ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ



Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης και προσδιορισμός της ενεργότητας σε αρτίβλαστα κολοκυθιάς που αναπτύχθηκαν στους 8°C και 25°C(*Cucurbita pepo* L.)

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΚΩΤΣΗΣ ΠΑΝΑΓΙΩΤΗΣ

AOHNA 2009

Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης και προσδιορισμός της ενεργότητας σε αρτίβλαστα κολοκυθιάς που αναπτύχθηκαν στους 8°C και 25°C(*Cucurbita pepo* L.)

Πενταμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:

Επ. Καθηγητής Γ. Αϊβαλάκις Επιβλέπων Καθηγητής Γ. Καραμπουρνιώτης Αν. Καθηγητής Κ. Φασσέας Μέλος Επ.Καθηγήτρια Χ. Κιτσάκη Μέλος Επ. Καθηγητής Κ. Ακουμιανάκης Μέλος Η ανάθεση της παρούσας μελέτης έγινε με απόφαση της υπ. αριθ. 18 της 19/6/2008 Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Γ. Αΐβαλάκι, στα πλαίσια του Προγράμματος μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Η ολοκλήρωση μιας εργασίας είναι μια συνολική προσπάθεια και σ' αυτό οφείλεται η πραγματοποίησή της. Για το λόγο αυτό ευχαριστώ τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την μεταφορά της εμπειρίας του.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα μέλη της πενταμελούς συμβουλευτικής και εξεταστικής επιτροπής τον Καθηγητή κ. Γ. Καραμπουρνιώτη, τον Αν. Καθηγητή κ. Κ. Φασσέα, την Επ. Καθηγήτρια κ. Χ. Κιτσάκη και τον Επ. Καθηγητή κ. Κ. Ακουμιανάκη για τις πολύτιμες διορθώσεις που εισηγήθηκαν διαβάζοντας αυτήν την εργασία και συμβάλλοντας ουσιαστικά στη διαμόρφωση του τελικού κειμένου.

Θα ήθελα να απευθύνω ευχαριστίες σε όλους όσους βοήθησαν να πραγματοποιηθεί η παρούσα εργασία, στους μεταπτυχιακούς φοιτητές Βασιλική Στρίντζου και Βασίλη Ρούνη.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την ηθική και οικονομική συμπαράσταση, δίχως την υπομονή και την κατανόησή τους δεν θα μπορούσα να πραγματοποιήσω το στόχο μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

\triangleright	1. Εισαγωγή	8
	Μορφολογία και ανατομία των κολοκυνθοειδών	9
	Η χημική σύσταση των σπερμάτων της κολοκυθιάς	11
	Η βλάστηση των σπερμάτων	13
	Το αμυλο	15
	Η υδρόλυση του αμύλου	16
	Η υδρόλυση των επιφανειακών γλυκανώνΗ α-αμυλάση	19
	Ένζυμα αποδιακλάδωσης	20
	Η β-αμυλάσηΗ δομή του ενζύμουΗ ενεργότητα του ενζύμου	21
	Εντοπισμός και ρύθμιση του ενζύμου	22
	Η τύχη της μαλτόζης και της μαλτοτριόζης	23
	Ο μεταβολισμός της μαλτόζης στο κυτόπλασμα	25
	Η έκφραση και η δραστηριότητα της β-αμυλάσης υπό συνθήκες	26
	καταπόνησης.	27
	Σκοπός της μελέτης	29
\triangleright	2. Υλικά και μέθοδοι	30
	Βλάστηση σπερμάτων και έκθεση των φυταρίων στο ψύχος	31
	Η εκχύλιση του ενζύμου	31
	Η μέτρηση της ενεργότητας της β-αμυλάσης	32
	Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της β-αμυλάσης	32
	Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεινών	33
	Η ανοσοβιοχημική μελέτη	34
	Ο ανοσοεντοπισμός της β- αμυλάσης	35
\succ	3. Αποτελέσματα	40
	Η δραστηριότητα της β-αμυλάσης σε εκχυλίσματα ριζών εντός	40
	της πηκτής	
	Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.	41
	Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης	42
	Η μελέτη της δραστηριότητα της β-αμυλάσης	46
	Ο προσδιορισμός της <i>in vitro</i> δραστηριότητας της β-αμυλάσης	47
\triangleright	4. Συζήτηση	48
	Η νέα μέθοδος της ανίχνευση της ενεργότητας της β-αμυλάσης	48
	εντός της πηκτής	
\succ	5. Συμπεράσματα	54
\triangleright	6. Βιβλιογραφία	55

Περίληψη

Σε αυτή τη μελέτη εξετάστηκε η δραστηριότητα της β-αμυλάσης σε αρτίβλαστα της κολοκυθιάς. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές του ανοσοεντοπισμού της πρωτείνης, της ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς του ενζύμου και *in vitro* δραστηριότητας του τόσο σε φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των αρτιβλάστων όσο και σε συνθήκες καταπόνησης χαμηλών θερμοκρασιών.

Για τη μελέτη της ηλεκτροφορητικής συμπεριφοράς του ενζύμου, επινοήθηκε μέθοδος εντοπισμού της β-αμυλάσης σε πηκτή πολυακρυλαμίδης η οποία υπερτερεί των υπαρχουσών στο διαχωρισμό και την ευκρίνεια των ηλεκτροφορητικών ζωνών.

Στις ρίζες, η β-αμυλάση εντοπίστηκε στην καλύπτρα, στην επιδερμίδα, στη ζώνη επιμήκυνσης, στις καταβολές των πλαγίων ριζών καθώς και στον κεντρικό κύλινδρο. Στα υποκοτύλια, η παρουσία της πρωτείνης ήταν έντονη στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Τέλος, στις κοτύλες, παρατηρήθηκε γενικευμένος εντοπισμός της β-αμυλάσης. Το πρότυπο αυτό του εντοπισμού παραπέμπει όντως στη συμμετοχή της β-αμυλάσης στην υδρόλυση συστατικών του αμύλου για την παραγωγή ενέργειας και σκελετών άνθρακα στα αναπτυσσόμενα φυτικά κύτταρα. Η ηλεκτροφορητική συμπεριφορά του ενζύμου κατέδειξε την ύπαρξη πολλαπλών ηλεκτροφορητικών ζωνών που πιθανόν να σημαίνει ύπαρξη πολλών ισοτύπων του ενζύμου.

Τέλος, σε συνθήκες ψυχρού χειρισμού των αρτιβλάστων στους 8°C, η *in vitro* δραστηριότητα της β-αμυλάσης στα εκχυλίσματα των ριζών, των κοτυλών καθώς και των υποκοτυλίων αυξήθηκε από την πρώτη ημέρα του χεισρισμού και παρέμεινε υψηλή καθόλη τη διάρκεια του πειράματος. Το γεγονός αυτό αν συσχετιστεί και με την ύπαρξη μιας επιπλέον ταινίας στα ηλεκτροφορήματα καταπονημένων φυτών μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών παρατηρείται μεγαλύτερη ενεργότητα της β-αμυλάσης που πιθανόν συμβάλλει στην προστασία του φυτού κάτω από αυτές τις συνθήκες.

Abstract

In the present study the activity of β -amylase in cucumber seedlings was studied. For this purpose, the techniques of immunolocalization, native protein electophoresis as well as the measurement of *in vitro* activity of extracts from plantlets grown normally or subjected to low temperature stress were employed.

A new method was invented which produces better resolution and sharper electrophoretic bands in native protein electrophoresis of the enzyme.

In roots, beta amylase was localized mainly in the cap, epidermis, in the elongation zone, in the root primordia and central cylinder. In hypocotyls, β -amylase was localized mainly in the vascular bundles. In cotyledons, the localization signal was distributed throughout the organ. This pattern of localization points to the active involvement of beta amylase in starch constituents' degradation for energy production and provision of carbon chains for growing plant cells. The native protein electrophoresis showed that the enzyme appears with multiple electrophoretic bands.

Finally, under low temperature stress conditions, the *in vitro* activity of β -amylase in root, hypocotyl and cotyledon extracts was higher after the first day in 8°C and remained high throughout the experiment. These data taken in combination with the appearance of a new electrophoretic band in stress organ extracts, mean that the higher β -amylase activity could participate in the alleviation of seedling stress.

1. Εισαγωγή.

Μορφολογία και ανατομία των κολοκυνθοειδών.

Η κολοκυθιά (Cucurbita pepo L.) ανήκει στην οικογένεια Cucurbitaceae της τάξης Violales. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει κυρίως ποώδη φυτά, σπανίως ξυλώδη, ετήσια ή πολυετή, με ακέραια ή έλλοβα ή παλαμοσχιδή φύλλα, κατ' εναλλαγή, χωρίς παράφυλλα. Πολλές φορές τα είδη της οικογένειας είναι αναρριχώμενα και φέρουν έλικες. Τα άνθη τους είναι μονήρη ή κατά κυματώδεις ταξιανθίες. Ο καρπός είναι ράγα, σπανίως κάψα. Τα σπέρματά τους έχουν ευθύ έμβρυο και δεν έχουν ενδοσπέρμιο. Τα αρτίβλαστα των κολοκυνθοειδών στην πλειοψηφία τους είναι επίγεια και βλαστάνουν με τις κοτυληδόνες αρχικά διπλωμένες ενώ αργότερα ξεδιπλώνονται. Σε είδη όπως η κολοκυθιά, το υποκοτύλιο επιμηκύνεται και οι κοτυληδόνες βγαίνουν από το έδαφος καθώς το περίβλημα του σπόρου μετακινείται από την πίεση ενός εξογκώματος που βρίσκεται στη μία πλευρά του υποκοτυλίου. Η λειτουργία του εξογκώματος αυτού συνίσταται στο άνοιγμα του περιβλήματος του σπόρου έτσι ώστε να μπορέσουν να εμφανιστούν οι κοτυληδόνες. Οι κοτυληδόνες που φωτοσυνθέτουν στα είδη της οικογένειας Cucurbitaceae έχουν σχήμα ωοειδές και μεταξύ τους βρίσκεται το μη διακρινόμενο λόγω μεγέθους αναπτυσσόμενο επικοτύλιο.

Το φυτό της κολοκυθιάς είναι μονοετές, έρπον ή αναρριχώμενο ή θαμνώδες και ορθοτενές. Η ρίζα του είναι πασσαλώδης, αναπτύσσεται μέχρι και σε βάθος 1,20 m αλλά το κυρίως ριζόστρωμα βρίσκεται μέχρι τα 40-50 cm. Ο βλαστός της είναι συνήθως γωνιώδους διατομής, αλλά και κυλινδρικής, φέρει τρίχες, τα μεσογονάτια διαστήματα είναι μικρά, δεν διακλαδίζεται και το μήκος του φτάνει μέχρι μερικά μέτρα. Τα φύλλα της κολοκυθιάς είναι απλά, μεγάλα, πεντάλοβα ή τρίλοβα με μεγάλες ή μικρές εγκολπώσεις και φέρουν τρίχες. Ο μίσχος είναι μακρύς και χονδρός, κοίλος εσωτερικά. Τα άνθη της είναι μεγάλα με πενταμερές περιάνθιο και στεφάνη χοανοειδή έντονου κίτρινου χρώματος. Το φυτό είναι σταυρογονιμοποιούμενο φυτό. Ο καρπός είναι ράγα ή πέπων, διαφόρων χρωμάτων (πράσινο βαθύ, πράσινο ανοιχτό, λευκό, κίτρινο, ανάμικτο) και σχημάτων (κυλινδρικό, ελλειψοειδές κ.λπ.) ανάλογα με την ποικιλία (Σαρλής, 1999).

Είναι φυτό θερμής εποχής και πολύ ευπαθές στον παγετό. Φύεται σε καλά στραγγιζόμενα εδάφη, μέσης σύστασης, γόνιμα και πλούσια σε οργανική ουσία. Το άριστο pH εδάφους ανάπτυξης των φυτών κυμαίνεται μεταξύ 6,0 και 7,5. Η κολοκυθιά θεωρείται φυτό σχετικά ανθεκτικό στα άλατα (Lorenz and Maynard, 1988). Είναι καλλιεργούμενο είδος με πολλές ποικιλίες και χρησιμοποιείται στη διατροφή του ανθρώπου.

Η χημική σύσταση των σπερμάτων της κολοκυθιάς.

Τα σπέρματα της κολοκυθιάς περιέχουν περίπου 32% πρωτείνη και 40% λίπη και έλαια πράγμα που τα καθιστά σημαντική πηγή λιπών υψηλής διατροφικής αξίας όπως πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (Longe *et al.*, 1983). Τα πειράματα των Nwokolo and Sim (1987) έδειξαν ότι η ποιότητα της πρωτείνης της κολοκυθιάς ήταν παρόμοια με αυτή της σόγιας.

Τα αμινοξέα που περιέχουν θείο (κυστείνη, μεθειονίνη) έχουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση στις πρωτείνες των σπερμάτων, ενώ η παρουσία της ισολευκίνης και της βαλίνης που είναι αμινοξέα απαραίτητα για τη διατροφή υπάρχουν επίσης σε αρκετά υψηλές συγκεντρώσεις. Τα σπέρματα της κολοκυθιάς περιέχουν όλα τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία αλλά και υψηλές συγκεντρώσεις νατρίου και είναι πηγή βιταμινών B (Mansour *et al.*, 1993).

Το σπέρμα της κολοκυθιάς έχει υψηλά επίπεδα ελαίων (450 g kg⁻ⁱ) (Lazos 1986). Τα έλαια από φυτά της οικογένειας Cucurbitaceae έχουν μεγάλο ενδιαφέρον εξαιτίας της υψηλής βιολογικής αξίας τους. Έχει δειχθεί ότι η σύσταση των λιπαρών οξέων των ειδών αυτής της οικογένειας είναι περίπου ίδια με μικρές διακυμάνσεις στη συγκέντρωση του ελαικού οξέος. Η σύσταση των τριγλυκεριδίων των σπερμάτων της κολοκυθιάς δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού. Η συγκέντρωση όμως, του λινολεικού οξέος αυξάνεται κατά την ωρίμανση ενώ αυτά του ολεικού και των κορεσμένων (παλμιτικό και στεατικό) οξέων μειώνεται.

Πίνακας 1. Σύσταση λιπαρών οξέων σπερμάτων κολοκυθιάς [%] του συνόλου των λιπαρών οξέων.

C14:0	0.5
C16:0	8.0
C16:1	0.6
C17	0.2
C18:0	3.6
C18: 1	50.4
C18:2	29.9
C18 :3	5.0
C20 :0	0.4
C22 :0	0.5
ΚΛΟ*	51.2
ΜΛΟ**	13.2
ΠΛΟ***	35.0

* Κορεσμένα λιπαρά οξέα .** Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. ***Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Από Longe *et al.* (1983**).**

Οι Handley et al. (1983a) μελέτησαν τις αλλαγές στην κατανομή των υδατανθράκων στο μεσοκάρπιο, το ενδοκάρπιο και το σπέρμα ώριμου καρπού της αγγουριάς (Cucumis sativus L). Η ωριμότητα του καρπού μετρήθηκε μέσω της μείωσης του pH του ενδοκαρπίου που βρέθηκε πως συσχετιζόταν με την απώλεια της χλωροφύλλης του πράσινου τμήματος του καρπού και με την αύξηση της συγκέντρωσης του κιτρικού οξέος. Η γλυκόζη και η φρουκτόζη βρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις στο μεσοκάρπιο και ενδοκάρπιο (8,6 και 10,3mg/g νωπού βάρους αντίστοιχα), σε σχέση με τη συγκέντρωση της σακχαρόζης (0,3mg/g νωπού βάρους). Στους παραπάνω ιστούς, δεν ανιχνεύθηκαν η ραφινόζη και η σταχυόζη. Εξάλλου, τα επίπεδα της γλυκόζης και της φρουκτόζης στο σπέρμα μειώθηκαν κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του. Αντίθετα συσσωρεύονταν η σακχαρόζη, η ραφινόζη και η σταχυόζη κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ωρίμανσης. Τα αποτελέσματα των Handley et al. (1983b) έδειξαν ότι η σακχαρόζη είναι το σάκχαρο που μεταφέρεται από το μίσχο του καρπού στο σπέρμα και ότι η συσσώρευση της ραφινόζης στο σπέρμα είναι το αποτέλεσμα της in situ βιοσύνθεσης της και όχι της άμεσης μεταφοράς στα σπέρματα μέσω των αγωγών ιστών.

Στην οικογένεια Cucurbitaceae, η σταχυόζη εμφανίζεται να είναι το κυρίαρχο μεταφερόμενο σάκχαρο (Hendrix, 1982; Webb and Gorham, 1964) και όχι η σακχαρόζη (Zimmerman, 1960). Παρόλα αυτά, η ραφινόζη και μικρά ποσά βερμπασκόζης μπορεί να μεταφέρονται από ιστό σε ιστό (Hendrix, 1982). Υπάρχουν

ενδείξεις ότι η σακχαρόζη είναι το σάκχαρο μεταφοράς σε κάποια είδη της Cucurbitaceae όπως η κολοκυθιά (Hendrix, 1982; Webb and Gorham, 1964).

Έχει προταθεί (Handley *et al.*, 1983b), ότι *in situ* σύνθεση της ραφινόζης γίνεται στο αναπτυσσόμενο σπέρμα κυρίως επειδή αυτό το σάκχαρο δεν ανιχνεύθηκε από τη χρωματογραφία χάρτου στα σαρκώδη μέρη του καρπού της αγγουριάς (Pharr *et al.*, 1977). Όμως, υπάρχει η πιθανότητα η συγκεκριμένη μέθοδος ανάλυσης να απέτυχε να ανιχνεύσει τη ραφινόζη επειδή η τελευταία πιθανόν να βρισκόταν μόνο στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες του καρπού. Τέλος, η ραφινόζη μπορεί να είχε αραιωθεί εξαιτίας των υψηλών επιπέδων γλυκόζης και φρουκτόζης στους μη αγγειακούς ιστούς.

Πίνακας 2. Περιεκτικότητα σπερμάτων κολοκυθιάς σε ολιγοσακχαρίτες mg/g Ξ.Ο

σακχαρόζη	20.6
ραφφινόζη	5.3
σταχυόζη	14.6
βερμπασκόζη	1
Σύνολο α-γαλακτοζιδίων	19

Aπó Handley et al. (1983b)

Η βλάστηση των σπερμάτων.

Τα σπέρματα των φυτών αποταμιεύουν άνθρακα για τη βλάστηση και την εγκατάστασή τους. Οι αποθησαυριστικές μορφές του άνθρακα είναι λιπίδια, υδατάνθρακες κυρίως με τη μορφή του αμύλου, και πρωτείνες (Bewely and Black, 1994). Τα γυμνόσπερμα όπως τα κωνοφόρα, τα κυκαδόφυτα και τα γκίνγκο, αποθηκεύουν λιπαρά οξέα με τη μορφή τριακυλογλυκερολών (TAG) στους μητρικούς ιστούς που περιβάλλουν το έμβρυο, ενώ τα αγγειόσπερμα μπορούν επίσης να τα αποθηκεύσουν είτε στο ενδοσπέρμιο είτε στο ίδιο το έμβρυο. Στο *Arabidopsis* και στα άλλα μέλη της οικογένειας *Brassicaceae*, ο άνθρακας αποθηκεύεται με τη μορφή ΤΑG 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 ρετσινολαδιάς, εκκρίνονται υδρολυτικά ένζυμα από την αλευρώνη στο ενδοσπέρμιο για να κινητοποιηθούν τα αποθέματα του αμύλου ή των λιπιδίων. Ο άνθρακας από τα αποθέματα του ενδοσπερμίου μεταφέρεται με τη

μορφή σακχαρόζης στο έμβρυο για να υποστηρίξει την αύξηση του (Kornberg and Beevers, 1957). Στα κύτταρα του πρωτεϊνοφόρου στρώματος του κριθαριού, το γιββερελινικό οξύ (GA) προάγει την έκφραση αυτών των γονιδίων, και την ενεργοποίηση των μεταγραφικών παραγόντων, περιλαμβανομένου και της β-αμυλάσης (Gubler *et al.*, 1995, 2002). Το αμπσισικό οξύ ανταγωνίζεται τη δράση του GA, καταστέλλοντας την έκφραση του γονιδίου της αμυλάσης και ενεργεί μέσω μιας επαγώμενης από το ABA κινάσης των πρωτεϊνών (Gomez- Cadenas *et al.*, 2001).

Πολλά φυτά αποθηκεύουν στα σπέρματατά τους λιπίδια και πρωτεΐνες, τα οποία χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας και βιοσυνθετικών πρόδρομων ενώσεων κατά τη βλάστηση, πριν αναπτυχθούν οι φωτοσυνθετικοί μηχανισμοί. Στα βλαστάνοντα σπέρματα, η ενεργός νεογλυκογένεση παρέχει γλυκόζη για τη σύνθεση σακχαρόζης και πολυσακχαριτών που προέρχονται από τις εξόζες. Στο αναπτυσσόμενο φυτό η σακχαρόζη προσφέρει μεγάλο μέρος της ενέργειας και των σκελετών άνθρακα που απαιτούνται για την αρχική αύξηση.

Δευτερευόντως το πρωτεϊνοφόρο στρώμα εκκρίνει υδρολυτικά ένζυμα που η λειτουργία τους είναι να αποδομούν τα κυτταρικά τοιχώματα του ενδοσπερμίου και του περιβλήματος των σπερμάτων, απομακρύνοντας κατ΄αυτόν τον τρόπο τα μηχανικά εμπόδια για την ανάδυση των ριζιδίων. Αυτά περιλαμβάνουν μία β-1,3γλουκανάση, μία ενδομανανάση, μία πολυγαλακτουρονάση και εξπανσίνες (Leubner-Metzger *et al.*, 1995; Nonagaki and Morohashi, 1996; Sitrit *et al.*, 1999; Chen and Bradford, 2000). Στο *Arabidopsis,* στον καπνό και στην τομάτα έχει δειχθεί ότι τα κυτταρικά τοιχώματα του περιβλήματος του σπέρματος 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 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 λιπών λαμβάνει μέρος στα υπεροξύσωματα και απαιτεί έναν μεταφορέα λιπαρών οξέων, δύο ισόμορφα γονίδια της ακυλο-CoA συνθάσης, και τη διαδικασία της υπεροξυσωμικής β-οξείδωσης (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-οξείδωσης, 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 στην

βλάστηση. Το γονίδιο Peroxisome Defective1 (PED1)/3-κετοακυλ-CoA θειολάση2 είναι απαραίτητο για την εγκατάσταση του φυτάριου 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 προμήθεια μιας εναλλακτικής πηγής άνθρακα.

Σε αντίθεση, στα ελλιπή φυτάρια του *Arabidopsis* στο ένζυμο του γλυοξυλικού κύκλου ισοκιτρικής λυάσης (ICL) εγκαθίστανται επαρκώς στο φώς αλλά είναι ελλιπή στην 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 φωσφοροενολο πυροσταφυλλικού (PCK1) που έχει σιγηθεί με αντινοηματικό RNA (Rylott *et al.*, 2003). Η διαφορά μεταξύ του *Arabidopsis* και των ελαιούχων σπερμάτων όπως είναι η ρετσινολαδιά έχει οδηγήσει σε αμφιβολίες σχετικά με τον ρόλο του γλυοξυλικού κύκλου και της γλυκονεογένεσης στα εμβρυακά κύτταρα ελαιούχων σπερμάτων στα οποία απαντώνται εναλλακτικές πλην της β-οξείδωσης, οδοί της σύνθεσης του ακετυλο-CoA (Smith, 2002).

Η αύξηση των φυτών και ο αποθησαυρισμός οργανικών ουσιών 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 μεσόφυλο 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 αποφόρτηση 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).

Το άμυλο

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

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

Η αμυλοπηκτίνη αντίθετα είναι ένας διακλαδιζόμενος πολυσακχαρίτης, μοριακού βάρους μεγαλύτερου των 300kD, και αποτελεί το 75-80%. του αμύλου. Αποτελείται από κατάλοιπα γλυκόζης τα οποία συνδέονται με α-(1,4) και α-(1,6) γλυκοζιτικούς δεσμούς. Τα σημεία διακλάδωσης βρίσκονται κάθε 20-30 μόρια γλυκόζης. Οι διακλαδώσεις αυτές από μόνες τους σχηματίζουν μια οργανωμένη δομή. Οι δομές αυτές ενώνονται στη συνέχεια με α-(1,6) δεσμούς με εσωτερικές διακλαδώσεις (β αλυσίδες) που μπορεί να διακλαδίζονται σε ένα ή περισσότερα σημεία. Τέλος υπάρχει μια μοναδική αλυσίδα για κάθε μόριο αμυλοπηκτίνης που φέρει ένα ελεύθερο άκρο C (Martin and Smith, 1995). Τα σημεία διακλάδωσης σχηματίζουν κάποιες δομές που λέγονται συσσωματώματα (clusters) και αποτελούνται σε δύο συσσωματώματα ενώ αντίθετα αλυσίδες των 70 μονάδων γλυκόζης χωρίζονται σε τρία συσσωματώματα (Smith 2003). Ένα τυπικό μόριο αμυλοπηκτίνης έχει μήκος 200-400nm και πλάτος 15nm (Martin and Smith 1995) και

14

μικρές ποσότητες φωσφορικών ομάδων που ενώνονται εστερικά με το υδροξύλιο του άνθρακα 6. Οι φωσφορικές ομάδες σχετίζονται τόσο με τη σύνθεση όσο και με την αποδόμηση του αμύλου (Stryer 1988).

Η υδρόλυση του αμύλου

Η υδρόλυση του αμύλου πραγματοποιείται σε όλους τους φυτικούς ιστούς είτε πρόκειται νια φωτοσυνθετικούς зтіз για ετερότροφους ιστούς. Στους φωτοσυνθετικούς ιστούς, η υδρολυσή του αμύλου πραγματοποιείται παράλληλα με τη βιοσύνθεσή του. Φυσιολογικά το άμυλο δημιουργείται την ημέρα και υδρολύεται κατά τη διάρκεια της νύχτας παρέχοντας τον πλεονάζοντα φωτοσυνθετικά καθηλωμένο άνθρακα και μια πηγή ανηγμένου άνθρακα κατά την διάρκεια της νύχτας που τα φυτά δεν μπορούν να φωτοσυνθέσουν. Κατά τη διάρκεια της νύχτας, το μεγαλύτερο μέρος του αμύλου των χλωροπλαστών αποδομείται γρήγορα και μεταφέρεται κυρίως ως σακχαρόζη στους ιστούς καταναλωτές για την παραγωγή ενέργειας. Κατά τη διαδικασία αυτή παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας των υδρολυτικών ενζύμων (Lea and Leegood, 1997).

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

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

15



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

Η υδρόλυση των επιφανειακών γλυκανών.

Το πρώτο στάδιο της αποδόμησης του αμύλου θα πρέπει να καταλύεται από ένζυμα που είναι ικανά να μεταβολίσουν τα πολυμερή στη επιφάνεια του ημικρυσταλλικού αμυλόκοκκου. Αν και υπάρχουν μερικοί τύποι ενζύμων που είναι ικανοί να απελευθερώσουν γλυκάνες από απομονωμένους αμυλόκοκκους in vitro, πειραματικά δεδομένα (Scheidig et al 2002, Steup et al 1983, Sun et al 1995), υποδεικνύουν ότι το μόνο ένζυμο που δρά με αυτό τον τρόπο in planta είναι η ενδοαμυλάση α-αμυλάση. Στο ενδοσπέρμιο των βλαστανόντων καρυόψεων των σιτηρών, οι α-αμυλάσες υδρολύουν τους α-1,4 δεσμούς εντός των πολυμερών που βρίσκονται εκτεθειμένα στην επιφάνεια ή στις ρωγμές των αμυλοκόκκων. Στο Arabidopsis έχουν εντοπιστεί τρείς α-αμυλάσες. Από αυτές η ΑΜΥ3 εντοπίζεται στους χλωροπλάστες. Θεωρείται λοιπόν εύλογο να υποτεθεί ότι η ΑΜΥ3 καταλύει την υδρόλυση του αμύλου στην επιφάνεια του αμυλόκοκκου κατά τη διάρκεια της νύχτας. Όμως, κανένας από αυτούς τους ισότυπους της α-αμυλάσης δεν είναι απαραίτητος για την αποδόμηση του αμύλου αφού μεταλλάγματα που δεν έχουν το γονίδιο ΑΜΥΙ (At4g25000) ή το AMY2 (At1g76130) ή το AMY3 παρουσιάζουν κανονικούς ρυθμούς αποδόμησης του αμύλου τη νύχτα. Τριπλό μετάλλαγμα δηλαδή φυτά ελλειματικά και στις τρεις α-αμυλάσες παρουσιάζουν επίσης κανονικούς ρυθμούς αποδόμησης του αμύλου (Yu et al., 2005). Φαίνεται λοιπόν, ότι η αρχική υδρόλυση του αμυλόκοκκου δεν απαιτεί μια ενδοαμυλάση ή ότι το Arabidopsis έχει μια νέα ενδοαμυλάση που δεν αναγνωρίζεται από την αμινοξική της ακολουθία ως α-αμυλάση, εφόσον το μετάλλαγμα δεν φέρει αλλαγές και στη σύνθεση ή και δομή του αμύλου.

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

Οι απλούστερες πιθανές ερμηνείες για τη συμμετοχή της GWD στην αποδόμηση του αμύλου είναι ότι απαιτούνται είτε φωσφορικές ομάδες είτε το ίδιο το ένζυμο για τη δράση αγνώστων ενζύμων που υδρολύουν τις γλυκάνες στην επιφάνεια του αμυλόκοκκου. Οι φωσφορικές ομάδες πιθανόν επηρεάζουν το «πακετάρισμα» των πολυμερών της γλυκόζης μέσα στον αμυλόκοκκο και συνεπώς την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων (Blennow et al., 2000, Blennow et al., 2002, Yu et al 2001). Η GWD διαθέτει περιοχή της δικινάσης και μία άλλη μεγάλη αμινοτελική περιοχή (περίπου 120kD) άγνωστης λειτουργικότητας. Επιπλέον, πρόσφατα βρέθηκε νέο ένζυμο που μοιάζει με τη GWD ή GWD 3 ή δικινάση της φωσφορογλυκάνης (PWD phosphoglucan water dikinase) που απαιτείται για την ομαλή υδρόλυση του αμύλου (Baunsgaard et al., 2005, Kötting et al., 2005). Μεταλλάγματα που δεν έχουν αυτό το ένζυμο παρουσιάζουν επίσης αυξημένα ποσά αμύλου στα φύλλα αλλά όχι στον ίδιο βαθμό με τα μεταλλάγματα της GWD. Είναι λοιπόν εύλογο να υποτεθεί ότι η GWD και η PWD δρούν μαζί για να δημιουργήσουν ένα πρότυπο φωσφορυλίωσης της αμυλοπηκτίνης που την κάνει προσιτή στα υδρολυτικά ένζυμα.

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

Η φωσφορυλάση του αμύλου προσφέρει οικονομία ενέργειας στο φυτό. Κατά την υδρόλυση του αμύλου από τις αμυλάσες η ενέργεια που περιέχεται στους γλυκοζιδικους δεσμούς α(1,4) και α (1,6) που διασπώνται μετατρέπεται σε μη αξιοποιήσιμη θερμική ενέργεια, γεγονός που δεν επιτρέπει την αντιστροφή της αντίδρασης υδρόλυσης. Αντίθετα κατά την φωσφορόλυση του αμύλου και το σχηματισμό της 1-φωσφορογλυκόζης, η ενέργεια του γλυκοζιδικού δεσμού διατηρείται στον εστερικό δεσμό. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την υπό προϋποθέσεις αντιστροφή της αντίδρασης προς την πλευρά σύνθεσης του αμύλου (Δροσόπουλος, 1998).

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

εσωτερικές αλυσίδες γλυκόζης προσιτές στο ένζυμο της φωσφορυλάσης (Hopkins, 1995).

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

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

Η α-αμυλάση.

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

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

Αμυλόζη ΑΜΥ δεξτρίνες μαλτόζη+μαλτοτριόζη+δεξτρίνες Αμυλοπηκτίνη ΑΜΥ μαλτόζη+μαλτοτριόζη+οριακές δεξτρίνες+γλυκόζη Εικ.2. Σχηματική απεικόνιση των προϊόντων της υδρόλυσης του αμύλου με την δράση της α-αμυλάσης (ΑΜΥ)

Η α-αμυλάση είναι ένα ένζυμο ευρύτατα διαδεδομένο τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο καθώς και στους μικροοργανισμούς. Συγκρινόμενες σε αμινοξικό επίπεδο, οι α-αμυλάσες από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς αποκαλύπτουν τέσσερις υψηλά συντηρημένες περιοχές οι οποίες συσχετίζονται με περιοχές που έχουν δομικό και λειτουργικό ρόλο για το ένζυμο (Nakajima *et. al.* 1986). Σε βλαστάνοντα σπέρματα ρυζιού έχουν ανιχνευθεί τρεις ισότυποι της α-αμυλάσης (Daussant *et al.*, 1983). Είναι γνωστό ότι ισότυποι α-αμυλάσης στο ρύζι κωδικοποιούνται από μια οικογένεια δέκα γονιδίων που τοποθετούνται σε πέντε

διαφορετικά χρωμοσώματα (Rodriguez *et al.,* 1992). Στα σιτηρά τα γονίδια που κωδικοποιούν την α-αμυλάση διαιρούνται σε δυο βασικές τάξεις: AmyA και AmyB. Η AmyA υποδιαιρείται σε δύο υποοικογένειες τις Amy1 και Amy2 οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την ταξινόμηση των ισοτύπων της α-αμυλάσης στο σιτάρι και κριθάρι. Η τάξη AmyB περιέχει την υποοικογένεια Amy3 στην οποία ανήκουν οι περισσότεροι του ρυζιού. Πολλαπλά γονίδια α-αμυλασών είναι γνωστά στο κριθάρι (Muthukrishnan *et al.*, 1984) και σιτάρι (Gale *et al.*, 1983). Στο κριθάρι έχει βρεθεί ότι επτά γονίδια κωδικοποιούν για επτά διαφορετικούς ισότυπους της α-αμυλάσης (Avigad and Dey, 1997). Σε εξαπλοειδές σιτάρι, δώδεκα έως δεκατέσσερα γονίδια α-αμυλάσης (Amy1) εντοπίζονται στα ομόλογα χρωμοσώματα 6A, 6B και 6D ενώ δέκα έως έντεκα γονίδια α-αμυλάσης (Amy2) βρέθηκαν στα χρωμοσώματα 7A, 7B και 7D. Τα γονίδια α- Amy3 του σιταριού τοποθετούνται στο ομόλογο χρωμόσωμα 5.

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

Τέλος η α-αμυλάση ρυθμίζεται και επάγεται από τις φυσικές ορμόνες γιβερρελίνη και αμψισικό οξύ. Επιπλέον ιόντα Ca²⁺ συμβάλλουν στην επαγωγή της δραστηριότητας της α-αμυλάσης (Hopkins, 1995). Αντίθετα το ένζυμο παρεμποδίζεται από τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης του αμύλου καθώς και από τα βαρέα μέταλλα.

Ένζυμα αποδιακλάδωσης

Τα ένζυμα αποδιακλάδωσης υδρολύουν τους α(1,6) γλυκοζιδικούς δεσμούς και διαφέρουν μεταξύ τους σε σχέση με το υπόστρωμα δράσης τους (Lea and Leegood, 1997).

Διακρίνονται σε δύο ομάδες τις πουλουλανάσες (EC 3.2.1.41) και την ισοαμυλάση (EC 3.2.1.68) ανάλογα με την ικανότητα υδρόλυσης του πουλουλανίου. Το πουλουλάνιο είναι ένας πολυσακχαρίτης με επαναλαμβανόμενες μονάδες μαλτοτριόζης που ενώνονται με α(1,6) γλυκοζιδικούς δεσμούς (Van de Maarel *et al.,* 2002).

Οι πουλουλανάσες τύπου 1 υδρολύουν τους α(1,6) γλυκοζιδικούς δεσμούς του πουλουλανίου και της αμυλοπηκτίνης. Έχουν άριστο pH: 5,5 (Avigad and Dey, 1997).

Υπάρχουν επίσης και πολκουλανάσες τύπου 2 οι οποίες υδρολύουν α(1,6) και α(1,4) γλυκοζιδικούς δεσμούς. Τα κυριότερα προϊόντα της αποδόμησης τους είναι

μαλτόζη και μαλτοτριόζη.

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

Η β-αμυλάση

Η δομή του ενζύμου

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η β-αμυλάση (3.2.1.2) είναι μια εξωυδρολάση που υδρολύει τους α-(1,4) γλυκοζιτικούς δεσμούς της αμυλόζης, αφαιρώντας μόρια μαλτόζης από το μη αναγωγικό άκρο. Η δράση της σταματά ένα έως τρία γλυκοζιτικά κατάλοιπα μακριά από τον α-(1,6) γλυκοζιτικό δεσμό τον οποίο αδυνατεί να διασπάσει. Πρόκειται για ένα μονομερές ένζυμο το οποίο παρουσιάζει κοινές φυσικοχημικές ιδιότητες σε όλα τα φυτά όπου έχει βρεθεί. Εξαίρεση αποτελεί η β-αμυλάση της γλυκοπατάτας που αποτελείται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες των 56 KDa (Tanaka *et al.*, 2002).



Η κύρια λειτουργία της β-αμυλάσης είναι η υδρόλυση του αμύλου στα φυτά (Kossmann and Lloyd, 2000). Βασισμένος, σε *in vitro* μελέτες, ο φυσιολογικός ρόλος

της β-αμυλάσης στην υδρόλυση του αμύλου ήταν για πολλά χρόνια υπό αμφισβήτηση, και αυτό κυρίως γιατί θεωρούταν ότι ήταν καταλυτικά ανενεργή σε φυσικούς αμυλόκοκκους χωρίς την πρότερη υδρόλυση του αμύλου από άλλα αμυλολυτικά ένζυμα όπως η α-αμυλάση (Beck and Ziegler, 1989). Παρολαυτά, τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι η β-αμυλάση παίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση του παροδικού αμύλου (Scheiding et al., 2002). Μείωση της έκφρασης της εντοπιζόμενης στους χλωροπλάστες β-αμυλάσης με τη χρήση αντιπληροφοριακού (antisense) RNA στην πατάτα είχε ως αποτέλεσμα τη συσσώρευση περίσσειας αμύλου στα φύλλα σε σύγκριση με αυτά του αγρίου τύπου (Scheiding et al., 2002). Διαγονιδιακά φυτά που έχουν έλλειψη σε αυτή τη χλωροπλαστική β-αμυλάση έχουν μειωμένη υδρολυτική ικανότητα αμύλου, ειδικά στο σκοτάδι. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η υδρολυτική διάσπαση του παροδικού αμύλου είναι το κυριότερο μονοπάτι σε αντίθεση με αυτό της φωσφορολυτικής οδού. Επιπροσθέτως, τα προϊόντα που παράγονται από τη δραστηριότητα της β-αμυλάσης μετακινούνται στο κυτόπλασμα μέσω φορέων μαλτόζης (Niittyla et al., 2004) όπου και μεταβολίζονται σε γλυκόζη από τις γλυκοζυλοτρανσφεράσες (Lu and Sharkey, 2004; Sean et al., 2004).

Οι β-αμυλάσες θεωρούνται ότι εδράζονται στο στρώμα των χλωροπλαστών του μεσόφυλλου (Lao *et al.,* 1999; Scheidig *et al.,* 2002), στα χυμοτόπια (Ziegler and Beck, 1986; Datta *et al.,* 1999) και στο κυτταρόπλασμα.

Η ενεργότητα του ενζύμου

Το ένζυμο θεωρείται ότι δεν μπορεί να δράσει απευθείας σε αμυλοκόκκους (Anders *et al.*, 1997), αλλά υδρολύει μακριές αλυσίδες μαλτο-ολιγοσακχαριτών που παράγονται πρώτα κατά τη μερική διάσπαση του αμύλου από άλλα υδρολυτικά ένζυμα (Avigad and Dey 1997). Από τη δράση της β-αμυλάσης, η αμυλόζη υδρολύεται σε ποσοστό 70% λόγω της παρουσίας αραιών διακλαδώσεων στο μόριό της, ενώ η αμυλοπηκτίνη υδρολύεται μερικώς με την προοδευτική απόσπαση μορίων μαλτόζης από τις πλάγιες αλυσίδες μέχρι τις διακλαδώσεις. Κατά συνέπεια, τα προϊόντα που λαμβάνονται από τη δράση της β-αμυλάσης πάνω στα συστατικά του αμύλου είναι μαλτόζη και δεξτρίνες.



Στα σιτηρά η αμυλολυτική δράση ανιχνεύεται κατά τα πρώτα στάδια της βλάστησης των σπερμάτων. Τα προιόντα της υδρόλυσης χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ενέργειας και ως σκελετοί άνθρακα στο αναπτυσσόμενο έμβρυο. Κατά τη βλάστηση των καρυόψεων των σιτηρών, ο ρόλος της β-αμυλάσης θεωρείται ανώτερος εκείνου της α-αμυλάσης, τουλάχιστον κατά τη διάρκεια των πρώτων γεγονότων βλάστησης.

Η δράση του ενζύμου παρεμποδίζεται πλήρως από τα αντιδραστήρια που δεσμεύουν τις σουλφυδρυλικές ομάδες όπως π.χ. Cu²+, Ag+, Hg²+.

Εντοπισμός και ρύθμιση του ενζύμου

Το ένζυμο έχει βρεθεί σε φυτά και βακτήρια αλλά όχι στα ζώα. Οι β-αμυλάσες παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες όπως λ.χ. μοριακό βάρος αλλά και ορισμένες διαφορές σε φυσικοχημικές ιδιότητες όπως λ.χ. το άριστο pH (Kohno et al., 1989). Απαντούν κυρίως σε αποθησαυριστικά όργανα διάφορων φυτικών ειδών, όπως τα σπέρματα και οι κονδυλώδεις ρίζες. Δύο τύποι β-αμυλασών έχουν χαρακτηρισθεί και περιγραφεί στο σιτάρι (Daussant and Lauriere, 1990), κριθάρι (Shewry et al., 1988) και σίκαλη (Daussant et al., 1991). Οι β-αμυλάσες τύπου ενδοσπερμίου αυξάνονται μόνο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της καρύοψης ενώ η άλλου τύπου β-αμυλάση ΄΄μη ιστοειδική΄΄ εμφανίζεται σε διάφορα βλαστικά όργανα. Οι τύπου ενδοσπερμίου βαμυλάσες εμφανίζουν μια συνεχόμενη αλληλουχία γλυκίνης στο C-τελικό άκρο της αμινοξικής τους ακολουθίας. Ειδικότερα, στο κριθάρι (Yoshigi et a., 1994) υπάρχουν τέσσερις συνεχόμενες επαναλήψεις με γλυκίνες και στη σίκαλη τρεις (Rorat et al., 1991). Οι β-αμυλάσες συντίθενται κατά την ανάπτυξη του σπέρματος και διατηρούνται στο ενδοσπέρμιο υπό λανθάνουσα μορφή (Hara-Nishimura et al., 1986), ενώ δεν συντίθεται de novo κατά τη βλάστηση των σπερμάτων. Αντίθετα, η βαμυλάση του ρυζιού (Wang et. al. 1996) συντίθεται de novo στις στοιβάδες της αλευρώνης κατά τη διάρκεια της βλάστησης του σπέρματος. Ωστόσο ούτε στο ρύζι ούτε στο καλαμπόκι φαίνεται ότι εκφράζεται η τύπου ενδοσπερμίου β-αμυλάση όπως το σιτάρι, το κριθάρι και τη σίκαλη (Lauriere *et al.,* 1992). Όπως στο ρύζι έτσι και στον αραβόσιτο έχει βρεθεί ότι εκφράζεται το γονίδιο της β-αμυλάσης στα κύτταρα της αλευρώνης και κωδικοποιείται από απλό αντίγραφο-γονίδιο.

Το γονιδίωμα των διαφόρων φυτικών ειδών κωδικοποιεί αρκετούς ισότυπους της β-αμυλάσης. Στο Arabidopsis λ.χ., υπάρχουν εννέα ισότυποι τους οποίους οι Smith et al. (2004) ονομάζουν BAM1 ως BAM9 παρέχοντας έτσι μια ενοποιημένη ονομασία. Με βάση την ανάλυση των ακολουθιών, μόνο τρία γονίδια τα BMY7, BMY8 και BMY9 φαίνεται να κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν πιθανό πλαστιδιακό πεπτίδιο οδηγό. Η έκφραση του γονιδίου ΒΑΜ3 ακολουθεί κιρκαδικούς ρυθμούς (Lu et al., 2005). Το ένζυμο είναι εξωπλαστιδιακό, είναι υπεύθυνο για το 80% της συνολικής αμυλολυτικής δραστηριότητας (Lin et al., 1988) και εφράζεται περισσότερο κάτω από συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών. Πρόσφατα οι Sparla et al. (2006) έδειξαν ότι ο BAM1 (που ονομάζεται TR-BMY και BMY7), κωδικοποιεί ένα ενεργό χλωροπλαστικό ισότυπο της β-αμυλάσης που ρυθμίζεται μέσω της αναγωγής του με τη θειορεδοξίνη (Sparla et al., 2006). Ωστόσο, αρχικές αναφορές υποδεικνύουν ότι μεταλλάξη του ΒΑΜ1 δεν έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του αμύλου των φύλλων, και εκφράζεται σε φωτοσυνθετικούς και μή φωτοσυνθετικούς ιστούς (Kaplan and Guy, 2005). Ο BAM2 (που ονομάζεται επίσης και BMY9) και ο BAM4 (που ονομάζεται και BMY6) φέρουν επίσης πλαστιδιακό πεπτίδιο οδηγό (Lloyd et al., 2005; Smith et al., 2005). Όμως, οι προβλέψεις είναι ελλιπείς, και δεν έχει εντοπιστεί πειραματικά η υποκυτταρική θέση της πρωτεΐνης. Επιπροσθέτως, οι Kaplan and Guy (2005) αναφέρουν ότι η μετάλλαξη του BAM2 δεν έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του αμύλλου στα φύλλα.

Η BAM5 (που επίσης αποκαλείται BMY1 και RAM1) έχει μελετηθεί σε βάθος. Οι Laby et al. (2001) αναφέρουν ότι το 90% της ενεργότητας της β-αμυλάσης των φύλλων του *Arabidopsis* κωδικοποιείται από τη BAM5. Νωρίτερα είχε αναφερθεί ότι η πρωτεΐνη BAM5 εδράζεται στους ηθμοσωλήνες (Wang et al., 1995). Ωστόσο, μετάλλαξη στο γονίδιο BAM5 δε φαίνεται να επηρεάζει τη λειτουργία του ηθμού ή τα επίπεδα του αμύλου στα φύλλα (Laby et al., 2001).

Έχουν επίσης αναγνωριστεί β-αμυλάσες σε ρίζες της μηδικής, διάφορα ψυχανθή όπως στο *Melilotus officinalis*, στο *Triffolium pretense*, στο *Lotus corniculatus* και στο *Pisum sativum* (Anders *et al* 1997).

Η σακχαρόζη και το πολυγαλακτουρονικό οξύ είναι ισχυροί ενεργοποιητές της

βιοσύνθεσης β-αμυλάσης στη γλυκοπατάτα, ενώ στα σιτηρά πρωτεολυτική διάσπαση ενεργοποιεί την ελεύθερη και πιο ενεργή μορφή με την οποία παρουσιάζεται.

Μελέτες στο Arabidopsis thaliana και σε άλλα φυτικά είδη δείχνουν ότι η μαλτόζη είναι το βασικό προϊόν της υδρόλυσης του αμύλου και εξάγεται από τους χλωροπλάστες τη νύχτα. Και αυτό επειδή η συγκέντρωση της μαλτόζης στα φύλλα αυξάνεται κατά τη διάρκεια της νύχτας όταν καταναλώνεται το άμυλο των φύλλων (Niittyla et al., 2004; Weise et al., 2004). Επί πλέον, η μαλτόζη εξάγεται από τους χλωροπλάστες (Weise et al., 2004). Μή λειτουργική μετάλλαξη του φορέα της μαλτόζης MEX1 που εδράζεται στο φάκελλο των χλωροπλαστών, προκαλεί τη συσσώρευση της μαλτόζης στο χλωροπλάστη σε πολύ υψηλά επίπεδα και καθυστερεί την αποδόμηση του αμύλου (Niittyla et al., 2004; Lu et al., 2006). Τέλος, η απώλεια μιας τρανσγλυκοσιδάσης που μεταβολίζει τη μαλτόζη (DPE2) προκαλεί επίσης συσσώρευση της μαλτόζης σε πολύ υψηλά επίπεδα και καθυστερεί την αποδόμηση του αμύλου τόσο στο Arabidopsis (Chia et al., 2004; Lu and Sharkey, 2004) όσο και στη πατάτα (Solanum tuberosum) (Lloyd et al., 2004). Στο Arabidopsis, το DPE2 εδράζεται στο κυτόπλασμα (Chia et al., 2004), και τα επίπεδα της μαλτόζης σε φυτά που έχουν μεταλλαγή στο dpe2 αυξάνονται τόσο μέσα όσο και έξω από το χλωροπλάστη (Lu et al., 2006).

Παρά το ότι είναι γεγονός ότι η μαλτόζη είναι το κύριο προϊόν της υδρόλυσης του αμύλου στους χλωροπλάστες, ο μηχανισμός που παράγεται από το άμυλο δεν είχε μέχρι πρόσφατα διευκρινιστεί. Δυο ένζυμα, η α-αμυλάση και η βαμυλάση, μπορούν με αποτελεσματικότητα να παράγουν μαλτόζη μέσω της υδρόλυσης της αμυλόζης και της αμυλοπηκτίνης. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν ότι η β-αμυλόλυση είναι η πηγή παραγωγής μαλτόζης κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης του αμύλου. Οι Weise et al. (2005) έδειξαν ότι η κυρίαρχη μαλτόζη που παράγεται κατά την υδρόλυση του αμύλου είναι η β-αμυλάση του αμύλου στο αμύλου στο αμύλου είναι η διάρκεια της υδρόλυσης του αμύλου. Οι Weise et al. (2005) έδειξαν ότι η κυρίαρχη μαλτόζη που παράγεται κατά την υδρόλυση του αμύλου είναι η β-μαλτόζη. Επιπροσθέτως, η σίγηση ενός γονιδίου που κωδικοποιεί μια χλωροπλαστική β-αμυλάση στη πατάτα (Scheidig et al., 2002) είχε ως αποτέλεσμα υψηλότερα επίπεδα αμύλου στο φύλλο όπως συμβαίνει και με το ορθόλογό της στο *Arabidopsis*.

Η τύχη της μαλτόζης και της μαλτοτριόζης

Υπάρχουν μερικοί τρόποι μεταβολισμού της μαλτόζης στα πλαστίδια αλλά ποιός ακριβώς ακολουθείται στους χλωροπλάστες δεν έχει ακόμη διευκρινιστεί. Η φωσφορυλάση της μαλτόζης (EC 2.4.1.8) που έχει αναφερθεί στο μπιζέλι μετατρέπει

τη μαλτόζη σε 1-φωσφορογλυκόζη και γλυκόζη (Kruger and ap Rees 1993). Το ένζυμο αυτό όμως δεν έχει αναφερθεί σε άλλα φυτά ούτε το γονιδίωμα του Arabidopsis περιέχει κανένα ομόλογο γονίδιο με τη βακτηριακή φωσφορυλάση της μαλτόζης (Boos and Schuman 1998). Αντίθετα, το γονιδίωμα του Arabidopsis περιέχει πέντε ένζυμα που κατατάσσονται ως α-γλυκοζιδάσες (EC 3.2.1.20). Τουλάχιστον κάποια από αυτά ίσως είναι ικανά να υδρολύσουν μαλτόζη και να παράγουν γλυκόζη αλλά κανένα από αυτά δεν έχει χαρακτηριστεί ως πλαστιδιακό ένζυμο. Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις ότι η μαλτόζη που παράγεται κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του αμύλου εξάγεται στο κυτόπλασμα μέσω ειδικών φορέων μάλλον παρά μεταβολίζεται στους χλωροπλάστες. Οι Reidel et al 2008 σε πρόσφατη μελέτη στο Arabidopsis καταδεικνύει ένα καινούργιο φορέα μαλτόζης που συμμετέχει στη μεταφορά της μαλτόζης στο κυτόπλασμα, βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του χλωροπλάστη. Μεταλλάγματα του φορέα αυτού προκαλούν συσσώρευση του αμύλου και της μαλτόζης στα φύλλα του Arabidopsis. Τα επίπεδα της μαλτόζης είναι τουλάχιστον 40 φορές υψηλότερα από αυτά των φύλλων του αγρίου τύπου. Παρατηρείται επίσης αύξηση της συγκέντρωσης της μαλτόζης τη νύχτα και μείωση της κατά τη ημέρα. Εκτός από τη μαλτόζη, η αμυλολυτική δράση της β-αμυλάσης αναμένεται να παράγει και μικρότερα ποσά μαλτοτριόζης επειδή το ένζυμο αδυνατεί να δράσει σε αλυσίδες μικρότερες των τεσσάρων γλυκοζιτικών καταλοίπων (Lizotte et al 1990). Το μόνο γνωστό ένζυμο που μεταβολίζει τη μαλτοτριόζη που κωδικοποιείται από το γονιδίωμα του Arabidopsis είναι χλωροπλαστικό και χαρακτηρίζεται ως α-(1,4) γλυκανοτρανσφεράση (DPE1 disproportionating enzyme) που δυνητικά μετατρέπουν δύο μόρια μαλτοτριόζης σε ένα μόριο μαλτοπενταόζης και ένα μόριο γλυκόζης. Η μαλτοπενταόζη είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα για τη β-αμυλάση και η γλυκόζη εξάγεται από τα πλαστίδια (Weber et al 2000).

Ο μεταβολισμός της μαλτόζης στο κυτόπλασμα

Η πιο προφανής τύχη της μαλτόζης στο κυτόπλασμα θα ήταν η υδρόλυσή της μέσω μιας α-γλυκοζιδάσης, που ακολουθείται από τη μετατροπή της παραγόμενης γλυκόζης σε 6-φωσφορογλυκόζη μέσω της εξοζοκινάσης. Αυτό το μονοπάτι όμως, δεν φαίνεται να λειτουργεί. Αντίθετα η μαλτόζη μεταβολίζεται μέσω τρανσγλυκοζυλίωσής της. Οι ενδείξεις για την τύχη της μαλτόζης προέρχονται από την εξέταση μεταλλαγών που δεν έχουν μια συγκεκριμένη τρανσγλυκοζιδάση (DPE2),

που σχετίζεται δομικά με τις αμυλομαλτάσες (Boos and Schuman 1998), ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της μαλτόζης στα βακτήρια. Η τρανσγλυκοζιδάση αυτή που υπάρχει στα φύλλα του *Arabidopsis*, μπορεί να μεταφέρει κατάλοιπα γλυκόζης της μαλτόζης σε διακλαδισμένες πολυγλυκάνες και απελευθερώνει το άλλο ως γλυκόζη (Chia *et al* 2004). Τα μεταλλάγματα έχουν ίδιο φαινότυπο με αυτό των μεταλλαγμάτων του φορέα της μαλτόζης. Τα επίπεδα της μαλτόζης είναι πολλαπλάσια αυτών της φυτών αγρίου τύπου και η αποδόμηση του αμύλου παρεμποδίζεται (Chia *et al* 2004, Lu and Sharkey 2004), πράγμα που δείχνει ότι ο μεταβολισμός μέσω της DPE2 είναι ο κύριος ή μόνος τρόπος με τον οποίο η μαλτόζη εξάγεται από το κυτόπλασμα. Είναι μάλλον εύκολο να υποτεθεί ότι η γλυκόζη που απελευθερώνεται από τη μαλτόζη μέσω της DPE2 μετατρέπεται σε φωσφοροεξόζη μέσω της εξοζοκινάσης. Η τύχη του δεύτερου κατάλοιπου της μαλτόζης παραμένει άγνωστη.

Η έκφραση και η δραστηριότητα της β-αμυλάσης υπό συνθήκες καταπόνησης.

Οι β-αμυλάσες υπόκεινται μια σύνθετη ρύθμιση. Η έκφραση και η ενεργότητα ρυθμίζονται από το φως (Sharma and Schopfer, 1982; Harmer et al., 2000; Chandler et al., 2001; Tepperman et al., 2001), τα σάκχαρα (Nakamura et al., 1991; Mita et al., 1995; Maeo et al., 2001), τις φυτορμόνες (Ohto et al., 1992; Wang et al., 1996), με μερική πρωτεόλυση (Hara-Nishimura et al., 1986; Sopanen and Lauriere, 1989), και καταπονήσεις από αβιοτικούς παράγοντες (Dreier et al., 1995; Nielsen et al., 1997; Datta et al., 1999; Seki et al., 2001; Sung, 2001). Η ρύθμιση της έκφρασης και της ενεργότητας της β-αμυλάσης από αβιοτικούς παράγοντες περιλαμβάνει την ωσμοτική καταπόνηση (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999), την αλατότητα (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999), τις χαμηλές (Nielsen et al., 1997; Seki et al., 2001; Sung, 2001), και τις υψηλές θερμοκρασίες (Dreier et al., 1995). Η ρύθμιση της ενεργότητας της β-αμυλάσης σε περίπτωση οσμωτικής καταπόνησης φαίνεται να προκαλεί μια γενική αντίδραση σε αρκετά φυτικά είδη (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999). Η έκθεση του κριθαριού (Hordeum vulgare) (Dreier et al., 1995), του κεχριού (Pennisetum glaucum) και του αραβόσιτου (Zea mays; Datta et al., 1999) σε οσμωτική καταπόνηση έχει επίσης ως αποτέλεσμα την αύξηση της ενεργότητας της β-αμυλάσης, η οποία επίσης σχετίζεται με την αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεϊνης. Όπως είναι αναμενόμενο και η καταπόνηση αλατότητας αυξάνει τη συγκέντρωση της β-αμυλάσης καθώς και την ενεργότητα της στο κριθάρι και στον αραβόσιτο (Dreier et al., 1995; Datta et al., 1999).

Η έκφραση (Seki et al., 2001; Sung, 2001) ή και ενεργότητα (Nielsen et al., 1997) της β-αμυλάσης αυξάνεται κατά τη διάρκεια καταπόνησης είτε υψηλών είτε χαμηλών θερμοκρασιών. Όταν φυτά *Arabidopsis* δέχθηκαν την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών (4°C για 12 h), η έκφραση της β-αμυλάσης (AJ25034; ct-Bmy or BMY8)(AT4G17090) αυξήθηκε περίπου 14 φορές (Sung, 2001). Η αύξηση των μεταγραφημάτων διαπιστώθηκε μόλις 2h μετά την έκθεση των φυτών σε χαμηλή θερμοκρασία (Seki et al., 2001). Παρόμοια ήταν τα αποτελέσματα σε κονδύλους πατάτας όταν η θερμοκρασία αποθήκευσης μειώθηκε σταδιακά από 20°C σε 5°C και τέλος σε 3°C, και η ενεργότητα της β-αμυλάσης αυξήθηκε κατά 4 μέχρι 5 φορές για χρονική περίοδο μεγαλύτερη των 10 ημερών. Η αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου ακολουθείται από συσσώρευση μαλτόζης, ενώ ότι η ενεργότητα άλλων ενζύμων που υδρολύουν το άμυλο όπως η α-γλυκοσιδάση και η ενδοαμυλάση παραμένει η ίδια (Nielsen et al., 1997). Η αύξηση της θερμοκρασίας από 25°C σε 35°C αυξάνει επίσης την ενεργότητα της β-αμυλάσης (Dreier et al., 1995) κατά τη διάρκεια της ανάδυσης των σποροφύτων του κριθαριού.

Ένας αριθμός μελετών με μικροσυστοιχίες στο *Arabidopsis* έχουν δείξει ότι οι βαμυλάσες που εδράζονται στους χλωροπλάστες, (BMY7 και BMY8), είναι ευαίσθητες σε καταπονήσεις χαμηλών και υψηλών θερμοκρασιών (Seki et al., 2001, 2002; Sung, 2001; Fowler and Thomashow, 2002; Kreps et al., 2002; Jung et al., 2003). Ομως, ακόμη και αν η ανάλυση των μεταγραφημάτων δίνει πολύτιμες πληροφορίες για τη ρύθμιση των γονιδίων που κωδικοποιούν τις αμυλάσες, απαιτούνται δεδομένα σχετικά με την ενεργότητα των ενζύμων ή τη συγκέντρωση των μεταβολιτών για να αποκαλυφθεί πλήρως ο λειτουργικός τους ρόλος.

Οι Kaplan and Guy (2004) αναφέρουν ότι, η επαγόμενη υπό συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης συσσώρευση μαλτόζης ίσως συνεισφέρει στη προστασία της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων, των πρωτεϊνών και των μεμβρανών των χλωροπλαστών κατά τη διάρκεια της καταπόνησης.

Η κατανόηση της επίδρασης των περιβαλλοντικών ερεθισμάτων στο μεταβολισμό του αμύλου ήταν δύσκολη στο παρελθόν λόγω του ότι τα βιοχημικά μονοπάτια της σύνθεσης και της υδρόλυσης του παροδικού αμύλου δεν ήταν επαρκώς γνωστά. Τα τελευταία χρόνια έχει μερικώς διευκρινιστεί ο τρόπος της υδρόλυσης του παροδικού αμύλου. Ανιχνεύτηκε δηλαδή η παρουσία ενζύμων που σχετίζονται με τη

φωσφορόλυση ή την υδρόλυση του αμύλου, και για αρκετά χρόνια η φωσφορόλυση εθεωρείτο ο κύριος τρόπος διάσπασης του αμύλου (Stitt, Bulpin and Rees 1978; Stitt and ap Rees 1980; Stitt and Heldt 1981). Ένας πιθανός ρόλος της φωσφορολυτικής υδρόλυσης του αμύλου είναι να προμηθεύει άνθρακα στο μονοπάτι των φωσφοροπεντοζών (Stitt and Heldt 1981). Οι Stitt and Heldt (1981) έδειξαν ότι το μονοπάτι των φωσφοροπεντοζών και η γλυκόλυση συνεισφέρουν σημαντικά στο μεταβολισμό των χλωροπλαστών σε συνθήκες σκότους στο σπανάκι (*Spinacia oleracea*). Η παρουσία της μαλτόζης κατά τη διάρκεια της υδρόλυσης του αμύλου έχει αναφερθεί αρκετές φορές (Levi and Gibbs 1976; Herold *et al.* 1981; Kruger and ap Rees 1983; Neuhaus and Schulte 1996). Και όμως η σπουδαιότητα της μαλτόζης στο μεταβολισμό του αμύλου μόνο πρόσφατα έχει αναγνωριστεί.

Η μαλτόζη έχει την ικανότητα να προστατεύει τις πρωτεΐνες, τις μεμβράνες και τη φωτοσυνθετική αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων σε φυσιολογικές σημαντικές ποσότητες κάτω από θερμοκρασιακές καταπονήσεις (Kaplan and Guy 2004). Αυξημένες ποσότητες της ολικής μαλτόζης των φύλλων στο *Arabidopsis thaliana* έχουν παρατηρηθεί κατά τη διάρκεια θερμοκρασιακών καταπονήσεων (Kaplan and Guy 2004).

Η έκφραση του γονιδίου *BAM3* μειώνεται τόσο κατά τη διαρκεια χαμηλών (Nielsen Deiting and Stitt 1997; Seki *et al.* 2001; Kaplan and Guy 2004) όσο και υψηλών θερμοκρασιών (Dreier, Schnarrenberger and Borner 1995; Kaplan and Guy 2004).

Σκοπός της μελέτης

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί μεγάλο ενδιαφέρον ως προς το ρόλο της β-αμυλάσης. Ο λόγος οφείλεται κυρίως στο γεγονός ότι ενώ για χρόνια εθεωρείτο ότι το κύριο υδρολυτικό ένζυμο του αμύλου ήταν η α-αμυλάση τελικά αποδεικνύεται ότι το βασικότερο ένζυμο στην υδρόλυση του αμύλου είναι η β-αμυλάση.

Ο σκοπός της μελέτης μας ήταν να διερευνηθεί η παρουσία του ενζύμου στα διάφορα φυτικά όργανα και να εκτιμηθεί η δραστηριότητά του σε συνθήκες καταπόνησης χαμηλών θερμοκρασιών.

<u>2. Υλικά και Μέθοδοι.</u>



Βλάστηση σπερμάτων και έκθεση των φυταρίων στο ψύχος.

Η βλάστηση των σπερμάτων της κολοκυθιάς έγινε μεταξύ υγραμένων φύλλων χαρτιών κουζίνας σε τυλιγμένα με αλουμινόχαρτο κουτιά στο σκοτάδι, σε θερμοκρασία 25°C. Πέντε ημέρες μετά τη βλάστηση των σπερμάτων ακολουθούσε συλλογή και φωτογράφηση των δειγμάτων και χρησιμοποιήθηκαν είτε για τομές είτε για εκχύλιση πρωτεινών. Παράλληλα, δείγματα που ήταν έτοιμα προς συλλογή μεταφέρθηκαν στο ψυγείο στους 8°C όπου και αφέθηκαν να μεγαλώσουν μέχρι και πέντε επιπλέον ημέρες. Μετά το πέρας της πρώτης, τρίτης και πέμπτης ημέρας στο ψύχος συλλέχθηκαν αντιπροσωπευτικά δείγματα και ακολούθησε εκχύλιση πρωτεινών.

Η εκχύλιση του ενζύμου.

Αρχικά σπέρματα κολοκυθιάς προβλαστήθηκαν με τον τρόπο και με τις συνθήκες που περιγράφηκαν παραπάνω. Μετά από πέντε ημέρες έγιναν τομές των αρτίβλαστων ξεχωρίζοντας τα δείγματα σε ρίζες, κοτύλες και υποκοτύλια. Στη συνέχεια τα δείγματα ζυγίστηκαν και λειοτριβήθηκαν σε γουδί στους 4°C προσθέτοντας τον αντίστοιχο όγκο εκχυλιστικού ως εξής: 1:1 (w/v) στις ρίζες και στις κοτύλες και 1/0,5 (w/v) στα υποκοτύλια. Τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν μέσα σε eppendorf στον πάγο.

Τα δείγματα ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στα 1500g για 15 λεπτά και 4°C. Στο εκχύλισμα των κοτυλών παρατηρήθηκε συσσώρευση λιπιδίων στην επιφάνεια του υπερκείμενου υγρού. Γι' αυτό το λόγο το λίπος «ξαφρίστηκε» με χρήση πιπέτας και στη συνέχεια τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν και πάλι στις ίδιες συνθήκες. Μετά το πέρας και αυτής της διαδικασίας προστέθηκε σταδιακά γλυκερίνη σε κάθε δείγμα ώστε η τελική της συγκέντρωση να γίνει 20%. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των πρωτεινών των δειγμάτων με τη μέθοδο Bearden. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα χωρίσθηκαν σε δύο μέρη. Στο ένα μέρος προστέθηκαν λίγοι κόκκοι κυανούν της βρωμοφαινόλης για την ηλεκτροφόρηση. Το άλλο μέρος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της β- αμυλάσης.

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών.

10mM Tris HCl pH 7,5 15% γλυκερίνηΙ 0.02% BSA

31

Η μέτρηση της ενεργότητας της β-αμυλάσης

Για τη μέτρηση της ενεργότητας της β-αμυλάσης κρίθηκε απαραίτητος ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεινών των εκχυλισμάτων. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με τη μέθοδο Bearden (1978).

<u>Διάλυμα Bearden</u>

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

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

Μετά την εκχύλιση των πρωτεινών και τη φυγοκέντρηση ετοιμάσθηκαν 3 σωλήνες για κάθε δείγμα (ρίζα, υποκοτύλιο, κοτύλη) που περιείχαν 1.5ml dH₂O, 10μl εκχυλίσματος και 1.5ml διαλύματος Bearden. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένας σωλήνας που περιείχε 1.5ml dH₂O και 1.5ml διαλύματος Bearden. Ακολούθως έγινε φωτομέτρηση στα 595nm. Σημειώνεται ότι η κοτύλη είχε αραιωθεί με αποσταγμένο νερό σε όγκο 1:10. Αυτό έγινε λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας της κοτύλης σε πρωτείνη. Μετά τις επαναληπτικές μετρήσεις για κάθε δείγμα υπολογίζεται η συγκέντρωσης της συνολικής πρωτείνης βάσει της πρότυπης καμπύλης.

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας της β-αμυλάσης.

Για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου ακολουθήθηκαν το πρωτόκολλο της Megazyme της μεθόδου Betamyl. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην υδρόλυση του p-νιτροφαινυλο-μαλτοπενταοζιδίου από την β-αμυλάση. Η παραγόμενη μαλτόζη καθώς και η p-νιτροφαινυλογλυκόζη υδρολύεται αμέσως από μία α-γλυκοζιδάση. Σε προκαταρκτικά πειράματα μελετήθηκε η πορεία της αντίδρασης κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας (40°C) και συγκέντρωσης ενζύμου.

Το διάλυμα αντίδρασης περιείχε 100μΙ ενζυμικού εκχυλίσματος (17 έως 22μg

ολικών πρωτεινών κατά Bearden) και 100μΙ αντιδραστηρίου (Betamyl). Μετά από 10min σε υδατόλουτρο 40°C προστίθεντο 1500μΙ 1% Trisma base για την περάτωση της αντίδρασης. Η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου έγινε στα 410nm και αφορούσε την απελευθέρωση της p-νιτροφαινόλης.

Όλες οι φωτομετρήσεις έγιναν με φασματοφωτόμετρο UV-160A (Shimadzu).

Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεινών.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% ολικής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου με 2,7% bis-ακρυλαμίδιο, σε ασυνεχές σύστημα του οποίου τα συστατικά αναφέρονται παρακάτω. Ακολούθως φορτώθηκε με εκχύλισμα πρωτεϊνών που αντιστοιχούσε περίπου σε 50μg πρωτείνης από κάθε ιστό.

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

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

Α. Πηκτή ανάλυσης 6%Τ, 2.7%C

Μητρικό διάλυμα ακρυλαμιδίου, Bis-ακρυλαμιδίου (30%, 2.7%)			
Ρυθμιστικό διάλυμα Ανάλυσης	2.50ml		
Αποσταγμένο νερό	6.00ml		
10% Υπερθειικό Αμμώνιο	50µl		
TEMED	10µl		

Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης

378mM Tris-HCl pH 8.9

B. Πηκτή συσσώρευσης (Stacking Gel) 3%T, 2.7%C

Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμιδίου, Bis- Ακρυλαμιδίου (30%, 2.7%)		7%)	1.25ml	
Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης		5.0ml		
Αποσταγμένο Νερό		3.5ml	10%	
Υπερθειικό Αμμώνιο	150µl			
TEMED		10µl		

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης

63mM Tris-HCl pH 6.8

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεινών

25mM Tris 192mM γλυκίνη

Η ανίχνευση της ενεργότητας της β-αμυλάσης εντός της πηκτής.

Η ανίχνευση της ενεργότητας της β-αμυλάσης εντός της πηκτής γίνεται συνήθως με την υδρόλυση του αμύλου που περιέχει η πηκτή της ηλεκτροφόρησης και τη διαπίστωση του καστανέρυθρου χρώματος μετά τη χρώση με ιώδιο. Στη μελέτη μας όμως χρησιμοποιήσαμε μια νέα τεχνική. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην υδρόλυση της παραγόμενης από το ένζυμο μαλτόζης με το ένζυμο φωσφορυλάση της μαλτόζης, και την οξείδωση της παραγόμενης α-D-γλυκόζης προς 6-φωσφορογλυκονικό οξύ. Κατά τη οξείδωση αυτή τα ηλεκτρόνια μέσω του ΝΑDH μεταφέρονται στο κυανούν του νιτροτετραζολίου και σχηματίζουν αδιάλυτες φορμαζάνες.

Μοριακές συγκεντρώσεις.

50mM Φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0 20mM KCl 2mM MgCl₂ 6H₂O 1mM μαλτοεξαόζη 5U/ml φωσφορυλάση της μαλτόζης 2U/ml Εξοζοκινάση 2.5mM ATP 2.5U/ml Αφυδρογονάση της 6-φωσφορογλυκόζης 1mM NAD 0.03% NBT

Η ανοσοβιοχημική μελέτη.

Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν πολυκλωνικά αντισώματα εναντίον της β-αμυλάσης της γλυκοπατάτας (Biodesign) που παράχθηκαν σε κουνέλια.

Ο ανοσοεντοπισμός έγινε σε τομές ριζών, υποκοτυλίου και κοτυλών από δείγματα που είχαν υποστεί την παρακάτω επεξεργασία.

Προσήλωση.

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

Αφυδάτωση.

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

Διαφανοποίηση.

Στη συνέχεια διαφανοποιήθηκαν με διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ξυλενίου, διαδοχικά ως εξης: 25% ξυλένιο-75% αιθανόλη, 50% ξυλένιο-50% αιθανόλη, 75% ξυλένιο-25% αιθανόλη, 100% ξυλένιο για 3 φορές.

Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη.

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

Προετοιμασία αντικειμενοφόρων.

1. Οι αντικειμενοφόροι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν πλένονται σε διάλυμα 1% SDS για 2 περίπου ώρες, για να απομακρυνθούν από αυτές οι τυχόν λιποδιαλυτές ουσίες.

- 2. Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό, σε συνεχή ροή.
- 3. Ακολουθεί πλύσιμό τους επίσης για 2 ώρες σε διάλυμα υδροχλωρίου 5%.
- 4. Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και αποστειρώνονται.
- 5. Ακολουθεί εμβάπτιση τους σε διάλυμα 1% w/v πολυλυσίνης.
- 6. Τέλος, αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μέρες, και,
- 7. Ακολουθεί φύλαξή τους στο ψυγείο.

Μικροτομήσεις.

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

Αποπαραφίνωση

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

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

Ο ανοσοεντοπισμός της β- αμυλάσης.

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 1:1500 αραίωση του αντισώματος (Rabbit antisweet potato b-amylase polyclonal), σε διάλυμα TBST με 1% BSA, και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για τουλάχιστον 12h σε θερμοκρασία 4°C.
- Το μη δεσμευμένο αντίσωμα ξεπλένεται 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 της αλκαλικής φωσφατάσης 10min, και καλύπτονται με διάλυμα χρωματικής αντίδρασης (25μl/ml).
- Η χρωματική αντίδραση γίνεται στο σκοτάδι και η ανάπτυξη του χρώματος ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο, ούτως ώστε να προληφθεί η ανάπτυξη μη εξειδικευμένου σήματος υποβάθρου.
- Η αντίδραση σταματά με καλό ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με αποσταγμένο νερό.
- Ακολουθεί αφυδάτωση με διαδοχικές εμβαπτίσεις, σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης 10%, 30%, 50%, 70%, 90% και δύο φορές σε 100% για ένα λεπτό σε κάθε διάλυμα.
- Τέλος, αφού στεγνώσουν καλά οι τομές, μονιμοποιούνται οι τομές καλύπτονται με DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας.

Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεινών 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 5 φύλλων χαρτιού 3ΜΜ 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 5 φύλλα χαρτιού 3MM και αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες αέρα.
- Μεταφορά των πρωτεινών στα 200mA για 45min, υπό ψύξη.
- Μετά την ηλεκτροφόρηση σημειώνεται το φύλλο νιτροκυτταρίνης που είχε τοποθετηθεί στην κάθοδο και φυλάσσεται μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.

Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.

- Κόβονται ταινίες νιτρικυτταρίνης (πλάτους 5mm) από το φύλλο της νιτρικυτταρίνης 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 νιτρικυτταρίνης σε 1% ζελατίνης (BDH).

- Επώαση της ταινίας με αντίσωμα σε αραίωση 1:1500. 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 3φορές επί 5min TBST 1% ζελατίνης.
- Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος mouse anti-rabbit IgG (Fc) συνδεδεμένου με αλκαλική φωσφατάση σε αραίωση 1:5000 για 90min.
- Απομάκρυνση της περίσσειας του δευτερογενούς αντισώματος με τρείς φορές επί 5min TBST 1% ζελατίνης.
- Ανίχνευση δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης με την επώαση των ταινιών σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης για 3min παρουσία χρωμοφόρου.
- Αφυδάτωση και φύλαξη της νιτροκυτταρίνης μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.
- Φωτογράφηση της νιτροκυτταρίνης μέσω σάρωσής τους με επίπεδο σαρωτή.

Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου στις τομές των φυτικών οργάνων.

- Δέσμευση των μη ενεργών θέσεων των τομών για 1h σε 1% BSA σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Επωάση των τομών με διάλυμα αντισώματος σε αραίωση 1:1500 σε TBST 1% BSA στους 4°C για 16h.
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBST 3 φορές επί 5min για την απομάκρυνση του αδέσμευτου πρωτογενούς αντισώματος.
- Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος σε αραίωση 1:5000 για 1h30min.
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBST 3 φορές επί 5min για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος.
- Εντοπισμός της αλκαλικής φωσφατάσης με NBT/BCIP (66 μl/33μl BCIP σε10ml ρυθμιστικού διαλύματος ανίχνευσής της).
- Αφυδάτωση των τομών σε σειρά EtOH.
- Εφαρμογή DPX.
- Η χρώση του μάρτυρα έγινε με Orange G σε απόλυτη αλκοόλη.

Έλεγχος αποτελεσματικότητας της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεινών:

- Πριν από τη χρήση της νιτροκυτταρίνης για τον έλεγχο της καταλληλότητας των αντισωμάτων ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς της β-αμυλάσης στη νιτροκυτταρίνη. Για το σκοπό αυτό ταινίες νιτροκυτταρίνης επωάσθηκαν με το διάλυμα ανίχνευσης ενεργότητας της β-αμυλάσης.
- Παράλληλα, μετά τη μεταφορά των πρωτεινών στη νιτροκυτταρίνη ελέγχθηκε η ύπαρξη του ενζύμου στην πηκτή και βρέθηκε ελάχιστη ως μηδαμινή.

<u>Διαλύματα.</u>

TBST

20 mM Tris HCl pH 7.5 150mM NaCl 0.05% Tween 20

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης

10ml ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης 33μl 5–βρωμο-3-χλωρο-ινδολυλο- φωσφορικό (BCIP) 66μl κυανούν του τετραζολίου (NBT)

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης

100mM Tris pH 9.5 100mM NaCl 50 mM MgCl₂

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεινών

24mM Tris 192mM γλυκίνη 20% μεθανόλη

<u>3. Αποτελέσματα.</u>

Η δραστηριότητα της β-αμυλάσης σε εκχυλίσματα ριζών εντός της πηκτής.

Οι φωτογραφίες των ηλεκτροφορημάτων των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών από εκχυλίσματα ριζών παρατίθονται στην **Εικόνα 5.** Η αντίδραση εντοπισμού έδωσε σήμα εντός περίπου 20min. Παρατηρείται η ύπαρξη σαφώς διαχωρισμένων ηλεκτροφορητικών ζωνών. Στα εκχυλίσματα ριζών φυτών που αναπτύχθηκαν για πέντε ημέρες σε 8°C βρέθηκε μια επιπλέον ηλεκτροφορητική ζώνη (βέλη). Σχε σχέση με τα εκχυλίσματα του μάρτυρα (Α). Η ύπαρξη των ηλεκτροφορητικών ζωνών στους προαναφερθέντες ιστούς μας δίνει τη δυνατότητα να υποστηρίξουμε την ύπαρξη ενζυμικής δραστηριότητας της αμυλάσης στους συγκεκριμένους ιστούς αφού το υπόστρωμα επώασης ήταν η μαλτοεξαόζη. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε εφαρμόστηκε για πρώτη φορά μετά από προσεχτικό σχεδιασμό του πειράματος.



Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων

Για τον ανοσοεντοπισμό της β-αμυλάσης χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που είχαν παραχθεί εναντίον της β-αμυλάσης της γλυκοπατάτας (Biodesign, rabbit anti beta amylase). Για αυτό το λόγο θεωρήσαμε σκόπιμο να εξεταστεί η καταλληλότητα των αντισωμάτων. Οι πρωτείνες των ηλεκτροφορημάτων των ριζών μεταφέρθηκαν σε φύλλο νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ο ανοσοεντοπισμός των πρωτεινών σε αυτό.

Στην Εικόνα 6 παρατίθονται τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού της βαμυλάσης μετά από την ηλεκτρομεταφορά σε φύλλα νιτροκυτταρίνης. Όπως φαίνεται από την τανία Δ, τα αντισώματα αναγνωρίζουν όλες τις ηλεκτροφορητικές ζώνες δραστηριότητας που εντοπίζονται σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.



Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης.

Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης δείχνει τους ιστούς στους οποίους κατά τη στιγμή της προσήλωσης υπάρχει το ένζυμο και τη σχετική αφθονία του. Το ένζυμο εντοπίστηκε σε εγκάρσιες τομές ρίζας, υποκοτυλίου και των κοτυλών. Η παρουσία μοβ-μπλέ χρωματισμού σηματοδοτεί την παρουσία της β-αμυλάσης στους φυτικούς ιστούς. Ο ανοσοεντοπισμός του ενζύμου στις ρίζες, σε εγκάρσιες τομές στην περιοχή της καλύπτρας, έδειξε ότι το ένζυμο εντοπίζεται τόσο σε όλα τα κύτταρα της καλύπτρας (K), όσο και στην κεντρική περιοχή (columella) (KM) (**Εικόνα 7**). Επίσης σε εγκάρσιες τομές στην περιοχή ακριβώς μετά το ακρορίζιο η πρωτείνη εντοπίστηκε κυρίως στην αναπτυσσόμενη επιδερμίδα (Ε), και στην περιοχή του προκαμβίου (Π). Ασθενέστερο ήταν το σήμα στην περιοχή του κεντρικού κυλίνδρου (KK), και στο φλοιώδες παρέγχυμα (ΦΠ) (**Εικόνα 8**).



Σε μεγαλύτερες αποστάσεις από το ακρορρίζιο, και συγκεκριμένα στην περιοχή των διαιρέσεων του εξωτερικού φλοιώδους παρεγχύματος παρατηρήθηκε επίσης έντονος χρωματισμός στις στρώσεις αυτές, όπως επίσης εντοπίζεται και στην αναπτυσσόμενη επιδερμίδα (Ε), κοντά στα αγγεία του ξύλου (Ξ), στον ηθμό και τέλος στον κεντρικό κύλινδρο (ΚΚ) (Εικόνα 9). Παρατίθεται επίσης ρίζα κολοκυθιάς που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της δημιουργίας των αντισωμάτων και εν συνεχεία ακολουθήκε η τυπική διαδικασία εφαρμογής δευτερογενών αντισωμάτων και ανάπτυξης του χρώματος (μάρτυρας) (Εικόνα 10)



Στη περιοχή του σχηματισμού των καταβολών των πλαγίων ριζών, το ένζυμο



εντοπίζεται κυρίως στον κεντρικό κύλινδρο (ΚΚ), στις ριζικές καταβολές (ΡΚ). Και στην επιδερμίδα (Εικόνα 11,13), επίσης παρατηρήθηκε έντονος χρωματισμός στα αγγεία του ξύλου (ΑΞ), στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες κυρίως στον ηθμό (Η) (Εικ 12).



Στο υποκοτύλιο (Εικόνα 14) η β-αμυλάση εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ). Στην περιοχή της ηθμαγγειώδους δεσμίδας (Εικόνα 15) το σήμα είναι εντονότερο στα αυξανόμενα αγγεία του ξύλου (Ξ) καθώς και στον εσωτερικό (ΕσΗ) και στον εσωτερικό ηθμό(ΕσΗ) ενώ αντίθετα δε παρατηρείται σήμα στο σκληρεγχυμα (Σ).



Τέλος, στις κοτύλες (Εικόνα 16, Εικόνα 17, Εικόνα 18) παρατηρείται γενικευμένος εντοπισμός της β-αμυλάσης σε όλη τη τομή. Παρατίθεται επίσης κοτύλη κολοκυθιάς που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της δημιουργίας των αντισωμάτων και εν συνεχεία ακολουθήκε η τυπική διαδικασία εφαρμογής δευτερογενών αντισωμάτων και ανάπτυξης του χρώματος (μάρτυρας) (Εικόνα 19).

+HΔ Imm	Εικ.16. Ανοσοεντοπισμός της β- αμυλάσης σε κοτύλη της κολοκυθιάς
lioum	Εικ.17. Ανοσοεντοπισμός της β- αμυλάσης σε τμήμα κοτύλης που γειτονεύει με την απαξόνια επιδερμίδα (λεπτομέρεια Εικ. 11).
200μm	Εικ.18. Λεπτομέρεια Εικ 11. Ανοσοεντοπισμός της β- αμυλάσης σε τμήμα κοτύλης που γειτονεύει με την προσαξόνια επιδερμίδα.
lmm	Εικ.19. Κοτύλη-μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης

Η μελέτη της δραστηριότητα της β-αμυλάσης.

Στο πείραμα οποίο μελετήθε επίσης η μεταβολή της δραστηριότητας του ενζύμου υπό συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης. Αρχικά, σπέρματα κολοκυθιάς βλάστησαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 25°C για πέντε ημέρες. Ακολούθως, συλλέχθηκαν νεαρά φυτάρια τα οποία τοποθετήθηκαν σε ψυγείο σε θερμοκρασία 8°C. Παράλληλα κάποια φυτάρια αφέθηκαν να μεγαλώσουν σε θερμοκρασία 25°C να χρησιμοποιηθούν ώστε να συγκριθεί η ανάπτυξή τους με τα φυτά που τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (Εικόνα 20).



Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 20** τα εκτός ψυκτικού θαλάμου φυτά αναπτύχθηκαν υπερβολικά σε σχέση με τα φυτά εντός ψυκτικού θαλάμου και γι' αυτό το λόγο ως μάρτυρα για το προσδιορισμό της δραστηριότητας της β-αμυλάσης χρησιμοποιήθηκαν φυτά πέντε ημερών δηλαδή φυτά που βρίσκονταν στο ίδιο περίπου αναπτυξιακό στάδιο με αυτά που τέθηκαν εντός ψυγείου. Εξάλλου από προκαταρκτικά πειράματα φάνηκε ότι η εκχυλίσιμη δραστηριότητα του ενζύμου των φυτών που είχαν ανάπτυξη όμοιας με τα φυτά Α της παραπάνω φωτογραφίας ήταν τελείως διαφορετική από εκείνη των φυτών που αναπτύχθηκαν στην ίδια

θερμοκρασία και είχαν ανάπτυξη Β.

Ο προσδιορισμός της *in vitro* δραστηριότητας της β-αμυλάσης.

Η δραστηριότητα της β-αμυλάσης προσδιορίστηκε φωτομετρικά σε ρίζες, υποκοτύλια και κοτύλες τόσο στο μάρτυρα όσο και σε φυτά που τέθηκαν για 1, 3 και 5 ημέρες στους 8°C. Για το σκοπό αυτό προσδιορίστηκε πρώτα το χρονικό διάστημα της επώασης των δειγμάτων και η ποσότητα του ενζυμικού εκχυλίσματος κατά τα οποία η παραγωγή του έγχρωμου προιόντος αυξανόταν γραμμικά. Οι προκαταρκτικές δοκιμές έδειξαν ότι με τη δεδομένη συγκέντρωση υποστρώματος η ταχύτητα της αντίδρασης παρέμενε σταθερή για 75μl εκχυλισμάτων που περιείχαν από 150-350μg ολικών πρωτεινών για 20min. Κατόπιν τούτου επιλέχθηκε η μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου για χρονικό διάστημα 10min.

Διάγραμμα 2.

Δραστηριότητα της β-αμυλάσης (U/mg πρωτείνης ανά λεπτό) στο μάρτυρα και σε φυτά που τέθηκαν σε ψύχος για 1, 3, 5 ημέρες (οι μπάρες δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου).



Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα, η δραστηριότητα του ενζύμου στο μάρτυρα είναι μεγαλύτερη στο υποκοτύλιο και σχετικά μικρότερη στην κοτύλη και τελευταία στη ρίζα. Η δραστηριότητα της β-αμυλάσης στα εκχυλίσματα όλων των οργάνων αυξάνεται σημαντικά την πρώτη ημέρα της έκθεσης των φυταρίων στους 8°C. Τις επόμενες ημέρες η δραστηριότητα του ενζύμου παραμένει σχεδόν σταθερή στα εκχυλίσματα των ριζών και του υποκοτυλίου ενώ στα εκχυλίσματα των κοτυλών εξακολουθεί να αυξάνεται.

4. Συζήτηση

Η νέα μέθοδος της ανίχνευσης της ενεργότητας της β-αμυλάσης εντός της πηκτής.

Η ανίχνευση της ενεργότητας της β-αμυλάσης εντός της πηκτής γίνεται συνήθως με την υδρόλυση του αμύλου που περιέχει η πηκτή της ηλεκτροφόρησης και τη διαπίστωση του καστανέρυθρου χρώματος μετά τη χρώση με ιώδιο (Kakefuda and Duke 1984). Η μέθοδος έχει τα παρακάτω μειονεκτήματα:

- Η παρουσία του αμύλου εντός της πηκτής παρεμποδίζει την κίνηση των πρωτεϊνών με συνέπεια οι ηλεκτροφορετικές ταινίες να φαίνονται διάχυτες.
- Εξαιτίας της παρουσίας του αμύλου, ο χρόνος ηλεκτροφόρησης είναι από 4-5 ώρες, με άγνωστες συνέπειες για την ενεργότητα των πρωτεϊνών.
- Στην κατακόρυφη ηλεκτροφόρηση το άμυλο κινείται μέσα στην πηκτή με συνέπεια να υπάρχει διαβάθμιση της συγκέντρωσής του εντός της πηκτής και ως εκ τούτου διαβάθμιση της χρωματικής αντίδρασης με το ιώδιο.
- Ο χρόνος επώασης της πηκτής είναι συνήθως παρατεταμένος (περίπου 3 ώρες). Τα προιόντα, όμως, της υδρόλυσης του αμύλου από τη β-αμυλάση (μαλτόζη, οριακές δεξτρίνες) είναι διαλυτά και διαχέονται εκτός της πηκτής. Επιπλέον, μετά το χρωματισμό της πηκτής με ιώδιο, το χρώμα παραμένει για λίγο χρόνο και στη συνέχεια διαχέεται στο διάλυμα επώασης.

Η νέα μέθοδος στηρίζεται στη χρήση της μαλτοεξαόζης ως υποστρωμα της βαμυλάσης. Η πηκτή δηλαδή δεν περιέχει άμυλο. Η παραγόμενη από το ένζυμο μαλτόζη υδρολύεται με το ένζυμο φωσφορυλάση της μαλτόζης η οποία παράγει 6φωσφορο-β-D-γλυκόζη και α-D-γλυκόζη. Η α-D-γλυκόζη μετατρέπεται σε 6φωσφορο-α-D-γλυκόζη μέσω της εξοζοκινάσης και στη συνέχεια οξειδώνεται μέσω της αφυδρογονάσης της 6-φωσφορογλυκόζης σε 6-φωσφορογλυκονικό οξύ με την ταυτόχρονη παραγωγή NADH. Τα ηλεκτρόνια του NADH μεταφέρονται στο κυανούν του νιτροτετραζολίου και σχηματίζουν αδιάλυτες φορμαζάνες που εντοπίζουν το ένζυμο.

Τα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι η πιθανή παρουσία άλλων υδρολυτικών ενζύμων που πιθανόν να παράγουν γλυκόζη ή μαλτόζη από τη μαλτοεξαόζη. Τα ένζυμα αυτά είναι η α-αμυλάση και οι γλυκοζιδάσες. Η χρήση όμως αφενός ειδικών υποστρωμάτων για τις γλυκοζιδάσες ή των αντισωμάτων για τις β-αμυλάσες μετά

την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών πιστοποιεί την ύπαρξη των ενζύμων.

Μαλτοεξαόζη μαλτόζη μαλτόζη μαλτόζη μαλτόζη β-D-γλυκόζη + α-D-γλυκόζη α-D-γλυκόζη + ΑΤΡ HK 6-P-α-D-γλυκόζη 6-P-α-D-γλυκόζη + NAD 6-P-α-D-γλυκόζη + NAD 6-P-γλυκονικό + NADH NADH + NBToξ. φορμαζάνες + NAD Εικ.21. Οι αντιδράσεις της μεθόδου για την ανίχνευση της ενεργότητας της βαμυλάσης. ΜΡ: φωσφορυλάση της μαλτόζης, ΗΚ: εξοζοκινάση, 6DH: αφυδρογονάση της 6-φωσφορογλυκόζης.

Με τη μέθοδο αυτή μελετήσαμε την ηλεκτροφορητική συμπεριφορά της βαμυλάσης από εκχυλίσματα οργάνων. Στους ιστούς των ριζών η πηκτή που επωάστηκε σε διάλυμα που περιείχε μαλτοεξαόζη κατέδειξε την ύπαρξη μερικών ηλεκτροφορητικών ζωνών. Η παρουσία περισσοτέρων της μιας ζωνών στις πηκτές πιθανόν να υποδηλώνει ότι το ένζυμο υπάρχει σε περισσότερους του ενός ισότυπους. Αυτό το αποτέλεσμα συμφωνεί και με τις βιβλιογραφικές αναφορές που σχετίζονται με τον αριθμό των γονιδίων που κωδικοποιούν την β-αμυλάση που στο *Arabidopsis* είναι εννέα Smith *et al.* (2004). Στις ρίζες των αρτιβλάστων που αναπτύχθηκαν για πέντε ημέρες στους 8°C παρατηρήθηκε η ύπαρξη μιας επιπλέον ταινίας, γεγονός που υποδεικνύει ότι όταν τα φυτά βρίσκονται σε συνθήκες ψυχρής καταπόνησης επάγεται κάποιος ισότυπος του ενζύμου που δεν εκφράζεται σε κανονικές συνθήκες.

Επειδή έχει αναφερθεί ότι τα μεταγραφήματα και πιθανόν η ενεργότητα της βαμυλάσης (BAM5) του Arabidopsis είναι υψηλότερα κατά την σκοτεινή περίοδο (Caspar *et al* 1991, Laby *et al* 2001) για να αποφύγουμε αυτή την πιθανή διακύμανση του ενζύμου όλες οι εκχυλίσεις έγιναν στις 12:00 (Chandler et al. 2001, Harmer et al. 2000, Lu et al. 2005, Smith et al. 2004).

Οι τιμές της ενεργότητας της β-αμυλάσης σε φυτά που αυξήθηκαν σε κανονικές συνθήκες βρέθηκαν μεταξύ 40 και 148U/mg πρωτεϊνών*min. Τα δεδομένα των μετρήσεων της ενεργότητας της β-αμυλάσης είναι ελάχιστα και εκφράζονται κυρίως ως U/g νωπού βάρους με εξαίρεση τις τιμές της ενεργότητας στο ριζικό άξονα της

μηδικής όπου καταγράφηκαν τιμές μεταξύ των 14 και 24U/mg πρωτεϊνών*min (Gana *et al* 1998). Η β-αμυλάση θεωρείται ως το κυριότερο αμυλολυτικό ένζυμο στους βολβούς του *Gladiolus klattianus* και η ενεργότητά της σε ακατέργαστο εκχυλίσμα των βολβών ήταν περίπου 440U/g ιστών (Dicko *et al* 2000). Επίσης, η ενεργότητα της β-αμυλάσης σε βλαστημένες καρυόψεις κριθαριού προσδιορίστηκε μεταξύ των 400-500U/g καρυόψεων (Dicko *et al* 2000). Ακόμη, στο αλεύρι του κριθαριού οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου έχουν προσδιοριστεί μεταξύ 230-1570U/g αλεύρου (Swanston and Molina-Cano 2000, Yin *et al* 2001, Clancy *et al* 2003). Με βάση την περιεκτικότητα των αλεύρων του κριθαριού σε εκχυλίσιμες πρωτεΐνες (Linko *et al* 1989) υπολογίστηκε ότι οι τιμές αυτές βρίσκονται μεταξύ 90 και 300U/mg πρωτεϊνών*min. Οι τιμές μας φαίνεται λοιπόν να εμπίπτουν στο εύρος των τιμών που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία.

Οι μετρήσεις της *in vitro* ενεργότητας του ενζύμου (**Διάγραμμα 2**), δείχνουν ότι η δραστηριότητα του ενζύμου στο μάρτυρα, είναι υψηλότερη στα υποκοτύλια και σχετικά μικρότερη στις κοτύλες και ακόμη χαμηλότερη στις ρίζες. Η ενεργότητα της β-αμυλάσης στα εκχυλίσματα όλων των οργάνων αυξάνεται σημαντικά την πρώτη ημέρα της έκθεσης των φυταρίων στους 8°C. Τις επόμενες ημέρες η δραστηριότητα του ενζύμου παραμένει σχεδόν σταθερή στα εκχυλίσματα των ριζών και του υποκοτυλίου ενώ στα εκχυλίσματα των κοτυλών εξακολουθεί να αυξάνεται. Τα αποτελέσματα αυτά είναι δυνατόν να ερμηνευθούν εάν υποτεθεί ότι οι κοτύλες υδρολύουν συστατικά του αμύλου τα οποία διοχετεύουν στο υπόλοιπο τμήμα του φυτού.

Η αυξημένη υδρόλυση του αμύλου από τη β-αμυλάση κατά την καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές σε διάφορα φυτικά είδη όπως στο *Arabidopsis* (Kaplan *et al*, 2007) και στην πατάτα (Nielsen et al 1997).

Η αυξημένη ενεργότητα της β-αμυλάσης καθώς και η παρουσία της επιπλέον ηλεκτροφορητικής ταινίας (Εικ. 5) στα φυτά που υπέστησαν ψυχρό χειρισμό πιθανόν να οφείλεται είτε στην αυξημένη ενεργότητα των υπαρχουσών β-αμυλασών είτε και στην ενεργότητα της νέας αυτής αμυλάσης. Υπάρχουν αρκετές μελέτες μικροσυστοιχιών στο *Arabidopsis* που δείχνουν ότι οι πλαστιδιακές β-αμυλάσες, BMY7 και BMY8, μεταγράφονται περισσότερο σε συνθήκες καταπόνησης χαμηλών θερμοκρασιών. (Seki et al., 2001; Sung, 2001; Fowler and Thomashow, 2002; Kreps et al., 2002; Jung et al., 2003).

Αυξημένη ενεργότητα β-αμυλασών υπό συνθήκες καταπόνησης έχει καταγραφεί

και από άλλους ερευνητές. Οι Subbaramaiah and Sharma(1989) μέτρησαν την ενεργότητα και τη συγκέντρωση της β-αμυλάσης κάτω από συνθήκες συνεχούς σκότους και υπό συνεχή ερυθρό φωτισμό. Η ενεργότητα του ενζύμου στις κοτυληδόνες του *Sinapis alba* αυξήθηκε και στις δύο περιπτώσεις σε συναρτήση του χρόνου παραμονής στις συνθήκες αυτές. Οι Todaka et. al. υπέβαλαν σε ωσμοτική καταπόνηση σε κοτυληδόνες του αγγουριού (*Cucumis sativus*) και παρατήρησαν επίσης αυξημένη ενεργότητα της β-αμυλάσης μετά την καταπόνηση.

Στα φυτικά κύτταρα η β-αμυλάση εντοπίζεται κατα κύριο λόγο στο στρώμα του μεσόφυλλου των χλωροπλαστών και δευτερευόντως στο κυτταρόπλασμα (Kaplan et al 2006). Η παρουσία της β-αμυλάσης στα πλαστίδια είναι αναμενόμενη επειδή το ένζυμο σχετίζεται με την υδρόλυση του αμύλου που εντοπίζεται στα οργανίδια αυτά. Ενδιαφέρον παρουσιάζει ο εντοπισμός του ενζύμου στο κυτταρόπλασμα (Van Damme et al 2001) όπου ως γνωστόν δεν ανιχνεύεται άμυλο. Υπάρχουν αρκετές β-αμυλάσες που στερούνται πεπιδίου οδηγού και θεωρούνται ως κυτοπλασματικές. Παρόλα αυτά τελευταίες μελέτες δίνουν αρκετά στοιχεία βάσει των οποίων μπορεί να δοθεί μια ερμηνεία για το φαινόμενο αυτό. Σύμφωνα με πρόσφατα πειραματικά δεδομένα βρέθηκε ένας φορέας μαλτόζης στη μεμβράνη των χλωροπλαστών που ευθύνεται για τη μεταφορά της μαλτόζης στο κυτταρόπλασμα κατά τη διάρκεια της νύχτας (Niittylea et al. 2004). Η μαλτόζη στη συνέχεια μεταβολίζεται στο κυτταρόπλασμα περαιτέρω σε γλυκόζη και ή σακχαρόζη και μαλτοδεξτρίνες μέσω της ενεργοποίησης μιας κυτοπλασμικής γλυκοτρανσφεράσης. Ο ρόλος της β-αμυλάσης πιθανολογείται ότι είναι η διάσπαση των μαλτοδεξτρινών.

Εξάλλου ο Okamoto *et. al.* 1979 ανοσοεντόπισε τη β-αμυλάση στην αλευρώνη του σπέρματος του ρυζιού. Εκεί βρίσκεται αποθηκευμένη με μή ενεργή μορφή ώστε όταν θα αρχίσει να αναπτύσεται το νέο φυτό να έχει έτοιμους τους μηχανισμούς για να μπορέσει να καταναλώσει άμεσα το άμυλο, που βρίσκεται αποθηκευμένο στο ενδοσπέρμιο των δημητριακών, και να παράγει την απαιτούμενη ενέργεια.

Η παρουσία της β-αμυλάσης σε αρτίβλαστα κολοκυθιάς εξετάστηκε στις ρίζες, τα υποκοτύλια και τις κοτύλες. Η παρουσία του ενζύμου στις ρίζες παρατηρήθηκε πως ήταν έντονη στην καλύπτρα, τη ζώνη επιμήκυνσης, στις καταβολές των πλαγίων ριζών και στον κεντρικό κύλινδρο (Εικόνα 7,8,9,11,12). Στα υποκοτύλια, το σήμα ήταν έντονο στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και ειδικότερα στα αγγεία του ξύλου στον εσωτερικό και εξωτερικό ηθμό (Εικόνα 14,15). Τέλος, στις κοτύλες παρατηρήθηκε γενικευμένος εντοπισμός της β-αμυλάσης με εντονότερο σήμα στη περιοχή των ηθμαγγειωδών δεσμίδων (Εικόνα 16,17,18).

Στην (Εικόνα 22) παρατηρούμε ότι στη ρίζα υπάρχει έντονη συσσώρευση αμύλου, κυρίως στη περιοχή της καλύπτρας και του ακρορίζιου όπου παρατηρήθηκε και έντονο σήμα εντοπισμού της β-αμυλάσης. Η σύμπτωση των προτύπων του εντοπισμού του αμύλου με αυτό του εντοπισμού της β-αμυλάσης παραπέμπει σε δραστηριότητα του ενζύμου στην υδρόλυση του εντοπιζόμενου με το ιώδιο άμυλο. Προφανώς η ανοσοεντοπιζόμενη σε αυτές τις περιοχές β-αμυλάση θα πρέπει να σχετίζεται με την υδρόλυση του αμύλου για την παραγωγή ενέργειας και σκελετών άνθρακα που είναι απαραίτητα για την αυξηση των κυττάρων στις περιοχές αυτές.



Εικ.22. Εντοπισμός του αμύλου σε επιμήκη τομή ρίζας κολοκυθιάς το άμυλο εντοπίζεται στην περιοχή της καλύπτρας (C) και την ζώνη επιμήκυνσης των κυττάρων (EZ). Χρώση KI-I.

Στα υποκοτύλια, η β-αμυλάση εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στον ηθμό και στο ξύλο. Με τη χρήση μονοκλωνικών αντισωμάτων οι Wang *et. al.* (1995), κατέδειξαν την ύπαρξη μιας ιστοεξειδεικευμένης β-αμυλάσης του ηθμού σε στελέχη των φυτικών ειδών Strephanthus tortuosus και Arabidopsis thaliana. Οι ίδιοι ερευνητές εντόπισαν επίσης μια β-αμυλάση και σε αναπτυσσόμενα αγγεία του ξύλου σε στελέχη του ίδιου φυτού.

Η παρουσία λοιπόν, της β-αμυλάσης στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες πιθανόν να σχετίζεται είτε με τη λειτουργία των ηθμοσωλήνων (Εικ 14,15) είτε με τη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων των αγγείων του ξύλου (Εικ 14,15). Είναι γνωστό ότι οι ηθμοσωλήνες περιέχουν άμυλο το οποίο πιθανόν να αποδομείται και να επανασυντίθεται για τη λειτουργία των ηθμοσωλήνων. Εξάλλου, η βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων απαιτεί μεγάλες ποσότητες γλυκόζης οι οποίες προέρχονται από υδρόλυση του αμύλου, αφού η συγκέντρωση του αμύλου στα κύτταρα που πρόκειται να εξελιχθούν σε αγγεία του ξύλου είναι μεγάλη και με την εξέλιξη των κυττάρων ελαχιστοποιείται.



Ενδιαφέρον είναι ότι παρόλο ότι στις κοτύλες δεν ανιχνεύεται αμυλόζη παρά μόνο πιθανόν αμυλοπηκτίνη (Εικ. 23) η παρουσία της β-αμυλάσης ήταν έντονη και επίσης καταγράφεται μεγάλη δραστηριότητα του ενζύμου. Είναι γνωστό (Longe *et al.* 1983) ότι τα σπέρματα της κολοκυθιάς περιέχουν μεγάλη συγκέντρωση λιπών που φτάνουν μέχρι και το 40% του νωπού τους βάρους. Κατά τη διάρκεια της βλάστησης των ελαιούχων σπερμάτων (Nelson and Cox 2005) τα λίπη μετατρέπονται σε υδατάνθρακες μέσω της διαδικασίας της νεογλυκογένεσης. Η παρουσία της β-αμυλάσης στις κοτύλες πιθανόν να σχετίζεται με την υδρόλυση αμυλοπηκτίνης που πιθανόν συντίθεται στα όργανα αυτά.

5. <u>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</u>

1) Η β-αμυλάση ανιχνεύθηκε σε όλους τους ιστούς των φυταρίων που εξετάστηκαν, με διαφορετική όμως ένταση σήματος στους διάφορους ιστούς.

2) Το πρότυπο ανοσοεντοπισμού της β-αμυλάσης συμπίπτει εν μέρει μόνο με το πρότυπο κατανομής του αμύλου, όπως ανιχνεύεται με το ιώδιο, στους ιστούς των φυταρίων.

3) Η αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου μετά την έκθεση των φυτών σε συνθήκες ψύχους ενδεχομένως να σχετίζεται με την προστασία τους σε αυτές τις συνθήκες.

4) Η ύπαρξη μιας επιπλέον ηλεκτροφορητικής ταινίας στα ηλεκτροφορήματα των φυτών που εκτέθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες πιθανόν να οφείλεται στην έκφραση ενός επιπλέον γονιδίου της β-αμυλάσης.

5) Η προτεινόμενη μέθοδος για τον εντοπισμό της δραστηριότητας της β-αμυλάσης σε πηκτές πολυακρυλαμίδης είναι δυνατόν να βοηθήσει στην ταχεία διαπίστωση των ενζύμων αυτών σε εκχυλίσματα ιστών και στον καθορισμό των ισοτύπων της.

<u>7, ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>

- Anders VN, Tove C, Bojko M and Marcussen J (1997). Purification and characterization of b-amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol Plant*, **99**: 190-196.
- Avigad G, Dey PM In *Plant Biochemistry,* Academic Press London, New York 1997, pp143-203.
- Baunsgaard L, Lütken H, Mikkelsen R, Glaring MA, Pham TT, Blennow A (2005). A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates prephosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis. Plant J*, **41**: 595-605.
- **Beck E, Ziegler P** (1989). Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **40**: 95-117.
- **Bewley JD, and Black M** (1994). Seeds: Physiology of Development and Germination, 2nd ed. (New York: Plenum).
- Blennow A, Engelsen SB, Munck L, Møller BL (2000). Starch molecular structure and phosphorylation investigated by a combined chromatographic and chemometric approach. *Carbohydr Polymers*, **41**: 163-74.
- Blennow A, Engelsen SB, Nielsen TH, Baunsgaard L, Mikkelsen R (2002).
 Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends Plant Sci* 7: 445-50.
- **Boos W, Schuman H** (1998). Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**: 204-29.
- Caspar T, Lin TP, Kakefuda G, Benbow L, Preiss J, Somerville C (1991). Mutants of *Arabidopsis* with altered regulation of starch degradation. *Plant Physiol*, **95**: 1181-88.
- Chandler JW, Apel K, Melzer S (2001) A novel putative beta-amylase gene and Atb-Amy from Arabidopsis thaliana are circadian regulated. *Plant Sci* 161: 1019–1024
- Chen F and KJ Bradford (2000). Expression of an expansin is associated with endosperm weakening during tomato seed germination. *Plant Physiol*, **124**: 1265–1274.
- Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Messerli G, Chen J, Zeeman SC, Smith SM, Smith AM. (2004) A cytosolic glucosyltransferase is required for

conversion of starch to sucrose in Arabidopsis leaves at night. *Plant J.* **37**:853-63

- Clancy JA, Han F, Ullrich SE and the North American Barley Genome Project (2003). Comparative Mapping of b-Amylase Activity QTLs among Three Barley Crosses. *Crop Sci*, **43**: 1043–1052.
- Datta R, Selvi MT, Seetharama N, Sharma R (1999) Stress-mediated enhancement of beta-amylase activity in pearl millet and maize leaves is dependent on light. *J. Plant. Physiol*, **154**: 657–664.
- **Debeaujon I, Leon-Kloosterziel KM, and Koornneef M** (2000). Influence of the testa on seed dormancy, germination, and longevity in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **122**:403–414.
- **Daussant J and Lauriere C** (1990). Detection and partial characterization of two antigenically distinct β-amylase in developing kernels of wheat. *Planta*, **181**: 505-511.
- Daussant JH, Miyata S, Mitsui T and Akazawa T (1983) Enzymic Mechanism of Starch Breakdown in Germinating Rice Seeds. Immunochemical Study on Multiple Forms of Amylase. *Plant Physiol*, **71**: 88-95.
- **Daussant J, Sadowski J, Rorat T, Mayer C, Lauriere C** (1991). Independent regulatory aspects and posttranslational modifications of two β-amylases of rye. *Plant Physiol*, **96**: 84-90.
- **Demchenko NP**, (1989) Changes in DNA content in the cells of phloem complex of the wheat root during their development, *Tsitologiya*, **31** : 664–676.
- Dicko MH, Searle-van Leeuwen MJF, Hilhorst R, Traore AS (2000). Extraction, partial purification and characterization of b-amylase from the bulbs of *G. klattianus*. *Bioresource Technology*, **73**: 183-185.
- Dolan L, Janmaat K, Willemsen V, Linstead P, Poethig S, Roberts K and Scheres B. (1993).Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* 119: 71–84.
- Downie AB, Zhang D, Dirk LM, Thacker RR, Pfeiffer JA, Drake JL, Levy AA, Butterfield DA, Buxton JW, and Snyder JC (2003). Communication between the maternal testa and the embryo and/or endosperm affect testa attributes in tomato. *Plant Physiol.* **133**: 145–160.
- Dreier W, Schnarrenberger C, Borner T (1995) Light- and stress- ependent enhancement of amylolytic activities in white and green barley leaves: betaamylases are stress-induced proteins. *J Plant Physiol* **145**: 342–348

Δροσόπουλος (1998). Φυσιολογία Φυτών, Μέρος Ι, Εκδόσεις Γ.Π.Α.

- Eastmond PJ, Germain V, Lange PR, Bryce JH, Smith SM, and Graham IA (2000). Postgerminative growth and lipid catabolism in oilseeds lacking the glyoxylate cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 5669–5674.
- Esau K and 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, and Holdsworth M (2002). Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. EMBO J. 21: 2912–2922.
- **Fowler S, Thomashow MF** (2002) Arabidopsis transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *Plant Cell* **14**: 1675–1690
- **Fulda M, Schnurr J, Abbadi A, Heinz E, and Browse J** (2004). Peroxisomal Acyl-CoA synthetase activity is essential for seedling development in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**, 394–405.
- Gale MD, Law CN, Chojecki AJ, Kempton RA (1983). Genetic control of aamylase production in wheat, *Theor. Appl. Genet*, **64**: 309-316.
- Gana JA, Kalengamaliro NE, Cunningham SM, and Volenec JJ (1998). Expression of b-Amylase from Alfalfa Taproots. *Plant Physiol*, 118: 1495– 1505.
- Germain V, Rylott EL, Larson TR, Sherson SM, Bechtold N, Carde JP, Bryce JH, Graham IA, and Smith SM (2001). Requirement for 3-ketoacyl-CoA thiolase-2 in peroxisome development, fatty acid beta-oxidation and breakdown of triacylglycerol in lipid bodies of Arabidopsis seedlings. *Plant J.* 28: 1–12.
- Gibon Y, Blasing OE, Palacios-Rojas N, Pankovic D, Hendriks JHM, Fisahn J, Hohne M, Gunther M and Stitt M (2004) Adjustment of diurnal starch turnover to short days: depletion of sugar during the night leads to a temporary inhibition of carbohydrate utilization, accumulation of sugars and post-translational activation of ADP-glucose pyrophophorylase in the following light period. *Plant J* **39**: 847–862.
- Gomez-Cadenas A, Zentella R, Walker-Simmons MK, and 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.

- Gubler F, Kalla R, Roberts JK, and Jacobsen JV (1995). Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: Evidence for Myb transactivation of a high-pl alpha-amylase gene promoter. *Plant Cell* 7: 1879–1891.
- Gubler F, Chandler PM, White RG, Llewellyn DJ, and JV Jacobsen (2002). Gibberellin signaling in barley aleurone cells. Control of SLN1 and GAMYB expression. *Plant Physiol.* **129**:191–200.
- Handley LW and DM Pharr (1983) Ion stimulation, UDP inhibition and effects of sulfhydryl reagents on the activity of galactinol synthase from leaves of cucumber, Cucumis sativus L. Z *Pflanzenphysiol* **108**: 447-451
- Handley LW, Pharr DM and McFeeters RF (1983b). Relationship between galactinol synthase activity and sugar composition of leaves and seeds of several crop species. J Am Soc Hort Sci 108: 600-605.
- Hara-Nishimura I, Nishimura M, Daussant J (1986). Conversion of free βamylase on starch granules in the barley endosperm during desiccation phase of seed development. *Protoplasma*, **134**: 149-153.
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang H-S, Han B, Zhu T, Wang X,
 Kreps JA and Kay SA (2000) Orchestrated transcription of key pathways in
 Arabidopsis by the circadian clock. Science 290: 2110–2113.
- Hara-Nishimura I, Nishimura M, Daussant J (1986) Conversion of free betaamylase to bound beta-amylase on starch granules in the barley b-Amylase and Temperature Shock endosperm during desiccation phase of seed development. *Protoplasma* 134: 149–153.
- Hayashi M, Toriyama K, Kondo M, and Nishimura M (1998). 2,4-Dichlorophenoxybutyric acid-resistant mutants of Arabidopsis have defects in glyoxysomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Cell* **10**: 183–195.
- **Heldt HW** (1991).Plant Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University press.
- Hendrix JE (1982). Sugar translocation in two members of the Cucuribtaceae. *Plant Sci Lett* 25: 1-7.
- Hendrix DL and Grange RI (1991) Carbon partitioning and export from mature cotton leaves. *Plant Physiology* **95**: 228–233.
- Herold A, Leegood RC, McNeil PH and Robinson SP (1981) Accumulation of maltose during photosynthesis in protoplasts isolated from spinach leaves

treated with mannose. Plant Physiology 67: 85-88.

Hopkins WG (1995). Introduction to plant physiology. John Wiley and sons, INC.

- Jung S-H, Lee J-Y, Lee D-H (2003) Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in Arabidopsis leaves undergoing cold stress. *Plant Mol Biol* 52: 553–567
- Kakefuda G, Duke SH (1984) Electrophoretic Transfer as a Technique for the Detection and Identification of Plant Amylolytic Enzymes in Polyacrylamide Gels. *Plant Physiol.* **75**:278-280.
- **Kapklan F, and Guy CL** (2004) b-Amylase Induction and the Protective Role of Maltose during Temperature Shock. *Plant Physiology* **135**: 1674–1684.
- Kapklan F, Sung D Y and Guy CL (2006). Roles of ß-amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiologia Plantarum* 126: 120-128.
- Kaplan F, Kopka J, Sung DY, Zhao W, Popp M, Porat R, Guy CL (2007). Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content. *The Plant Journal* **50**: 967–981.
- **Kohno A, Nanmori T, Shinke R** (1989). Purification of β-amylase from Alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. *J Biochem*, **105**: 231-233.
- **Kornberg HL, and Beevers H** (1957). A mechanism of conversion of fat to carbohydrate in castor beans. *Nature* **180**: 35–36.
- **Kossmann J**, **Lloyd J**. (2000)Understanding and influencing starch biochemistry. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **35**:141-96.
- Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G (2005). Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiol*, **137**: 242-52.
- Kreps JA, Wu Y, Chang SH, Zhu T, Wang X, Harper JF (2002) Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt osmotic and cold stress. *Plant Physiol* **130**: 2129–2141
- Kruger NJ, ap Rees T (1993). Maltose metabolism by pea chloroplasts. *Planta*, 158: 271-73.
- Laby, R.J., Kim, D., and Gibson, S.I. (2001). The ram1 mutant of Arabidopsis exhibits severely decreased b-amylase activity. *Plant Physiol.* **127**: 1798–1807.

- Lao NT, Schoneveld O, Mould RM, Hibberd JM, Gray JC, Kavanagh TA (1999). An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase. *Plant J*, **20**: 519-527.
- **Lauriere C, Doyen C, Thevenot C, Daussant J** (1992). β-amylase in cereals. A study of the maize b-amylase system. *Plant Physiol*, **100**: 887-893.
- Lazos S. E. 1986 Nutritional, fatty acid and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. *J Food Sci* 51 1382-1383.
- Lea PG, Leegood RC (1997). Plant Biochemistry and Molecular Biology. Wiley.
- Leubner-Metzger G., Frundt C., Vogeli-Lange R., F. Jr, and Meins (1995). Class I [beta]-1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol.* **109**: 751–759.
- Leubner-Metzger G., and F. Jr Meins. (2000). Sense transformation reveals a novel role for class I beta-1,3-glucanase in tobacco seed germination. *Plant J.* 23: 215–221
- Levi C and Gibbs M (1976) Starch degradation in isolated spinach chloroplasts. *Plant Physiology* **57**: 933–935
- Lin TP, Spilatro SR, Preiss J (1988). Subcellular localization and characterization of amylases in *Arabidopsis* leaf. *Plant Physiol*, **86**: 251-259.
- Linko R, Lapvetelainen A, Laakso P, and Kallio H (1989). Protein Composition of a High-Protein Barley Flour and Barley Grain. *Cereal Chem*, **66**: 478-482.
- Lizotte PA, Henson CA, Duke SH (1990). Purification and characterization of pea epicotyl beta-amylase. *Plant Physiol*, **92**: 615-21.
- Longe G., Farinu G., L. B. Fetuga 1983 Nutritional value of the fluted pumpkin (*Telfaria occidentalis*). J Agric Food Chem **31**: 989-992.
- Lorenz O A and DN Maynard (1988) Knott's Handbook for Vegetable Growers. John Wiley & Sons, New York pp.456.
- Lloyd JR, Kossmann J and Ritte G (2005). Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci.* **10**: 130–137.
- Lloyd JR, Blennow A, Burhenne K, Kossmann J (2004). Repression of a novel isoform of disproportionating enzyme (stDPE2) in potato leads to inhibition of starch degradation in leaves but not tubers stored at low temperature. *Plant Physiol.* **134**:1347-54.
- Lu Y, Gehan JP and Sharkey TD (2004) Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. Paper presented at the Photosynthesis: Fundamental Aspects to Global Perspectives, the.

Proceedings of the 13th International Congress of Photosynthesis, Montréal, Quebec, Canada. Allen Press, Lawrence, KS, pp. 711–713.

- Lu Y, Gehan JP and Sharkey TD (2005) Daylength and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiology* **138**: 2280– 2291.
- Lu Y, Steichen JM, Weise SE, Sharkey TD (2006). Cellular and organ level localization of maltose in maltose-excess Arabidopsis mutants. *Planta*. 224:935-43.
- Maeo K, Tomiya T, Hayashi K, Akaike M, Morikami A, Ishiguro S, Nakamura K (2001) Sugar-responsible elements in the promoter of a gene for beta-amylase of sweet potato. *Plant Mol Biol* 46: 627–637.
- Mansour E.H., Dworschak E., Peredi J., A. Lugasi 1993b Evaluation of pumpkin seed (*Cucurbitapepo*, Kakai 35) as a new source of protein. *Acta Alimentaria Hung* 22: 3-13.
- Martin C, Smith AM (1995). Starch biosynthesis. The Plant Cell, 7: 971-985.
- Mikkelsen R, Baunsgaard L, Blennow A (2004). Functional characterisation of alpha-glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem* J, 377: 525-32.
- **Mita S, Suzuki-Fujii K, Nakamura K** (1995) Sugar-inducible expression of a gene for beta-amylase in Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* **107**: 895–904.
- Muthukrishnan S, Gill BS, Swegle M, Chandra GR (1984). Structural genes for alpha-amylases are located on barley chromosomes 1 and 6. *J.Biol. Chem.* 259: 13637-13639.
- Nakamura K, Ohto M, Yoshida N, Nakamura K (1991) Sucrose-induced accumulation of beta-amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato. *Plant Physiol* 96: 902–909
- Nakazima R, Imanaka T, Aida S (1986). Nucleotide sequence of the Bacillus stearothermophilus alpha-amylase gene *Appl. Microbial. Biotechnol.* 23:355-360
- **Nelson DL and Cox MM** (2005)Lehninger Principles of Biochemistry fourth edition. WH Freeman and Company New York.
- Neuhaus HE, Emes MJ (2000). Non photosunthetic metabolism in plastids. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, **51**: 111-140.

Neuhaus HE and Schulte N (1996) Starch degradation in chloroplasts isolated

from C-3 or CAM (crassulacean acid metabolism)-induced *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Biochemical Journal* **318**: 945–953.

- Nielsen TH, Wischmann B, Enevoldsen K, Møller BL (1994). Starch phosphorylation in potato tubers proceeds concurrently with de novo biosynthesis of starch. *Plant Physiol*, **105**: 111-17.
- Nielsen TM, Deiting U, Stitt M (1997) A beta-amylase in potato tubers is induced by storage at low temperature. *Plant Physiol* **113**: 503–510
- Niittylä T, Messerli G, Trevisan M, Chen J, Smith AM, Zeeman SC. (2004). A previously unknown maltose transporter essential for starch degradation in leaves. *Science.* **303**:87-89.
- Nonogaki H and 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.
- Nwokolo E and Sim S J .1987 Nutritional assessment of defatted oil meals of melon (Colocynthis citrullus L.) and fluted pumpkin (Telfaria occidentalis Hook) by chick assay. J Sci Food Agric 38: 237-246.
- **OhtoM-A, Nakamura-Kito K, Nakamura K** (1992) Induction of expression of genes coding for sporamin and beta-amylase by polygalacturonic acid in leaf-petiole cuttings of sweet potato. *Plant Physiol* **99**: 422–427.
- **Okamoto K**, **Akazawa T** (1979) Enzymic Mechanism of Starch Breakdown in Germinating Rice Seeds: 8. Immunohistochemical Localization of beta-Amylase. *Plant Physiol.* **64**:337-340.
- Pharr DM, HN Sox, EL Smart, RL Lower and HP Fleming (1977)Identification and distribution of soluble saccharides in pickling cucumber plants and their fate in fermentation. *J Am Soc Hort Sci* **102**: 406-409
- Reidel EJ, Turgeon R and Cheng L (2008). A Maltose Transporter from Apple is expressed in Source and Sink Tissues and Complements the Arabidopsis Maltose Export-Defective Mutant. *Plant Cell Physiol*, **49**: 1607–1613.
- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M (2002). The starch-related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**: 7166-71.
- Ritte G, Scharf A, Eckermann N, Häbel S, Steup M (2004). Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation. *Plant Physiol*, **135**: 2068-77.
- Rodriguez RL, Huang N, Sutliff TD, Ranjhan S, Karrer E, Litts J (1992). Rice

Genetics 2: proceeding of the Second International Rice GeneticsSymposium(Inst. Rice Res., Inst Los Banos Phillippines). Pp.417-429.

- Rorat T, Sadowski L, Grellet F, Daussant L, Delseny M (1991). Characterization of cDNA clones for rye endosperm-specific β-amylase and analysis of β-amylase deficiency in rye mutant lines. *Theor Appl Genet*, 83: 257-263.
- **Rylott E.L., Gilday A.D., and Graham I.A.** (2003). The gluconeogenic enzyme phosphoenolpyruvate carboxykinase in Arabidopsis is essential for seedling establishment. *Plant Physiol.* **131**: 1834–1842.
- **Σαρλής Γ.Π.** (1999) Συστηματική Βοτανική. Αθήνα: Εκδόσεις Α. Σταμούλη.
- Scheidig A, Frolich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J (2002). Down regulation of a chloroplast-targeted alpha-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J*, **30**: 581-91.
- Sean EW, Weber APM, Sharkey TD (2004). Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta* **218**: 474–482.
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a fulllength cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61–72
- Sharma R, Schopfer P (1987). Phytochrome-mediated regulation of b-amylase mRNA level in mustard (*Sinapis alba L.*) cotyledons. *Planta*, **171**: 313-320.
- Shewry PR, Parmar S, Buxton B, Gale MD, Liu CJ, Hejgaard J, Kreis M (1988). Multiple molecular forms of β-amylase in seeds and vegetative tissues of barley. *Planta*, **176**: 127-134.
- Sitrit Y, Hadfield KA, Bennett AB, Bradford KJ, and Downie AB (1999). Expression of a polygalacturonase associated with tomato seed germination. *Plant Physiol.* **121**: 419–428.
- Smith AM, Denyer K (1992). Starch synthesis in developing pea embryos. *New Phytol*, **122:** 21-23.
- Smith AM, Samuel C, Zeeman SC, Thorneycroft D, Smith SM (2003) Starch mobilization in leaves *J. Exp.Bot.* 2003 **54**: 577-583.
- Smith AM, Zeeman SC, and Smith SM (2005). Starch degradation. Annu. Rev. Plant Biol. 56: 73–98.
- Smith SM (2002). Does the glyoxylate cycle have an anaplerotic function in

plants. Trends Plant Sci. 7, 12–13.

- Smith SM, Fulton DC, Chia T, Thorneycroft D, Chapple A, Dunstan H, Hylton C, Zeeman SC and Smith AM (2004) Diurnal changes in the transcriptome encoding enzymes of starch metabolism provide evidence for both transcriptional and posttranscriptional regulation of starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiology* **136**, 2687–2699.
- Sopanen T, Lauriere C (1989) Release and activity of bound beta-amylase in germinating barley grain. *Plant Physiol* 89: 244–249
- Sparla F, Costa A, Schiavo FL, Pupillo P, and Trost P (2006). Redox regulation of a novel plastid-targeted b-amylase of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol.* **141**: 840–850.
- Steup M, Robenek H, Melkonian M (1983). In-vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts. *Planta*, **158**: 28-36.
- Stitt M and ap Rees T (1980) Carbohydrate breakdown by chloroplasts of *Pisum* sativum. Biochimica et Biophysica Acta 627: 131–143.
- Stitt M and Heldt HW (1981) Physiological rates of starch breakdown in isolated intact spinach chloroplasts. *Plant Physiology* **68**: 755–761.
- Stitt M, Bulpin PV and Rees TA (1978) Pathway of starch breakdown in photosynthetic tissues of *Pisum sativum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 544: 200–214.

Stryer L (1988). Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, σσ. 21-23.

- Subbaramaiah K, Sharma R (1989). beta-Amylase from Mustard (Sinapis alba
 L.) Cotyledons : Immunochemical Evidence for Synthesis de Novo during
 Photoregulated Seedling Development. *Plant Physiol.* 89:860-866.
- Sun Z, Duke SH, Henson CA (1995). The role of pea chloroplast alphaglucosidase in transitory starch degradation. *Plant Physiol*, **108**: 211-17.
- **Sung DY** (2001) Characterization of Arabidopsis heat shock protein 70 (Hsp70) gene family and microarray analysis of gene expression in response to temperature extremes. PhD thesis. University of Florida, Gainesville, FL
- Swanston JS and Molina-Cano JL (2000). Beta-Amylase Activity and Thermostability in Two Mutants Derived from the Malting Barley cv. Triumph. *Journal of Cereal Science*, **33**: 155–161.
- Tanaka N, Kajimoto S, Mitani D, Kunugi S (2002). Effects of guanidine hydrochloride and high pressure on subsite flexibility of b-amylase. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1596**: 318-325.

- Tepperman JM, Zhu T, Chang HS, Wang X, Quail PH (2001) Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochome A signaling. Proc Natl Acad Sci USA 98: 9437–9442.
- Todaka D, Matsushima H and Morohashi Y (2000). Water stress enhances β-amylase activity in cucumber cotyledons. *Journal of Experimental Botany*.
 51: 739-745.
- Van Damme E.J., Hu J., Barre A., Hause B., Baggerman G., Rougé P.,
 Peumans W.J. (2001). Purification, characterization, immunolocalization and structural analysis of the abundant cytoplasmic beta-amylase from Calystegia sepium (hedge bindweed) rhizomes. *Eur J Biochem.* 268(23):6263-73.
- Van der Maarel MJEC, van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L (2002). Properties and applications of starch-converting enzyme4s of the alpha-amylase family. J. Biotechn. 94: 137-155.
- Wang Q, Monroe J, Sjolund RD (1995). Identification and characterization of a phloem-specific b-amylase. *Plant Physiol*, **109**: 743–750.
- Wang SM, Lue WL, Eimert K, Chen J (1996). Phytohormone regulated βamylase gene expression in rice. *Plant Mol Biol*, **31**: 975-982.
- Weise SE, Weber AP, Sharkey TD. (2004) Maltose is the major form of carbon exported from the chloroplast at night. *Planta*. **218**:474-82.
- Weise SE, Kim KS, Stewart RP, Sharkey TD. (2005) beta-Maltose is the metabolically active anomer of maltose during transitory starch degradation. *Plant Physiol.* **137**:756-61.
- Webb J.A. and P.R. Gorham 1964 Translocation of photosynthetically assimilated C14 in straight-necked squash. *Plant Physiol* **39**: 663472
- Weber A, Servaites JC, Geiger DR, Kofler H, Hille D et al (2000). Identification, purification, and molecular cloning of a putative plastidic glucose transporter. *Plant Cell*, **12**: 787-801.
- Wischmann B, Nielsen TH, Møller BL (1999). In vitro biosynthesis of phosphorylated starch in intact potato amyloplasts. *Plant Physiol*, **119**: 1-8.
- Yin C, Zhang GP, Wang JM and Chen JX (2001). Variation of Beta-Amylase Activity in Barley as Affected by Cultivar and Environment and its Relation to Protein Content and Grain Weight. *Journal of Cereal Science*, **36**: 307-312.
- **Yoshingi N, Okada Y, Sahara H, Koshino S** (1994). PCR cloning and sequencing of the β-amylase cDNA from barley. *J Biochem*, **115**: 47-51.

- Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge UI *et al* (2001). The *Arabidopsis* sex1 mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *Plant Cell*, **13**: 1907-18.
- Yu TS, Zeeman SC, Thorneycroft D, Fulton DC, Dunstan H et al (2005). Alpha-amylase is not required for breakdown of transitory starch in Arabidopsis leaves. J Biol Chem, 250: 9773-9779.
- Zeeman SC and ap Rees T (1999). Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Env*, 22: 1445-53.
- **Ziegler P and Beck K** (1986). Exoamylase activity in vacuoles isolated from pea and wheat leaf protoplasts. *Plant Physiol*, **82**: 1119-1121.
- **Zimmermann MH** (1960) Transport in the phloem. *Annu Rev Plant Physiol* **11**: 167-190
- **Zolman BK, Silva ID and 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.