116**: 203-211
- Jeong R, Housley TL** (1990). Fructan metabolism in wheat in altering warm and cold temperatures. *Plant Physiol* **93**: 902-906
- Jones TL, Ort DR** (1997) Circadian regulation of sucrose phosphate synthase activity in tomato by protein phosphorylation activity. *Plant Physiol* **113**: 1167-1175
- Kaurin A, Junttila O, Hansen J** (1981) Seasonal changes in frost hardiness in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) in relation to carbohydrate content with special reference to sucrose *Physiol Plant* **53**:310-314

- 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
- Kerr PS, Huber SC** (1987) Coordinate control of sucrose formation in soybean leaves by sucrose-phosphate synthase and fructose-2,6bisphosphate. *Planta* **170**: 197-204
- Kerr PS, Jr Ruffy TW, Huber SC** (1985) Endogenous rhythms in photosynthesis, sucrose phosphate synthase activity, and stomatal resistance in leaves of soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Plant Physiol* **77**: 275-280
- King RW, Ben-Tal Y** (2001) A florigenic effect of sucrose in *Fuschia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. *Plant Physiol* **125**: 488-496
- Klein RR, Brandner SJ, Salvucci ME** (1993) Cloning and developmental expression of the sucrose-phosphate synthase gene from spinach. *Planta* **190**: 498-510
- Kobr MJ and Beevers H** (1971) Gluconeogenesis in the Castor Bean Endosperm. *Plant Physiology* **47**: 48-52
- Kohel RJ and Lewis CF** (1984) *Cotton Agronomy 24, American Society of Agronomy, Inc., Crop Science Society of America, Inc., and Soil Science of America, Inc., Madison, WI.* 605 p.
- Komatsu A, Takanokura Y, Omura M, Akihama T** (1996) Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthase isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc.). *Mol Gen Genet* **252**: 346-351
- Kornberg HL, Beevers H** (1957) A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature* **180**: 35-36
- Krause KP, Hill L, Reimholz R, Nielsen TH, Sonnewald U, Stitt M** (1998) Sucrose metabolism in cold-stored potato tubers with decreased expression of sucrose phosphate synthase. *Plant Cell Environ* **21**: 285-299
- Langenkamper G, Fung RWM, Newcomb RD, Atkinson RG, Gardner RC, MacRae EA** (2002) Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. *J Mol Evol* **54**: 322-332
- Laporte MM, Galagan JA, Prasch AL, Vanderveer PJ, Hanson DT, Shewmaker CK, Sharkey TD** (2001) Promoter strength and tissue specificity effects on growth of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. *Planta* **212**: 817-822
- Lehmann U, Wienkoop S, Tschöep H, Weckwerth W** (2008) If the antibody fails—a mass Western approach. *The Plant J* **55**: 1039-1046
- 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

- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki Y, Shinozaki K** (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **10**: 1391-1406
- Lunn JE, Furbank RT** (1999) Sucrose biosynthesis in C4 plants. *New Phytol* **143**: 221-237
- Lunn JE, Furbank RT** (1997). Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C4 plants. *Planta* **202**: 106–111.
- Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT** (2003) Expression of a cyanobacterial sucrose phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. *J Exp Bot* **54**: 1-15
- Lunn JE, MacRae EA** (2003) New complexities in the synthesis of sucrose. *Curr Opin Plant Biol* **6**: 208–214
- Marangoni AG., Duplessis PM, Yada RY** (1997) Kinetic model for carbon partitioning in *Solanum tuberosum* tubers stored at 2°C and the mechanism for low temperature stress-induced accumulation of reducing sugars. *Biophys. Chem* **65**: 211–220.
- McMichael RW, Jr. Klein RR, Salvucci ME, Huber SC** (1993) Identification of the major regulatory phosphorylation site in sucrose-phosphate synthase. *Arch Biochem Biophys* **307**: 248-252
- McMichael RW, Jr. Kochansky J, Klein RR, Huber SC** (1995) Characterization of the substrate specificity of sucrose-phosphate synthase protein kinase. *Arch Biochem Biophys* **321**: 71-75
- Micallef BJ, Haskins KA, Vanderveer PJ, Roh KS, Shewmaker CK, Sharkey TD** (1995) Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have an increased capacity for sucrose synthesis. *Planta* **196**: 327-334
- 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
- Niittyla 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
- Nykiforuk CL, Johnson-Flanagan AM** (1999) Storage reserve mobilization during low temperature germination and early seedling growth in *Brassica napus*. *Plant Physiol. Biochem* **37**: 939–947.

- Obiadalla-Ali H, Fernie AR, Kossmann J, Lloyd JR** (2004a) Developmental analysis of carbohydrate metabolism in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) fruits. *Physiol Plantarum* **120**: 1–9
- Ohsugi R and Huber SC.** (1987) Light modulation and localization of sucrose phosphate synthase activity between mesophyll cells and bundle sheath Cells in C4 Species. *Plant Physiology* **84**: 1096-1101
- Ohto M, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K** (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **127**: 252-261
- Pagnussat G, Curatti L, Salerno G** (2000) Rice sucrose-phosphate synthase: Identification of an isoform specific for heterotrophic tissues with distinct metabolite regulation from the mature leaf enzyme. *Physiol Plantarum* **108**: 337-344
- Park JY, Canam T, Kang KY, Ellis DD, Mansfield SD** (2008) Over-expression of an *Arabidopsis* family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. *Transgenic Res* **17**: 181-92
- Quick P, Siegl G, Neuhaus HE, Feil R, Stitt M** (1989) Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. *Planta* **177**: 536-546
- Reimholz R, Geigenberger P, Stitt M** (1994) Sucrose phosphate synthase is regulated, via metabolites and protein phosphorylation, in potato tubers, in a manner analogous to the enzyme in leaves. *Planta* **192**: 480-488
- Reimholz R, Geiger M, Haake V, Deiting V, Krause KP, Sonnewald V, Stitt M** (1997) Potato plants contain multiple forms of sucrose-phosphate synthase, which differ in their tissue distributions, their levels during development, and their responses to low temperature. *Plant Cell Environ* **20**: 291-305
- Rejskova A, Patkova L, Stodulkova E, Lipavska H** (2007) The effect of abiotic stresses on carbohydrate status of olive shoots (*Olea europaea* L.) under in vitro conditions, *J. Plant Physiol* **164**: 174–184
- Ritchie GL, Bednarz CW, Jost PH and Brown SM,** (2004) *Cotton growth and development*
- Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW** (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. *Plant J* **26**: 421-433
- Rosa M, Hilal M, Gonzalez JA, Prado FE** (2004) Changes in soluble carbohydrates and related enzymes induced by low temperature during early developmental stages of quinoa (*Chenopodium quinoa*) seedlings. *J. Plant Physiol* **161**: 683–689.
- Rosa M, Hilal M, Gonzalez JA, Prado FE** (2009) Low-temperature effect on enzyme activities involved in sucrose–starch partitioning in salt-stressed and

- salt-acclimated cotyledons of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**: 300–307
- Ruffy TW Jr, Kerr PS, Huber SC** (1983) Characterization of diurnal changes in activities of enzymes involved in sucrose biosynthesis. *Plant Physiol* **73**: 428-433
- Rylott EL, Gilday AD, Graham IA** (2003) The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in *Arabidopsis* is essential for seedling establishment. *Plant Physiol* **131**: 1834–1842
- Sadka A, DeWald DB, May GD, Park WD, Mullet JE** (1994) Phosphate modulates transcription of soybean VspB and other sugar-inducible genes. *Plant Cell* **6**: 737–749
- Salerno GL, Echeverria E, Pontis HG** (1996) Activation of sucrose phosphate synthase by a protein factor/sucrose-phosphate phosphatase. *Cell Mol Biol* **42**: 665–672
- salinity through osmotic adjustment. *Plant Soil* **284**:363–373.
- Salvucci ME, van de Loo FJ, Klein RR** (1995) The structure of sucrose phosphate synthase. *American Society of Plant Physiologists*, Rockville. pp.1-10
- Santoiani CS, Tognetti JA, Pontis HG and Salerno GL** (1993) Sucrose and fructan metabolism in wheat roots at chilling temperatures. *Physiologia Plantarum* **87**: 84-88
- Seelanan T, Schnabel A, Wendel JF** (1997) Congruence and consensus in the cotton tribe (Malvaceae). *Systematic Botany* **22**: 259-290
- Siegl G, MacKintosh C, Stitt M** (1990) Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. *FEBS Lett* **270**: 198-202
- 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
- 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 SM** (2002) Does the glyoxylate cycle have an anaplerotic function in plants. *Trends Plant Sci* **7**: 12–13
- Sonnewald U, Quick WP, MacRae E, Krause KP, Stitt M** (1993) Purification, cloning and expression of spinach leaf sucrose-phosphate synthase in *Escherichia coli*. *Planta* **189**: 174–181
- Stephens SG, Moseley ME** (1973) Cotton remains from archeological sites in central Coastal Peru. *Science* **180**: 186-188
- Steponkus PL, Lanphear FO** (1968). The role of light in cold acclimation of *Hedera helix* L. var . Thorndale. *Plant physiology* **43**: 151-156

- Stewart JM** (1986) Integrated events in the flower and fruit, In Mauney JR and Stewart JM, eds, *Cotton Physiology* **1**. The Cotton Foundation, Memphis, Tenn.
- Stewart JM** (1995) Potential for crop improvement with exotic germplasm and genetic engineering. Constable GA and Forrester NW eds, *CSIRO*, pp. 313-327
- Stitt M** (1990) Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **41**: 153-185
- Stitt M, Huber S, Kerr P** (1987) Control of photosynthetic sucrose formation. In: The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise. (ed. Hatch MD, Boardman NK). *Academic Press* pp. 327-409
- Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A** (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot* **53**: 959-970
- Stitt M, Wilke J, Feil R, Heldt HW** (1988) Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose. *Planta* **174**: 217-230
- Strand A, Foyer CH, Gustafsson P, Gardestrom P, Hurry V** (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. *Plant Cell Environ* **26**: 523-535
- Strand A, Zrenner R, Trevanion S, Stitt M, Gustafsson P, Gardestrom P** (2000) Decreased expression of two key enzymes in the sucrose biosynthesis pathway, cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and sucrose phosphate synthase, has remarkably different consequences for photosynthetic carbon metabolism in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **23**: 759–770
- Sugiharto B, Sakakibara H, Sumadi, Sugiyama T** (1997) Differential expression of two genes for sucrose-phosphate synthase in sugarcane: molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression. *Plant Cell Physiol* **38**: 961–965
- Theodorou ME, Cornel FA, Duff SMG, Plaxton WC** (1992) Phosphate starvation-inducible synthesis of the alpha-subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *J Biol Chem* **267**:21901–21905
- Tognetti JA, Salerno GL, Crespi MD, Pontis HG** (1990). Sucrose and fructan metabolism of different wheat cultivars at chilling temperatures. *Physiol Plant* **78**: 554-559
- Toit ES, Robbertse PJ, Niederwieser JG** (2004) Plant carbohydrate partitioning of *Lachenalia* cv. Ronina during bulb production. *Scientia Horticul* **102**: 433–440.
- Toroser D, Huber SC** (1997) Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase. *Plant Physiol* **114**:947-955

- Toroser D, McMichael RW Jr., Krause KP, Kurreck J, Sonnewald U, Stitt M, Huber, SC** (1999) Site-directed mutagenesis of serine demonstrates its role in spinach leaf sucrose-phosphate synthase modulation. *Plant J* **17**: 407-413
- 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
- Ugglä C, Magel E, Moritz T, Sundberg B** (2001) Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine. *Plant Physiol* **125**: 2029-2039
- Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K** (1994) Two genes that encode Ca²⁺ dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **244**: 331-340
- USDA, NRCS** (2009) The PLANTS Database (<http://plants.usda.gov>, 26 January 2009). National Plant Data Center, Baton Rouge, LA 70874-4490 USA.
- Usuda H and Shimogawara K** (1993) Phosphate deficiency in maize. IV. Changes in amounts of sucrose phosphate synthase during the course of phosphate deprivation. *Plant Cell Physiology* **34**: 767-770
- Valdez-Alarcon JJ, Ferrando M, Salerno G, Jimenez-Moraila B, Herrera-Estrella L** (1996) Characterization of a rice sucrose-phosphate synthase encoding gene. *Gene* **170**: 217-222
- Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR** (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10876-10880
- Weiner H, Jr McMichael R W, Huber SC** (1992) Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate synthase *in vivo*. *Plant Physiol* **99**: 1435-1442
- Weiner H, Weiner H, Stitt M** (1993) Sucrose phosphate synthase phosphatase, a type 2A protein phosphatase, changes its sensitivity toward inhibition by inorganic phosphate in spinach leaves. *FEBS Lett* **33**: 159-164
- Wendel JF, Albert VA** (1992) Phylogenetics of the cotton genus (*Gossypium*): Character-State Weighted Parsimony Analysis of chloroplast DNA restriction site data and its systematic and biogeographic implications. *Systematic Botany* **17**: 115-143
- Wendel JF, Olson PD and Stewart JMcD** (1989) Genetic diversity, introgression and independent domestication of old world cultivated cottons. *American Journal of Botany* **76**: 1795-1806
- 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

- Winter H, Huber SC** (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants. Localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **35**: 253-289
- Worrell AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, Voelker TA** (1991) Expression of maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* **3**: 1121-1130
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q** (2001) Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. *J Exp Bot* **52**: 2169-2179
- 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* pp. 4-6
- 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
- Zourelidou M, de Torres-Zabala M, Smith C, Bevan MW** (2002) Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. *Plant J* **30**: 489-497
- Zrenner R, Stitt M** (1991) Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. *Plant Cell Environ* **14**: 939-946

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Γαλανοπούλου-Σενδουκά** (2002) Στ. Βιομηχανικά φυτά: Βαμβάκι και υπόλοιπα κλωστικά, Ελαιοδοτικά, Ζαχαρότευτλα, Καπνός. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Τόλης Ι** (1986) Βαμβάκι. Εχθροί, ασθένειες, ζιζάνια. Αθήνα pp 10-14
- Χρηστίδης Β** (1965). Το βαμβάκι. Θεσσαλονίκη: Σίνδος, Ινστιτούτο βάμβακος.