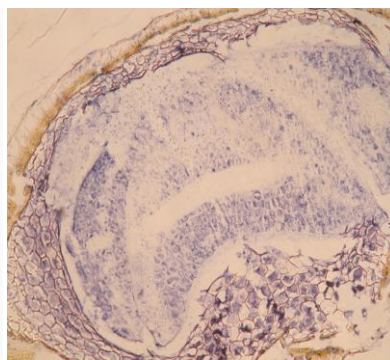


**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ**

**‘Ανοσοεντοπισμός και δραστηριότητα της β-  
αμυλάσης σε παρθενοκαρπικούς και μη καρπούς  
τομάτας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους’**

**ΘΑΝΟΥ ΜΑΡΙΑ**

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



ΑΘΗΝΑ 2010

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ  
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**‘Ανοσοεντοπισμός και δραστηριότητα της β-αμυλάσης σε  
παρθενοκαρπικούς και μη καρπούς τομάτας κατά τη διάρκεια της  
ανάπτυξής τους’**

**Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:**

**Επ. Καθηγητής, Γ. Αϊβαλάκης, Επιβλέπων  
Καθηγητής, Π. Κατινάκης, Μέλος  
Καθηγητής, Κ. Φασσέας, Μέλος**

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

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

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

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

Το Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών για την παραχώρηση του φυτικού υλικού και την άριστη συνεργασία μας και ιδιαίτερα τον Δρ. Ι. Καραπάνο και τη γεωπόνο Δ. Μακρογιάννη.

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

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

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....</b>	<b>3</b>
<b>ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....</b>	<b>4</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>5</b>
<b>1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>6</b>
1.1 Η ΤΟΜΑΤΑ CHERRY.....	7
1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας.....	7
1.1.2 Φυλογένεση-βοτανική ταξινόμηση και καταγωγή της τομάτας τύπου cherry .....	7
1.1.3 Διαιτητική αξία του καρπού της τομάτας τύπου cherry .....	9
1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry.....	10
1.1.5 Μορφολογία και ανατομία του καρπού.....	11
1.1.6 Η ανάπτυξη του καρπού.....	14
1.1.6.1 Πρώιμη ανάπτυξη καρπού.....	15
1.1.6.2 Ώριμος πράσινος καρπός.....	18
1.1.6.3 Ωρίμανση του καρπού.....	18
1.2 Η ΠΑΡΘΕΝΟΚΑΡΠΙΑ.....	20
1.2.1 Οι τρεις κύριες πηγές παρθενοκαρπίας στην τομάτα (pat-1, pat-2 και pat-3/pat-4)..	21
1.2.2 Μηχανισμός της παρθενοκαρπίας.....	22
1.2.3 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα.....	25
1.2.4 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία.....	26
1.2.5 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας.....	26
1.3 ΤΟ ΑΜΥΛΟ.....	28
1.3.1 Η αποδόμηση του αμύλου.....	29
1.3.2 Η υδρόλυση των επιφανειακών γλυκανών.....	30
1.3.3 Η α-αμυλάση.....	33
1.3.4 Τα ένζυμα αποδιακλάδωσης.....	34
1.3.5 Η τύχη της μαλτόζης και της μαλτοτριόζης.....	35
1.4 Η Β-ΑΜΥΛΑΣΗ.....	37
1.4.1 Η δομή του ενζύμου.....	37
1.4.2 Η δραστηριότητα του ενζύμου.....	38
1.4.3 Εντοπισμός και ρύθμιση του ενζύμου.....	39
1.4.4 Η β-αμυλάση σε καταστάσεις καταπόνησης.....	41
1.4.5 Ο ρόλος της β-αμυλάσης στη βιομηχανία.....	42
<b>ΣΚΟΠΟΣ.....</b>	<b>44</b>
<b>2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>45</b>
2.1 Οι διαδικασίες του πειράματος.....	46
2.2 Το φυτικό υλικό.....	47
2.3 Η ανοσοβιοχημική μελέτη-Επεξεργασία των ιστών.....	49
2.4 Η εκχύλιση του ενζύμου.....	52
2.5 Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.....	53
2.6 Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της β-αμυλάσης.....	54
2.7 Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών.....	54
2.8 Εντοπισμός του αμύλου σε νωπές τομές καρπών.....	57

2.9 Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης στις τομές.....	58
<b>3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>60</b>
3.1 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων.....	61
3.2 Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης στους καρπούς.....	62
3.2.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm.....	62
3.2.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm.....	64
3.2.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού.....	66
3.2.4 Στάδιο αλλαγής χρώματος.....	68
3.2.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού.....	70
3.3 Ο προσδιορισμός της <i>in vitro</i> δραστικότητας της β-αμυλάσης.....	72
3.4 Εντοπισμός του αμύλου στους καρπούς.....	73
<b>4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....</b>	<b>74</b>
4.1 Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης.....	75
4.2 Η δραστικότητα της β-αμυλάσης <i>in vitro</i> .....	78
<b>5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....</b>	<b>80</b>
<b>6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>82</b>

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

AMY: α-αμυλάση

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

BSA: Πρωτεΐνη ορού μόσχου

DPEc: Κυτοπλασματική γλυκοτρανσφεράση

DPEp: Πλαστιδιακή γλυκοτρανσφεράση

GDW: Δικινάση της γλυκάνης

HXK: Εξοζοκινάση

ISA: Ισοαμυλάση

LCG: Μακράς αλύσου γλυκάνες

LDA: Οριακή δεξτρινάση

NBT: Νιτρομπλέ του τετραζολίου

PVP: Πολυβινυλοπυρρολιδόνη

SDS: Sodium Dodecylsulfate

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε η β-αμυλάση, σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς τομάτας τύπου cherry, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Τα στάδια που επιλέχθηκαν ήταν νεαροί πράσινοι καρποί διαμέτρου 5mm και 15mm, ώριμοι πράσινοι καρποί, καρποί στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι καρποί. Οι παρθενοκαρπικοί καρποί αναπτύχθηκαν μετά την αφαίρεση των ανθέρων από κλειστά άνθη και την ακόλουθη εφαρμογή 50ppm β-ναφθοξυοξεικού οξέος. Για τη μελέτη του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ο ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης και η εκτίμηση της δραστηριότητας του ενζύμου σε εκχυλίσματα των καρπών από τα παραπάνω στάδια.

Η β-αμυλάση εντοπίστηκε έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες σε όλα τα υπό μελέτη στάδια, τόσο στους παρθενοκαρπικούς όσο και στους ένσπερμους καρπούς. Στους ένσπερμους καρπούς, το σήμα ήταν εντονότερο στα όργανα του εμβρύου, στο ενδοσπέρμιο και στους χιτώνες της σπερματικής βλάστης. Επίσης, η β-αμυλάση εντοπίστηκε στο περικάρπιο, το σήμα όμως του εντοπισμού ήταν λιγότερο έντονο. Όσον αφορά τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου, οι διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών εντοπίζονται κυρίως στο έμβρυο και το ενδοσπέρμιο.

Από τη σύγκριση των προτύπων της κατανομής του αμύλου και του ανοσοεντοπισμού του ενζύμου, είναι δυνατόν να λεχθεί ότι υδρόλυση του αμύλου γίνεται τόσο σε ιστούς που εντοπίζεται άμυλο, με τη χρώση του ιωδίου, όσο και σε ιστούς όπου δεν εντοπίζεται άμυλο.

Η δραστηριότητα του ενζύμου ήταν υψηλότερη στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του καρπού, ιδιαίτερα στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, γεγονός το οποίο υποδηλώνει τη συμμετοχή του ενζύμου στη μεγάλη υδρόλυση του αμύλου. Υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε επίσης και στο πρώτο στάδιο της ανάπτυξης του καρπού (διαμέτρου 5mm). Η παρατηρούμενη συσσώρευση του αμύλου σε συνδυασμό με την υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου κατά το στάδιο αυτό καταδεικνύει την ταυτόχρονη σύνθεση και αποδόμηση του αμύλου στον καρπό της τομάτας.



## ABSTRACT

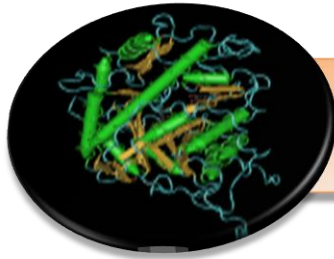
In the present study the activity and immunolocalization of  $\beta$ -amylase were studied in parthenocarpic and seeded tomato fruits in selected stages of fruit development. The stages were: developing immature green fruits of diameter 5mm and 15mm, mature green, breaker and red ripe fruits. Parthenocarpic fruits were developed after the application of 50ppm  $\beta$ -naphthoxyacetic acid on emasculated closed flowers.

Beta-amylase was localized in vascular bundles, in both parthenocarpic and seeded fruits examined. Moreover, in seeded fruits, the localization signal was heavy in developing embryos, endosperm and ovular tissues. Finally, the protein was present in pericarp and starch grains, however the localization signal was less dense.

As it is obvious from the preceding, the differences in immunolocalization patterns between parthenocarpic and seeded fruits are spotted in developing seeds.

From the comparison of starch localization pattern with protein immunolocalization pattern, it can be said that starch hydrolysis occurs both in tissues that contain starch grains as well as in tissues in which no starch is detected.

Beta-amylase activity was higher at the later stages of fruit development, especially in parthenocarpic fruits, a fact that points to the enzyme participation in high starch hydrolysis which occurs in these developmental stages. The observed high enzyme activity in 5mm fruits along with the concomitant starch accumulation shows that starch hydrolysis could occur in parallel with starch synthesis in tomato fruits.



## **1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1 Η ΤΟΜΑΤΑ CHERRY

### 1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας

Το 1753 ο Σουηδός βοτανολόγος Linnaeus ονόμασε την τομάτα *Solanum lycopersicon*, αλλά 15 χρόνια αργότερα ο Miller ταξινόμησε την τομάτα στο νέο γένος *Lycopersicon* (*Lycopersicon esculentum*) (Taylor, 1986). Πρόσφατα όμως οι βοτανολόγοι απέδωσαν στην τομάτα το αρχικό της όνομα *Solanum lycopersicon* (Heiser and Anderson, 1999).

Η οικογένεια Solanaceae περιλαμβάνει περίπου 90 γένη και 3000-4000 είδη. Το γένος *Solanum* τοποθετείται μέσα στην υποοικογένεια Solanoideae (Tucker *et al.*, 2007). Ο Muller (1940) διαχώρισε το γένος σε δύο κύρια υπογένη με βάση το χρώμα των καρπών: το *Eulycopersicon* (έγχρωμοι καρποί) και *Eriopersicon* (πράσινοι καρποί). Ο Rick (1976) πρότεινε έναν πιο αναλυτικό και αντικειμενικό διαχωρισμό, ο οποίος κατατάσσει τα είδη σε δύο κύρια συμπλέγματα: το *esculentum*, που περιλαμβάνει είδη που μπορούν να διασταυρωθούν με την καλλιεργούμενη τομάτα (όπως τα *S. lycopersicum* L., *S. pimpinellifolium* L., *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. neorickii*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*) και το σύμπλεγμα *peruvianum*, με είδη που δε μπορούν να διασταυρωθούν με το *S. lycopersicum* (*S. chilense*, '*S.N. peruvianum*', L., '*S.N. peruvianum*' var. *humifusum*) (Atherton and Rudich, 1986).

### 1.1.2 Φυλογένεση-βοτανική ταξινόμηση και καταγωγή της τομάτας τύπου cherry

Σύμφωνα με τον Quiros (1974), υπάρχει μία φυλογενετική σειρά η οποία οδηγεί, με αφετηρία έναν πρόγονο πριν την εμφάνιση του *Solanum*, στο *S. peruvianum*, μετά στο *S. hirsutum*, ακολούθως στο *S. lycopersicon* var. *cerasiforme* και τελικά στην καλλιεργούμενη τομάτα. Τα *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmanii*, *S. pennellii*, *S. minutum* (*S. chmielewskii* και *S. parviflorum*), καθώς και το *S. chilense* είναι αποκλίνοντες τύποι από αυτόν τον κύριο κορμό.

Η τομάτα τύπου cherry (*S. lycopersicon* var. *cerasiforme*) είναι σχεδόν βέβαιο ότι αποτελεί τον άμεσο πρόγονο των σύγχρονων καλλιεργουμένων τύπων τομάτας, ενώ είναι και το μοναδικό άγριο είδος τομάτας που απαντάται και εκτός Νότιας

Αμερικής (Taylor, 1986). Οι σημερινές καλλιεργούμενες ποικιλίες και υβρίδια της τομάτας τύπου cherry θεωρείται ότι εξελίχθηκαν από τον άγριο τύπο τομάτας *S. lycopersicon* var. *cerasiforme* μέσω πολύχρονης εξέλιξης (Setha, 1995). Μοναδικός ίσως διεκδικητής (πρόγονος) αυτού του τίτλου μπορεί να αποτελέσει το *S. pimpinellifolium*, αλλά είναι πιθανό να είναι μάλλον παραπροϊόν, παρά μέλος της γενετικής σειράς (Ολύμπιος, 2001).

Η επιλογή μέσω πολλών γενεών, οδήγησε από την αρχέγονη μορφή της τομάτας που είναι γνωστή σήμερα ως τύπου cherry, σε βαθμιαία αύξηση του μεγέθους του καρπού και στα πολλά διακριτά σχήματα και τύπους καλλιεργούμενης τομάτας (Hobson, 1988). Έτσι, όταν οι πρώτοι καρποί εισήχθησαν στην Ευρώπη (περίπου στα μέσα του 16ου αιώνα), ονομασίες και περιγραφές αυτής της εποχής, όπως το "Romì d'oro" ("χρυσό μήλο"), υπαινίσσονταν ότι το χρώμα ήταν κίτρινο. Οι κοκκινόσαρκοι τύποι τομάτας πρέπει να είχαν ακολουθήσει μετά από μικρό χρονικό διάστημα και είναι αυτοί οι οποίοι κέρδισαν την αποδοχή του κοινού.

Όλοι οι εκπρόσωποι του *S. lycopersicon* είναι αυτοσυμβιβαστοί και κυρίως αυτογονιμοποιούμενοι. Στον άγριο πρόγονο τομάτας, *S. lycopersicon* var. *cerasiforme* (τύπος cherry), το στίγμα μπορεί να προεξέχει πέραν του κώνου των ανθέρων κατά την άνθηση, επιτρέποντας έτσι την σταυρογονιμοποίηση, σε έναν όμως μικρό βαθμό. Αυτό αποτελεί μία διαφορά από την καλλιεργούμενη τομάτα (*S. lycopersicon*) στην οποία, η εξημέρωση και βελτίωση έχει συμπεριλάβει επιλογή για τη σταδιακή υποχώρηση του στίγματος μέσα στον κώνο των ανθέρων, εξασφαλίζοντας έτσι την αυτεπικονίαση (Rick, 1976). Πάντως, το *S. lycopersicon* var. *cerasiforme* (όπως και το *S. lycopersicon* και άλλοι στενοί συγγενείς), είναι γενικά αυτογονιμοποιούμενο, σε αντίθεση με άλλα είδη του γένους *Solanum* που είναι αυτοασυμβίβαστα και επομένως σταυρογονιμοποιούνται πλήρως με διάφορα είδη μελισσών (Ολύμπιος, 2001). Ανεξάρτητα των όποιων διαφορών τους, οι σύγχρονες ποικιλίες της καλλιεργούμενης τομάτας είναι εξαιρετικά στενά συσχετισμένες με το άγριο είδος *S. lycopersicon* var. *cerasiforme*, με αποτέλεσμα οι δύο αυτοί τύποι να μπορούν να διασταυρωθούν ελεύθερα (Taylor, 1986).

### 1.1.3 Διαιτητική αξία του καρπού της τομάτας τύπου cherry

Η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση της τομάτας cherry οφείλεται κατά κύριο λόγο στη μεγάλη διατροφική της αξία και στα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της. Άλλωστε, οι τομάτες cherry παρουσιάζουν υψηλότερη αναλογία σε ξηρά ουσία και μεγαλύτερο περιεχόμενο σε ολικά σάκχαρα, οργανικά οξέα, βιταμίνη C, ελεύθερα αμινοξέα, αντιοξειδωτικά (β-καροτίνη, λυκοπένιο) και φλαβονοειδή σε σχέση με τις μεγαλόκαρπες τομάτες (Hallman and Kobryń, 2003). Εκτός αυτού, εμφανίζουν και υψηλότερη περιεκτικότητα σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και οργανικών οξέων (κιτρικό και μηλικό), τα οποία αποτελούν βασικούς παράγοντες στον προσδιορισμό της γλυκύτητας, της οξύτητας και γενικά της έντασης της γεύσης των καρπών της τομάτας (Raffo *et al.*, 2002). Μάλιστα, ο Hobson (1988) αναφέρει ότι εκτός της υψηλότερης περιεκτικότητας σακχάρων (με κυρίαρχα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη), η γλυκύτητα στη γεύση των cherry αποδίδεται και στην παρουσία της σακχαρόζης όπου απαντάται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 0.5% του νωπού βάρους.

Ακόμη, η διαιτητική αξία των καρπών cherry είναι υψηλή, γιατί περιέχουν ικανοποιητικές ποσότητες βιταμινών, ιχνοστοιχείων, αλάτων και αντιοξειδωτικών, απαραίτητων για βασικές λειτουργίες του οργανισμού με χαμηλό θερμιδικό και ενεργειακό δυναμικό. Αναφέρεται ότι 100g ώριμης τομάτας τύπου cherry, παρέχουν 22 θερμίδες ενέργειας, 1.1g πρωτεΐνης, 0.2g λίπους, 4.7g υδατανθράκων, 13mg Ca, 27mg P, 0.5mg Fe, 3mg Na, 900 IU βιταμίνης A, 0.06mg βιταμίνης B1, 0.04mg βιταμίνης B2, 0.7mg νιασίνης και 23mg βιταμίνης C (FAO, 1985). Οι καρποί τομάτας τύπου cherry αποτελούν καλή πηγή βιταμινών και αλάτων, με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (Long, 1998), ενώ χαρακτηρίζονται από σχετικά υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών (ιδιαίτερα καροτενοειδών, όπως το λυκοπένιο και το β-καροτένιο) που τους προσδίδει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Raffo *et al.*, 2002).

Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν το περιεχόμενο των καρπών σε βασικά αντιοξειδωτικά (καροτενοειδή, ασκορβικό οξύ, φαινολικά συστατικά) σε διαφορετικά στάδια ωριμότητας. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη σχετικά υψηλή περιεκτικότητα των καρπών τομάτας cherry σε καροτενοειδή, που μάλιστα αυξάνεται με την πρόοδο της ωριμότητας των καρπών, έτσι ώστε στο στάδιο της

πλήρους ωριμότητας να παρουσιάζουν το μέγιστο επίπεδο καροτενοειδών, καθώς και αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των μη υδατοδιαλυτών αντιοξειδωτικών.

#### **1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry**

##### **Βλαστός**

Το φυτό τομάτας τύπου cherry χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευρωστία και μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 3.0-3.6m. Όσον αφορά την ανάπτυξη του βλαστού, αναφέρεται ότι το μήκος καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες. Έτσι, αν και οι πλείστοι γονότυποι τομάτας τύπου cherry χαρακτηρίζονται από απεριόριστη ανάπτυξη βλαστών (indeterminate), υπάρχουν και ποικιλίες ημι-καθορισμένης (semi-determinate) και καθορισμένης (determinate) ανάπτυξης. Μάλιστα, στις ποικιλίες με απεριόριστη ανάπτυξη το μήκος του κεντρικού βλαστού μπορεί να φθάσει και 10 ή περισσότερα μέτρα όταν το φυτό κλαδεύεται σε μονοστέλεχο σύστημα (Ολύμπιος, 2001).

##### **Φύλλα**

Συγκριτικά με την καλλιεργούμενη τομάτα, το φυτό της cherry φέρει κανονικό φύλλωμα, μικρότερου όμως μεγέθους (Rubatzhy and Yamaguchi, 1997).

##### **Άνθη-ταξιανθίες**

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό γνώρισμα της κερασόμορφης τομάτας αποτελεί το γεγονός ότι οι ταξιανθίες του φυτού είναι πολύ μεγάλες και ικανές να παράγουν μέχρι και 100 ή περισσότερους καρπούς η κάθε μία σε κάποιες περιπτώσεις. Ο Hobson (1988) αναφέρει ότι, οι πιο παραγωγικές ποικιλίες, όσον αφορά τον αριθμό καρπών ανά ταξιανθία, παράγουν μέχρι και 30 καρπούς. Οι Rubatzhy and Yamaguchi (1997), αναφέρουν ότι τα άνθη σχηματίζονται σε μακριές ταξιανθίες. Τα άνθη έχουν κίτρινο χρώμα και μοιάζουν με αυτά της "κανονικής" τομάτας, είναι όμως μάλλον μικρότερα σε μέγεθος και οι ανθήρες τους είναι πολύ λεπτοί και μακριοί.

## Σπέρματα

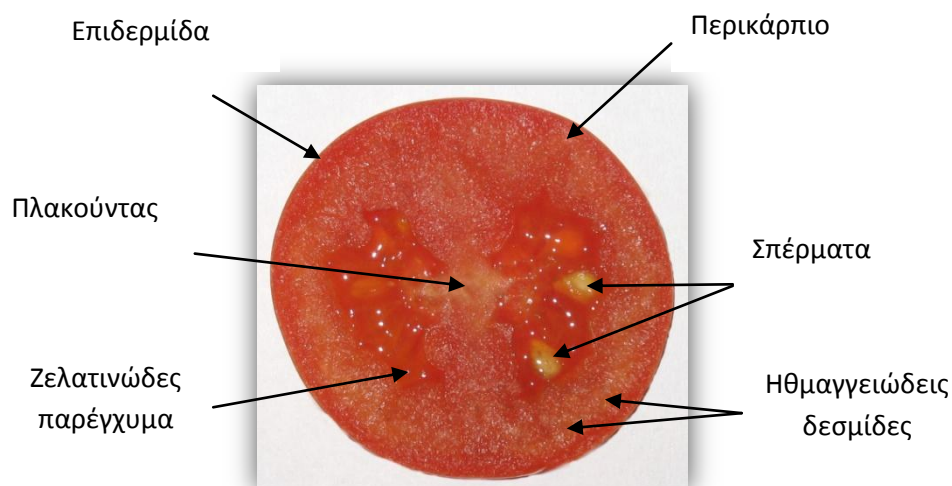
Το βάρος των σπερμάτων δε φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των ποικιλιών cherry και των μεγαλόκαρπων ποικιλιών. Το βάρος 1000 σπόρων της cherry είναι περίπου 2.1g ενώ στις μεγαλόκαρπες τομάτες είναι περίπου 2.2g (Χuan, 1999).

## Καρπός

Ο καρπός είναι κίτρινος ή κόκκινος, με στρογγυλό ή απιοειδές σχήμα (Long, 1998). Ο χαρακτηρισμός cherry αναφέρεται στο σχήμα και στο μέγεθος του καρπού, ο οποίος μοιάζει με τους αντίστοιχους του κερασιού (Allaby, 1998). Οι καρποί είναι δίχωροι και σπάνια τρίχωροι (Rubatzhy and Yamaguchi, 1997), ενώ σε μερικές ποικιλίες φέρουν σχετικώς σκληρή επιδερμίδα. Οι Gough and Hobson (1990), αναφέρουν ότι, οι καρποί των τοματών τύπου cherry εκτιμώνται από τους καταναλωτές για το ελκυστικό κόκκινό τους χρώμα, το μικρό τους μέγεθος και το ωραίο τους άρωμα.

### 1.1.5 Μορφολογία και ανατομία του καρπού

Ο καρπός της τομάτας είναι πολύχωρος ράγα, με ποικίλα σχήματα και αποτελείται από το περικάρπιο, το ζελατινώδες παρέγχυμα, μέσα στο οποίο βρίσκονται τα σπέρματα, και τον πλακούντα (Εικ. 1).



**Εικ. 1.** Ανατομία δίχωρου καρπού τομάτας τύπου cherry.

### **Εξωκάρπιο**

Το εξωκάρπιο αποτελείται από την επιδερμίδα και από 2 με 4 στρώσεις υποεπιδερμικών κυττάρων με παχιά κυτταρικά τοιχώματα που οι παχύνσεις τους μοιάζουν με κολλέγχυμα. Η επιδερμίδα επικαλύπτεται από εφυμενίδα πάχους 4-10μm (Wilson and Sterling, 1976). Η εναπόθεση εφυμενίνης επεκτείνεται και στα κατ' ακτίνα κυτταρικά τοιχώματα της επιδερμίδας και συχνά και σε αυτά των υποεπιδερμικών στρώσεων. Επίσης, από την επιδερμίδα αναπτύσσεται τρίχωμα το οποίο και εξαφανίζεται έως την ωριμότητα. Ουλές και επιδερμικά κύτταρα με αυξημένη εναπόθεση εφυμενίνης παρατηρούνται επίσης και στις θέσεις όπου υπήρχαν τρίχες.

### **Περικάρπιο**

Το περικάρπιο προέρχεται από τα τοιχώματα της ωοθήκης και αποτελείται από το εξωκάρπιο, από το παρεγχυματικό μεσοκάρπιο με τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και από ένα μονοκύτταρο στρώμα ενδοκαρπίου που επικαλύπτει χώρους όπου βρίσκονται οι σπερματικές βλάστες. Τα κύτταρα του περικαρπίου υφίστανται ανατομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας σχηματισμού του καρπού. Μία έως δύο μέρες μετά τη γονιμοποίηση, τα μικρά χυμοτόπια μέσα σε κάθε κύτταρο ενώνονται ώστε να σχηματιστεί ένα κεντρικό χυμοτόπιο (Mohr and Stein, 1969). Στις ακόλουθες δύο εβδομάδες το κυτταρόπλασμα μειώνεται σε ένα λεπτό περιφερειακό στρώμα. Εν τω μεταξύ, πραγματοποιείται και η αρχική φάση διαχωρισμού του κυτταρικού τοιχώματος. Ο διαχωρισμός αρχίζει από τις περιοχές που συνδέονται τα γειτονικά κύτταρα και συνεχίζεται κατά μήκος των μεσοτοιχιών. Τα πλασμοδέματα που αλληλοσυνδέουν το κυτόπλασμα των γειτονικών κυττάρων είναι πολύ μικρά. Όλα τα οργανίδια μπορούν να παρατηρηθούν μέσα στα κύτταρα αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και το πλασμάλημμα και ο τονοπλάστης παραμένουν άθικτοι (Mohr and Stein, 1969) και φυσιολογικώς ενεργοί (Vickery and Bruinsma, 1973) στη διάρκεια ωρίμανσης του καρπού.

Τα μιτοχόνδρια, οι χρωμοπλάστες και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, διατηρούνται και στους ώριμους καρπούς (Crookes and Grierson, 1983). Τα πλαστίδια περιέχουν άμυλο και διαθέτουν τυπικές περιοχές grana και θυλακοειδείς μεμβράνες στρώματος (Harris and Spragg, 1969). Στους πράσινους καρπούς τα επιδερμικά



κύτταρα τείνουν να έχουν λιγότερο άμυλο σε σχέση με αυτά του εσωτερικού παρεγχύματος (Rosso, 1968). Ο κύριος όγκος της κυτταρικής διαίρεσης στο περικάρπιο πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά την άνθηση (Davies and Cocking, 1965) αν και οι Asahira *et al.* (1968) αναφέρουν πως κυτταρικές διαιρέσεις μπορεί να υπάρξουν και κατά τη δεύτερη εβδομάδα. Ωστόσο, στο *L. pimpinellifolium* κυτταρική διαίρεση παρατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού (Houghtalin, 1935).

### **Ζελατινώδες παρέγχυμα**

Κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του καρπού, το ζελατινώδες παρέγχυμα αρχίζει να επεκτείνεται μέσα στους χώρους της ωοθήκης και να περιβάλλει τις σπερματικές βλάστες. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται στις δέκα πρώτες μέρες μετά τη γονιμοποίηση, ενώ στη συνέχεια το ζελατινώδες παρέγχυμα καταλαμβάνει σχεδόν ολόκληρο το χώρο της ωοθήκης. Τα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος έχουν χλωροπλάστες οι οποίοι κατά τα τελευταία στάδια της ωρίμανσης του καρπού μετατρέπονται σε χρωμοπλάστες, όπως συμβαίνει και στο περικάρπιο. Στους ανώριμους καρπούς, το ζελατινώδες παρέγχυμα παρουσιάζεται σφικτό, αλλά καθώς ο καρπός ωριμάζει τα κυτταρικά τοιχώματα αρχίζουν να αποδομούνται. Τελικά, το ζελατινώδες παρέγχυμα του ώριμου καρπού αποκτά μια ζελατινοειδή υφή. Σε επόμενα στάδια ανάπτυξης είναι δυνατόν να συσσωρευτεί διακυτταρικό υγρό στους χώρους. Παρά τον παραπάνω εκφυλισμό, οι πρωτοπλάστες συνήθως παραμένουν άθικτοι.

### **Πλακούντας**

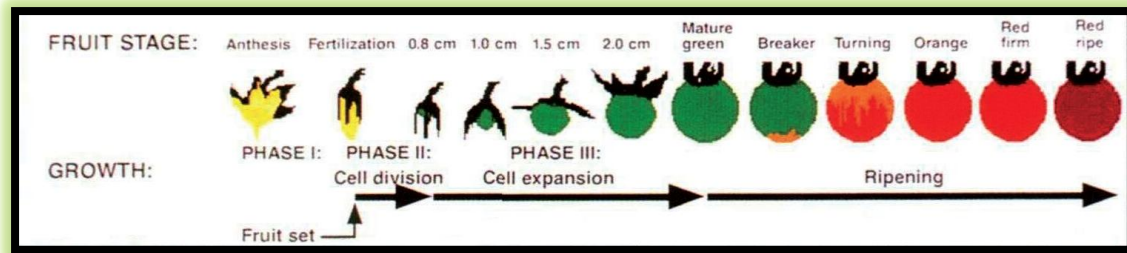
Ο πλακούντας είναι η περιοχή της ωοθήκης από την οποία εκφύονται οι σπερματικές βλάστες, με τις οποίες συνδέονται μέσω του ομφαλικού ιμάντα. Μετά τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου εξελίσσονται σε σπέρματα. Ο πλακούντας θεωρείται ο ιστός που τροφοδοτεί τις σπερματικές βλάστες με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξή τους.

### Ηθμαγγειώδεις δεσμίδες

Στους καρπούς της τομάτας απαντούν δύο κύριες διακλαδώσεις του αγγειακού ιστού. Η μία επεκτείνεται από τον ποδίσκο διαμέσου των εξωτερικών στοιβάδων του περικαρπίου. Η άλλη διασχίζει το κεντρικό τμήμα του καρπού και διακλαδίζεται για να καλύψει τα αναπτυσσόμενα σπέρματα. Οι ηθμαγγειώδεις δεσμίδες που διέρχονται από το περικάρπιο κατανέμονται εξίσου με ελάχιστες διακλαδώσεις, ενώ οι κεντρικές παρουσιάζουν αξιοσημείωτη διακλάδωση. Με τις διακλαδώσεις η επιφάνεια των ηθμαγγειωδών δεσμίδων μειώνεται, αλλά η αναλογία ηθμού/ξύλου αυξάνεται. Η γενική εντύπωση είναι ότι ο αγγειακός ιστός αποτελεί ένα κλειστό κύκλωμα με ελάχιστες τυφλές απολήξεις (Walker, 1975).

#### 1.1.6 Η ανάπτυξη του καρπού

Στις σύγχρονες ποικιλίες τομάτας η ανάπτυξη του καρπού αρχίζει με τη γονιμοποίηση. Το νωπό βάρος της ωοθήκης τότε είναι περίπου 5-10mg ενώ το βάρος του ώριμου προϊόντος μπορεί να κυμαίνεται από 15g στην κερασόμορφη τομάτα (cherry) έως και 450g στις επιτραπέζιες. Η αύξηση του καρπού της τομάτας μπορεί να παρασταθεί από μία σιγμοειδή καμπύλη η οποία διαιρείται σε τρεις περιόδους. Αρχικά, στις πρώτες δύο-τρεις εβδομάδες η ανάπτυξη είναι βραδεία και ο καρπός αποκτά μόλις το 10% του τελικού του βάρους. Στη φάση αυτή η ανάπτυξη της ωοθήκης παύει κατά την άνθηση, αλλά ξαναρχίζει μετά τη γονιμοποίηση. Η είσοδος προϊόντων αφομοίωσης από τα φύλλα στην ωοθήκη αυξάνεται ουσιαστικά δύο ημέρες μετά την επικονίαση (Archbold *et al.*, 1982) και ο ημερήσιος ρυθμός συσσώρευσης ξηράς ουσίας αυξάνεται από 30mg σε 150mg έως το τέλος της πρώτης εβδομάδας (Ho *et al.*, 1983). Ακολουθεί μία περίοδος ταχύτατης ανάπτυξης που διαρκεί τρεις έως πέντε εβδομάδες. Στη φάση αυτή, που φτάνει μέχρι το στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, ο καρπός αποκτά το μεγαλύτερο μέρος του βάρους του. Ο σχηματισμός του καρπού ολοκληρώνεται μετά και την τρίτη περίοδο που διαρκεί δύο εβδομάδες και που χαρακτηρίζεται από αργή ανάπτυξη. Στη φάση αυτή παρατηρείται μικρή αύξηση του βάρους αλλά και έντονες μεταβολικές διεργασίες στον καρπό.



**Εικ. 2.** Ανάπτυξη του καρπού της τομάτας (Gillaspy *et al.*, 1993).

### 1.1.6.1 Πρώιμη ανάπτυξη καρπού

Σύμφωνα με τους Gillaspy *et al.* (1993), η πρώιμη ανάπτυξη του καρπού μπορεί επιπλέον να διαχωριστεί σε τρεις φάσεις (Εικ. 2). Η πρώτη φάση περιλαμβάνει την ανάπτυξη της ωθήκης καθώς και τη διαδικασία της επιλογής της καρπόπτωσης ή συνέχισης των κυτταρικών διαιρέσεων, δηλαδή την καρπόδεση. Στη δεύτερη φάση η ανάπτυξη του καρπού βασίζεται κυρίως σε κυτταρικές διαιρέσεις, ενώ στην τρίτη πραγματοποιείται αύξηση του μεγέθους των κυττάρων έως ότου ο καρπός αποκτήσει το τελικό του μέγεθος (Ho and Hewitt, 1986). Πιο συγκεκριμένα:

1η Φάση ανάπτυξης: Ανάπτυξη της ωθήκης, γονιμοποίηση και καρπόδεση.

Τέσσερις έως πέντε μέρες μετά την άνθηση, οι κυτταρικές διαιρέσεις συνεχίζουν να πραγματοποιούνται στην αναπτυσσόμενη ωθήκη. Στη φάση αυτή, η μιτωτική δραστηριότητα περιορίζεται στο εξωτερικό στρώμα κυττάρων του περικαρπίου αλλά και του πλακούντα, από τον οποίο προέρχονται τα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος. Επίσης, η μιτωτική δραστηριότητα συνεχίζεται στους αγωγούς ιστούς, ενώ παράλληλα εμφανίζεται αυξημένη στο ανιχνεύσιμο πλέον αναπτυσσόμενο έμβρυο.

Σύμφωνα με τους Gillaspy *et al.* (1993), η φύση του σήματος (ή των σημάτων) που ελέγχει το σχηματισμό της ωθήκης δε μας είναι γνωστή. Φαίνεται πως ο παράγοντας (ή οι παράγοντες) που προέρχεται από το σποροφυτικό ιστό που

περιβάλλει την αναπτυσσόμενη ωοθήκη απαιτείται για τον ερεθισμό και τη λειτουργία των κυτταρικών διαιρέσεων στις ανθικές καταβολές μέχρι η ωοθήκη να αποκτήσει το ώριμο μέγεθός της. Στη φάση αυτή, η δραστηριότητα των κυτταρικών διαιρέσεων παραμένει προσωρινά μειωμένη μέχρι να ολοκληρωθεί η γονιμοποίηση.

Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης η εξέλιξη της καρπόδεσης έπεται την επιτυχημένη ολοκλήρωση της επικονίασης και γονιμοποίησης. Η γονιμοποίηση που ακολουθεί την επικονίαση προϋποθέτει τη βλάστηση της γύρης, τη διείσδυση και την ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα μέσα στο στύλο. Η παρουσία γονιμοποιημένων ωοθηκών γενικά προάγει την εξέλιξη της ωοθήκης σε καρπό. Συνεπώς, η εξέλιξη της καρπόδεσης εξαρτάται από ένα ή περισσότερα θετικά σήματα που παράγονται κατά τη διάρκεια ή μετά την επικονίαση και πιθανόν μετά τη γονιμοποίηση. Τα θετικά αυτά σήματα παράγονται από τη γύρη κατά τη διάρκεια της βλάστησης και της ανάπτυξης του γυρεοσωλήνα και κατά τη διάρκεια ή μετά τη σύντηξη των πυρήνων. Οι αυξητικοί παράγοντες με τους οποίους η γύρη επηρεάζει την καρπόδεση κυρίως είναι οι γιββερελλίνες και η αυξίνη.

### 2η Φάση ανάπτυξης: Ανάπτυξη των σπερμάτων και αρχική ανάπτυξη του εμβρύου.

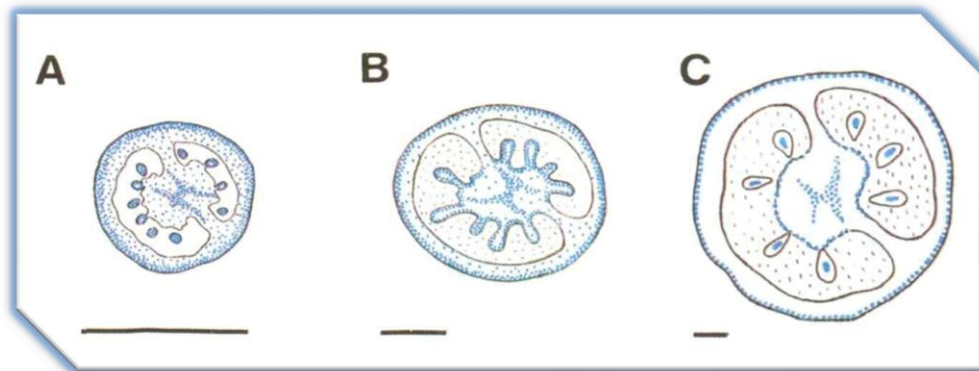
Στον καρπό της τομάτας, αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, ενεργοποιούνται οι κυτταροδιαίρεσεις στην ωοθήκη οι οποίες και διαρκούν περίπου επτά έως δέκα ημέρες (Marcelli *et al.*, 1978; Varga and Bruinsma, 1986; Bohner and Bangerth, 1988a). Μετά την ολοκλήρωση της φάσης των κυτταρικών διαιρέσεων και για τις επόμενες έξι έως επτά εβδομάδες, παρατηρείται μεγέθυνση των κυττάρων και συνεπώς του καρπού. Πριν τη μεγέθυνσή τους, τα διαιρούμενα κύτταρα του καρπού είναι μικρά σε μέγεθος, σφικτά συμπιεσμένα και πλούσια σε κυτταροπλασματικές ουσίες, ενώ διαθέτουν και μικρά χυμοτόπια. Καθώς μεγεθύνονται τα κύτταρα, το αρχικό κυτταρικό τοίχωμα και το κυτόπλασμα γίνονται ολοένα και λεπτότερα, ενώ τα χυμοτόπια καταλαμβάνουν όλο και μεγαλύτερη αναλογία στον κυτταρικό χώρο (Smith, 1935).

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης, η κυτταρική διαίρεση είναι πιο έντονη στο περικάρπιο και στον πλακούντα (Varga and Bruinsma, 1986) (Εικ. 3). Στα πολύ πρώιμα στάδια της φάσης αυτής, η μιτωτική δραστηριότητα είναι πιο έντονη στο

εξωτερικό περικάρπιο σε σχέση με το εσωτερικό. Οι κυτταρικές διαιρέσεις στα αναπτυσσόμενα σπέρματα γίνονται κυρίως στις περιφερειακές στιβάδες των χιτώνων, παρά στο έμβρυο.

3η Φάση ανάπτυξης: Η αύξηση του όγκου των κυττάρων και η ωρίμανση του εμβρύου.

Μετά τις κυτταρικές διαιρέσεις, η ανάπτυξη του καρπού βασίζεται στην αύξηση του κυτταρικού όγκου. Ο αριθμός και ο συγχρονισμός των κυτταρικών διαιρέσεων μπορεί να διαφέρει σημαντικά στα διάφορα είδη καρπών, αλλά και τα δύο συμβάλλουν στο τελικό του μέγεθος. Ωστόσο, στα περισσότερα φυτά η αύξηση του όγκου των κυττάρων συμβάλλει περισσότερο στο τελικό μέγεθος του καρπού (Gillaspy *et al.*, 1993). Η αύξηση του όγκου των κυττάρων συνήθως αυξάνει το μέγεθος του καρπού κατά 100 φορές ή και περισσότερο (Coomble, 1976) (Εικ. 3). Στον καρπό της τομάτας, ο όγκος των κυττάρων στον πλακούντα, στο ζελατινώδες παρέγχυμα και στο εσωτερικό περικάρπιο μπορεί να δεκαπλασιαστεί, αλλά τα κύτταρα που αποτελούν το εξωτερικό περικάρπιο επειδή συνεχίζουν να διαιρούνται, αυξάνονται λιγότερο.



**Εικ. 3.** Η διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης στον καρπό της τομάτας. Οι μπλε γραμμές αναπαριστούν περιοχές μιτωτικής δραστηριότητας. Bars = 0.2cm.  
 A) Εγκάρσια τομή καρπού από την πρώιμη φάση II, B) Εγκάρσια τομή καρπού προς το τέλος της φάσης II, C) Εγκάρσια τομή καρπού από την πρώιμη φάση III (Gillaspy *et al.*, 1993).

Θα πρέπει να σημειωθεί πως η αύξηση του όγκου των κυττάρων στους ιστούς του καρπού δε συσχετίζεται με την ανάπτυξη των σπερμάτων, τα οποία άλλωστε δεν παρουσιάζουν σημαντική αύξηση μεγέθους. Κατά τη διάρκεια αυτής της ταχύτατης αύξησης του κυτταρικού όγκου του καρπού, το έμβρυο αναπτύσσεται από το στάδιο του σφαιρικού στο στάδιο του τορπιλόμορφου εμβρύου (Smith, 1935).

#### **1.1.6.2 Ώριμος πράσινος καρπός**

Στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, τα παρεγχυματικά κύτταρα του περικαρπίου έχουν διάμετρο μεταξύ 300-500μm και έχουν σχετικά παχιά κυτταρικά τοιχώματα και μία λεπτή κυττοπλασματική στοιβάδα που περικλείει ένα κεντρικό χυμοτόπιο. Περιστασιακά, είναι δυνατόν να παρατηρηθούν πλασμοδέσματα μεταξύ των γειτονικών κυττάρων.

Ο πράσινος ώριμος καρπός περιέχει ένα μεγάλο αριθμό χλωροπλάστων. Οι χλωροπλάστες αυτοί περιέχουν grana, αλλά όχι στον ίδιο βαθμό που αυτά απαντούν στο χλωροπλάστη ενός φύλλου C3 φυτού. Επίσης, στους χλωροπλάστες του ανώριμου καρπού μπορούν να διακριθούν και αμυλόκοκκοι, αλλά μειώνονται όσο η ανάπτυξη πλησιάζει τον πράσινο ώριμο καρπό. Οι χλωροπλάστες επίσης περιέχουν τις χρωστικές του καρπού, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Οι επικρατέστερες χρωστικές στους πράσινους καρπούς αποτελούνται από ένα μίγμα χλωροφύλλης α και β. Αντίθετα, τα καροτενοειδή απαντούν σε μικρές ποσότητες. Μάλιστα, περισσότερο από το μισό αυτών αποτελούν οι ξανθοφύλλες, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια του πράσινου ώριμου καρπού, ενώ, καθώς ο καρπός ωριμάζει, η αναλογία αυτή μειώνεται (Rabinowitch *et al.*, 1975). Τέλος, υπάρχουν α- και β- καροτένια σε μικρές όμως συγκεντρώσεις (Meredith and Purcell, 1966).

#### **1.1.6.3 Ωρίμανση του καρπού**

Η μετατροπή του καρπού της τομάτας από το ώριμο πράσινο στάδιο στο πλήρως ώριμο κόκκινο περιλαμβάνει δραματικές αλλαγές στο χρώμα, στη σύνθεση, στο άρωμα, στη γεύση και στη δομή του. Η ωρίμανση αποτελεί μια ιδιαίτερη διαδικασία που περιλαμβάνει αντιδράσεις σύνθεσης αλλά και αποδόμησης.

Μάλιστα, επιφέρει αλλαγές στο μεταβολισμό και στην έκφραση γονιδίων, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές διαφοροποιήσεις της ποιότητας του καρπού. Οι αλλαγές αυτές είναι συντονισμένες καθώς υφίστανται στην πλειονότητα των κυττάρων του καρπού και περιλαμβάνουν αλλαγές σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα. Οι διάφορες όψεις της ωρίμανσης φαίνεται να συντονίζονται και να ρυθμίζονται από φυτικές ορμόνες, αλλά μπορούν επίσης και να τροποποιηθούν από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Grierson and Kader, 1986).

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, πραγματοποιούνται πολλές αλλαγές και σε υποκυτταρικό επίπεδο. Καταρχάς, παρατηρούνται αλλαγές στα κυτταρικά τοιχώματα και ειδικά στην περιοχή του μεσοτοιχίου, του οποίου μειώνεται η ηλεκτρονιακή πυκνότητα. Αυτό συμπίπτει με την ένταση της διαλυτοποίησης του κυτταρικού τοιχώματος που γίνεται μέσω της πολυγαλακτουρονάσης (Crookes and Grierson, 1983). Καθώς εξελίσσεται η ωρίμανση, η διαλυτοποίηση των κυτταρικών τοιχωμάτων γίνεται πιο εκτεταμένη, ενώ στους πιο ώριμους καρπούς τα τοιχώματα παρουσιάζονται εύθραυστα. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι πως ο ιστός του καρπού αποκτά μια απαλή και χυμώδη υφή.

Επίσης, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης παρατηρείται έντονη μείωση του μεγέθους των αμυλόκοκκων και σταδιακά εξαφανίζονται. Παράλληλα, οι μεμβράνες των θυλακοειδών εμφανίζονται με λιγότερα grana, ενώ κάνουν την εμφάνισή τους σταγόνες λιπιδίων που προέρχονται από τα θυλακοειδή. Οι αλλαγές αυτές προμηνύουν την έναρξη της μετατροπής των χλωροπλάστων σε χρωμοπλάστες (Harris and Spurr, 1969). Οι χλωροπλάστες τελικά χάνουν τη χλωροφύλλη τους, ενώ σταδιακά οι χαρακτηριστικές δομές των θυλακοειδών εξαφανίζονται και αντικαθίστανται από ένα εσωτερικό σύστημα μεμβρανών που διαθέτει μία χαρακτηριστική κυματοειδή μορφή (Simpson *et al.*, 1976; Crookes and Grierson, 1983). Σε μερικές περιπτώσεις, οι μεμβράνες αυτές εμφανίζονται με μια βελονοειδή μορφή, αλλά είναι επίσης δυνατό να διατάσσονται και συγκεντρικά. Καθώς αναπτύσσονται οι χρωμοπλάστες, συσσωρεύεται το λυκοπένιο με τη βοήθεια του εσωτερικού συστήματος μεμβρανών, ενώ το β-καροτένιο το οποίο διαθέτει διαφορετική διαλυτότητα συσσωρεύεται στα λιποσφαιρίδια.

## 1.2 Η ΠΑΡΘΕΝΟΚΑΡΠΙΑ

Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης, η επαγωγή της καρπόδεσης εξαρτάται από την επιτυχημένη ολοκλήρωση της επικονίασης και της γονιμοποίησης. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, ο φυσιολογικός σχηματισμός του καρπού μπορεί να πραγματοποιηθεί ανεξάρτητα της επικονίασης και της γονιμοποίησης. Αυτό μπορεί να εξασφαλιστεί με δύο τρόπους, την απόμιξη και την παρθενοκαρπία.

Η απόμιξη είναι η αγενής αναπαραγωγή μέσω εμβρύων (Nogler, 1984), που οδηγεί στο σχηματισμό κλώνων (Koltunow and Grossniklaus, 2003). Αντίθετα, παρθενοκαρπία είναι η ανάπτυξη της ωοθήκης σε άσπερμο καρπό χωρίς να μεσολαβήσουν η επικονίαση και η γονιμοποίηση (Lukyanenko, 1991). Η παρθενοκαρπία μπορεί να είναι φυσική, αλλά μπορεί να επαχθεί και τεχνητά με την εφαρμογή μιας ποικιλίας ορμονών (Gustafson, 1936, 1942; Nitch, 1952; Osborne and Went, 1953). Μάλιστα, προτείνεται πως η απορρύθμιση της ορμονικής ισορροπίας στην ωοθήκη των παρθενοκαρπικών φυτών αντικαθιστά την επικονίαση και τη γονιμοποίηση και με τον τρόπο αυτό προκαλείται το ερέθισμα της καρπόδεσης και ανάπτυξης του καρπού. Επίσης, η επικράτηση μη ευνοϊκών συνθηκών, όπως οι ακραίες θερμοκρασίες, μπορούν να αποτρέψουν την επικονίαση και συνεπώς την καρπόδεση.

Έχει αποδειχθεί ότι η παρθενοκαρπία αποτελεί ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό για την αποφυγή χαμηλής καρπόδεσης σε ακραίες συνθήκες. Στην περίπτωση της προαιρετικής παρθενοκαρπίας, η ανάπτυξη του παρθενοκαρπικού καρπού υφίσταται ακόμη και σε συνθήκες που δεν επιτρέπουν την επικονίαση. Στην τομάτα, η αποτυχία της καρπόδεσης αποτελεί συνηθισμένο φαινόμενο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες τόσο στον αγρό όσο και στο θερμοκήπιο (Howlett, 1939; Rick, 1978). Τέτοιες συνθήκες αποτελούν η χαμηλή ή υψηλή υγρασία, η χαμηλή ένταση φωτισμού, η χαμηλή ή υψηλή θερμοκρασία και οι υψηλής εντάσεως άνεμοι (George *et al.*, 1984).

Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρθενοκαρπία έχει μεγάλη σημασία για τις καλλιέργειες στις οποίες οι άσπερμοι καρποί παρουσιάζουν μεγάλη ζήτηση από το καταναλωτικό κοινό, όπως οι μπανάνες, εσπεριδοειδή κ.α. Εκτός αυτού, η ζωή ενός παρθενοκαρπικού καρπού είναι μεγαλύτερη σε σχέση με έναν ένσπερμο,



καθώς τα σπέρματα παράγουν ορμόνες που σταδιακά επιφέρουν τη γήρανσή του. Παρά τα πλεονεκτήματα που μπορεί να παρουσιάζει ένας άσπερμος καρπός, η χρήση του φαινομένου της παρθενοκαρπίας στη γεωργία είναι περιορισμένη. Άλλωστε, μεταλλάξεις που δημιουργούν παρθενοκαρπικούς καρπούς συχνά παρουσιάζουν πλειοτροπικές δράσεις, αλλά και συνδέονται με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά όπως αρσενική και θηλυκή στειρότητα ή μικρότερους και κακοσχηματισμένους καρπούς (Vagoquaux *et al.*, 2000).

### 1.2.1 Οι κύριες πηγές παρθενοκαρπίας στην τομάτα (*pat-1*, *pat-2* και *pat-3/pat-4*)

Εξαιτίας των προοπτικών τους στην αγρονομική πρακτική έχουν μελετηθεί διεξοδικά τρεις παράγοντες που σχετίζονται με το σχηματισμό άσπερμων καρπών: 'Soressi' ή 'Montfavet 191', 'Severianin' και 'RP75/59' (Gorguet *et al.*, 2005). Ο Philouze (1985) θεώρησε τους τρεις αυτούς παράγοντες ως τους μοναδικούς που είναι ικανοί να δώσουν παρθενοκαρπικούς καρπούς με τις ίδιες ιδιότητες με εκείνες των καρπών που προέρχονται μετά από επικονίαση και γονιμοποίηση.

#### Το γονίδιο *pat-1*

Οι Pecaut and Philouze (1978) πέτυχαν μια μετάλλαξη (*Montfavet 191*) που χαρακτηρίζεται από κοντούς ανθήρες και σχηματισμό παρθενοκαρπικών καρπών. Ο παραπάνω φαινότυπος οφείλεται στην υπολειπόμενη μετάλλαξη ενός γονιδίου, του *pat-1*. Κυτταρολογικές μελέτες έδειξαν πως η έναρξη σχηματισμού της ωθήκης στις μεταλλάξεις *pat-1* πραγματοποιείται στο στάδιο πριν την άνθηση, σε σχέση με τα αγρίου τύπου που συμβαίνει δύο ημέρες μετά την άνθηση (Mazzucato *et al.*, 1998). Αυτό οδηγεί στο σχηματισμό ωθηκών μεγαλύτερου βάρους καθώς και μεγαλύτερου αριθμού κυτταρικών στοιβάδων στο περικάρπιο των ωθηκών *pat-1* (Mapelli *et al.*, 1978). Επίσης, η μετάλλαξη *pat-1* εμφανίζει ακανόνιστη μείωση που οδηγεί σε μικρότερο αριθμό βιώσιμων ωοκυττάρων (Mazzucato *et al.*, 1998). Ένα ακόμη χαρακτηριστικό των *pat-1* είναι το γεγονός ότι ακόμη και σε ευνοϊκές συνθήκες για την παραγωγή σπόρων, τα μεταλλάγματα αυτά δίνουν χαμηλά ποσοστά καρπόδεσης (Mazzucato *et al.*, 1998; Pecaut and Philouze, 1978).

Η μετάλλαξη *pat-1* παράγει καρπούς τομάτας με βάρος και μέγεθος που βρίσκεται περίπου στα δύο τρίτα ενός κανονικού καρπού (Bianchi and Soressi, 1969; Falavinga *et al.*, 1978; Philouze and Pecaut, 1986).

Το γονίδιο *pat-2*

Οι Philouze and Maisonneuve (1978) και Nuez *et al.* (1986) έδειξαν ότι το υπολειπόμενο γονίδιο *pat-2* είναι υπεύθυνο για την εκδήλωση της παρθενοκαρπίας στην ποικιλία τομάτας *Severianin*. Το κύριο πλεονέκτημα της εκμετάλλευσης της παρθενοκαρπίας στην *Severianin* είναι η δυνατότητα πως τα θνησιγενή πλειοτροπικά αποτελέσματα της μετάλλαξης *pat-2* είναι δυνατόν να ξεπεραστούν μέσω της επιλογής κατάλληλου γενετικού υλικού.

Τα γονίδια (*pat-3/pat-4*)

Η σειρά *RP75/59* στην τομάτα βρέθηκε στους απογόνους της διασταύρωσης μεταξύ 'Atom' x 'Bubjekosoko'. Σε αυτήν την περίπτωση παρατηρήθηκε υψηλό επίπεδο παρθενοκαρπίας δίχως εμφανή αποτελέσματα στο μέγεθος και στην εμφάνιση του καρπού (Philouze, 1983b, 1985). Ωστόσο, σε αυτήν την καινούργια πηγή παρθενοκαρπίας βρέθηκε μία συσχέτιση ανάμεσα στην καρπόδεση και στο μέγεθος των καρπών μέσα στην ίδια ταξιανθία ή και φυτό: όταν στο ίδιο φυτό υπάρχουν μαζί ένσπερμοι και άσπερμοι καρποί, οι ένσπερμοι είναι μεγαλύτεροι σε μέγεθος (Philouze, 1989). Στη σειρά *RP75/59* η παρθενοκαρπία είναι προαιρετική, συνεπώς για να αποκτηθούν άσπερμοι καρποί θα πρέπει τα φυτά να αναπτυχθούν σε συνθήκες που δυσκολεύουν την επικονίαση ή/και τη γονιμοποίηση, ή τα άνθη θα πρέπει πρώτα να ευνουχισθούν.

### 1.2.2 Μηχανισμός της παρθενοκαρπίας

Διάφοροι ερευνητές αναφέρουν ότι οι γιββερελλίνες προάγουν την ανάπτυξη άσπερμων καρπών (Bunger-Kibler and Bangerth, 1982; Sjut and Bangerth, 1982; Alabadi *et al.*, 1996; Fos *et al.*, 2000). Επίσης, για τη σειρά *RP75/59* προτάθηκε ότι τα *pat-3/pat-4* είναι υπεύθυνα για την αύξηση της συγκέντρωσης του GA1 και του GA3 στις ωθήκες πριν την επικονίαση (Fos *et al.*, 2001). Πρόσφατα, η ανάλυση της

έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα κλειδιά που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των γιββερελλινών έδειξε μια υψηλή και συνεχή έκφραση του GA20-ox1 στις ωοθήκες των *rat-1* μεταλλάξεων, όταν στις ωοθήκες του αγρίου τύπου η έκφραση του γονιδίου αυτού αυξάνεται μόνο μετά την επικονίαση ή τη γονιμοποίηση. Επιπρόσθετα, οι ερευνητές μελέτησαν την επίδραση της διαφορικής έκφρασης του γονιδίου στη συσσώρευση των GAs: πριν την άνθηση η σύνθεση των γιββερελλινών διακόπηκε ανάμεσα στην GA19 και GA20 στις ωοθήκες αγρίου τύπου. Αντίθετα, στις ωοθήκες *rat-1*, τα GA20 και το ενεργό GA1 βρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις (Olimpieri *et al.*, 2007). Το μονοπάτι βιοσύνθεσης του GA φαίνεται να αποτελεί το κλειδί για την έναρξη σχηματισμού του άσπερμου καρπού και στα τρία μεταλλάγματα (*rat-1*, *rat-2* και *rat-3/rat-4*).

Οι πολυαμίνες επίσης συμμετέχουν στην πρώιμη ανάπτυξη του άσπερμου καρπού. Οι πολυαμίνες είναι απαραίτητες για την παρθενοκαρπική ανάπτυξη των ωοθηκών των *rat-2*. Οι Fos *et al.* (2003) έδειξαν ότι η προσθήκη πολυαμινών προάγει μερικώς την καρπόδεση και την ανάπτυξη των άγριων τύπων ωοθηκών στην ποικιλία τομάτας Madrigal. Δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί εάν οι γιββερελλίνες και οι πολυαμίνες ενεργούν ανεξάρτητα στην καρπόδεση της τομάτας, αλλά η χαμηλότερη αποτελεσματικότητα των πολυαμινών συγκρινόμενη με εκείνη των γιββερελλινών προτείνει πως οι πολυαμίνες δε λειτουργούν ως το πρωταρχικό σήμα (Fos *et al.*, 2003). Μάλιστα, οι Alabadi *et al.* (1996) αναφέρουν ότι συγκεκριμένα βιοσυνθετικά μονοπάτια πολυαμινών παρουσιάζονται πιο ενεργά μετά τη χορήγηση αυξινών και γιββερελλινών. Πιθανόν, το γονίδιο *rat-2* ενεργοποιεί το μονοπάτι βιοσύνθεσης της πολυαμίνης μέσω υψηλών GA επιπέδων στις μη επικονιασμένες ωοθήκες *rat-2* (Fos *et al.*, 2003). Συνεπώς, τα γονίδια *rat-1*, *rat-2* και *rat3/rat-4* ενεργοποιούν ένα ή και περισσότερα μονοπάτια στη βιοσύνθεση του GA, με αποτέλεσμα την πιο έντονη έκφραση των ενεργών GAs, οι οποίες με την σειρά τους προάγουν το σχηματισμό παρθενοκαρπικών καρπών.

Εκτός των γιββερελλινών, και η αυξίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παρθενοκαρπικών καρπών. Γενικά η αυξίνη συντηρεί το επίπεδο της GA3 οξειδάσης και συνεπώς της βιοσύνθεσης GA1 (Ross *et al.*, 2000). Παρόλα αυτά οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ γιββερελλινών και αυξίνης ποικίλουν ανάλογα με το όργανο του φυτού (Ross and O'Neil, 2001).

Πρόσφατα, ο ρόλος της αυξίνης στην παρθενοκαρπία αναβαθμίστηκε με την εισαγωγή του γονιδίου *ARF8* στο *Arabidopsis* και του *IAA9* στην τομάτα. Στο μετάλλαγμα *fwf* του *Arabidopsis*, ο παράγοντας απόκρισης στην αυξίνη 8 (*ARF8*) είχε ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό της ανάπτυξης του καρπού από επικονίαση και γονιμοποίηση και οδήγησε στο σχηματισμό παρθενοκαρπικού καρπού (Goetz *et al.*, 2006). Όταν το *ARF8* είναι λειτουργικό, τότε εμφανίζεται ως αναστολέας καθώς σταματά την περαιτέρω ανάπτυξη της ωοθήκης όταν δεν υπάρχει γονιμοποίηση. Μάλιστα, προτείνεται πως το *ARF8* προσδένεται στις πρωτεΐνες Aux/IAA ώστε να σχηματισθεί πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο προσδένεται στους προαγωγείς ενός εύρους γονιδίων που αποκρίνονται στην αυξίνη, τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη του σχηματισμού των καρπών και την ανάπτυξή τους.

Οι Groot *et al.* (1987) έδειξαν ότι όταν ο καρπός αναπτύσσεται κανονικά, το τελικό του μέγεθος σχετίζεται θετικά με τον αριθμό των σπερμάτων του. Κάτι αντίστοιχο φαίνεται να συμβαίνει και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Οι άσπερμοι καρποί της *Severianin* περιέχουν ψευδοέμβρυα, δομές που μοιάζουν με τους σπόρους που απαντούν σε παρθενοκαρπικούς καρπούς που επάγονται με τη χρήση αυξινών (Lin *et al.*, 1983). Τα ψευδοέμβρυα αυτά σχηματίζονται από την εσωτερική στοιβάδα των χιτώνων των σπερματικών βλαστών (Asahira *et al.*, 1967). Οι Kataoka *et al.* (2003) αναφέρουν πως η ανάπτυξη του ψευδοέμβριου σχετίζεται στενά με την καρπόδεση και την ανάπτυξη. Γι' αυτό το λόγο τα ψευδοέμβρυα μπορούν να λειτουργήσουν ως υποκατάστατα σπερμάτων σε ότι αφορά τον έλεγχο της ανάπτυξης του καρπού. Στη *Severianin* η ανάπτυξη των ψευδοεμβρύων συσχετίζεται με την ανάπτυξη του καρπού και βρίσκεται υπό τον έλεγχο του GA3 και/ή του ουνικοναζολίου (uniconazole), ενός παρεμποδιστή της βιοσύνθεσης γιββερελλινών (Kataoka *et al.*, 2003).

Η σημασία των ενδογενών γιββερελλινών στην ανάπτυξη του παρθενοκαρπικού καρπού δεν είναι απαραίτητο ότι θα διαρκέσει για ολόκληρη την περίοδο σχηματισμού του. Το επίπεδο των ενδογενών γιββερελλινών κατά τη διάρκεια και μετά από τη φάση της ταχύτατης αύξησης (τρεις με τέσσερις εβδομάδες μετά την άνθηση), μπορεί να μην είναι σημαντική για τη μετέπειτα ανάπτυξη του καρπού. Αντίθετα, ένα χαμηλό επίπεδο ενδογενών γιββερελλινών, μία με τέσσερις

εβδομάδες μετά την άνθηση ενδέχεται να προκαλέσει παρεμπόδιση της ανάπτυξης (Kataoka *et al.*, 2004).

Στο στάδιο της κυτταρικής επιμήκυνσης του παρθενοκαρπικού καρπού, βρέθηκε ότι η αυξίνη συντίθεται κατά κύριο λόγο μέσα στα επιμηκυνόμενα κύτταρα (Kojima *et al.*, 2003). Στο τέλος του σταδίου της επιμήκυνσης, ο αποπλάστης του περικαρπίου αναφέρεται ότι συμμετέχει επίσης και στη σύνθεση της αυξίνης. Οι ερευνητές βρήκαν μικρότερη συγκέντρωση αυξίνης στα εντός του εσωτερικού των χώρων της ωοθήκης, παρά στο περικάρπιο. Στους επικονιασμένους καρπούς, η αυξίνη πιθανόν συντίθεται στα αναπτυσσόμενα σπέρματα διότι σε αυτά οι συγκεντρώσεις της αυξίνης είναι υψηλότερη (Kojima *et al.*, 2003).

Οι Mazzucato *et al.* (1998) πρότειναν ότι το γονίδιο *pat-1* είναι δυνατό να είναι η μετάλλαξη ενός ομοιοτικού γονιδίου, όμοιο με τη μετάλλαξη στο TM8 MADS-box, του γονιδίου που προκαλεί την αποδόμηση του υπέρου (Lifschitz *et al.*, 1993).

### 1.2.3 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα

Σε αρχικές μελέτες, ο Gustafson (1936) ανέφερε πως κανονικού μεγέθους παρθενοκαρπικοί καρποί αναπτύχθηκαν μετά από χειρισμό των υπέρων με ινδολυλο-3-προπιονικό οξύ, φαινυλοξικό οξύ, IAA και IBA. Σε σύγκριση με το IAA, το 4-χλωροφαινόξυ-οξικό οξύ (4-CPA), μια συνθετική αυξίνη, μπορεί να σχηματίσει μεγαλύτερο καρπό με 20% περισσότερα κύτταρα σε σχέση με έναν ένσπερμο (Bunger-Kibler and Bangerth, 1983).

Επίσης, όταν εφαρμοστεί γιββερελλικό οξύ στα ανοικτά άνθη, προάγει το σχηματισμό παρθενοκαρπικών καρπών, όχι όμως και όταν εφαρμοστεί κατά τη διάρκεια της έναρξης έκπτυξης των ταξιανθιών (Sawhney and Greyson, 1971). Αν και οι γιββερελλίνες είναι πιο ενεργές σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με το IAA σε ότι αφορά το σχηματισμό άσπερμων καρπών, οι καρποί που θα σχηματιστούν έχουν λιγότερα κύτταρα και μικρότερο βάρος σε σχέση με τους ένσπερμους (Bunger-Kibler and Bangerth, 1983).

Οι Ho and Hewitt (1986) αναφέρουν μια ποικιλία από χημικές ουσίες που προάγουν την καρπόδεση σε παρθενοκαρπικούς καρπούς. Το 2-ναφθυλοξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε συγκεντρώσεις 40-60ppm. Επίσης,

εφαρμογή βρίσκει το 2-(3-χλωροφαινόξυ) προπιονικό οξύ στα 25-40mm, μόνο για καλλιέργεια θερμοκηπίου, και το N-m-τολοφθαλμικό οξύ 0.1-0.5% με καθολικό ψεκασμό, όταν τα φυτά έχουν αναπτύξει δύο με τρεις ταξικαρπίες, όπου η καθεμία έχει δύο με τρία ανοικτά άνθη (Thomas, 1982). Το 4-χλωροφαινόξυ-οξείκό οξύ, με προτεινόμενη συγκέντρωση τα 15-50mm (τα 15mm για θερμοκηπιακή καλλιέργεια), εφαρμόζεται με ψεκασμό στις ταξιανθίες κατά το άνοιγμα των ανθέων.

Τέλος, υπάρχουν αναφορές πως ξένη γύρη (Omidiji, 1979), σκόνη εδάφους ή φυσικός ερεθισμός του στίγματος (Gustafson, 1942) μπορούν να προάγουν την παρθενοκαρπία.

#### 1.2.4 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία

Η αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών παραγόντων και γονοτύπου καθορίζει την έκταση της έκφρασης της παρθενοκαρπίας. Άσπερμοι καρποί σχηματίζονται συχνά ως αποτέλεσμα επικράτησης δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών για την παραγωγή γύρης, την επικονίαση ή τη γονιμοποίηση (Abdalla and Verkerk, 1968). Οι χαμηλές θερμοκρασίες σχετίζονται με την παρθενοκαρπική καρπόδεση. Ο Preil (1973) αναφέρει πως σε σταθερή ημερήσια θερμοκρασία 25°C και νυκτερινές θερμοκρασίες 5, 10 και 15°C οι παρθενοκαρπικοί καρποί αποτέλεσαν το 71, 45 και 29% της ολικής καρπόδεσης αντίστοιχα. Επίσης, παράγοντες όπως το μήκος της ημέρας, η ένταση και η ποιότητα του φωτός και οι αλληλεπιδράσεις θερμοκρασίας-φωτός, μπορούν να έχουν ρόλο σε αυτή την απόκριση.

Τέλος βρέθηκε πως η παρθενοκαρπία μπορεί να επηρεαστεί και από τον τύπο του καρπού. Ο Philouze (1981) παρατήρησε πως η παρθενοκαρπία εμφανίστηκε πιο έντονη την άνοιξη και το καλοκαίρι, παρά το φθινόπωρο, αν και το φαινόμενο αυτό εξαρτάτο από το γονότυπο των φυτών. Η παρθενοκαρπία εμφανίστηκε με μεγαλύτερη συχνότητα σε μεγάλους καρπούς που προέρχονταν από πολύχρωρες ωοθήκες, ενώ ήταν μικρότερη σε γονότυπους με μικρούς καρπούς και ωοθήκες με λιγότερους χώρους.

### 1.2.5 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας

Σύμφωνα με τους Ho and Hewitt (1986), η παραγωγή παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας συχνά συνοδεύεται από την εμφάνιση ανωμαλιών σε αυτούς. Για παράδειγμα, καρποί δίχως σπέρματα που παράγονται κάτω από συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών (Asakira *et al.*, 1982) αλλά και από τη χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης (Osborne and Went, 1953) συχνά εμφανίζουν δυσμορφίες. Οι Asakira *et al.* (1982) κατηγοριοποίησαν τους παραμορφωμένους παρθενοκαρπικούς καρπούς σε πέντε κατηγορίες.

Το νωπό βάρος των καρπών που προέρχονται από γενετική παρθενοκαρπία είναι το μισό ή τα δύο τρίτα των ένσπερμων καρπών (Mapelli *et al.*, 1978), αν και ορισμένοι παρθενοκαρπικοί καρποί είχαν περίπου το ίδιο βάρος ή ακόμη και μεγαλύτερο (Osborne and Went, 1953). Ακόμη, το περιβάλλον και το γενετικό υπόβαθρο μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος του καρπού. Οι Philouze and Maisonneuve (1978) παρατήρησαν πως σε ανοιξιάτικες και καλοκαιρινές καλλιέργειες, τα βάρη τόσο των άσπερμων όσο και των ένσπερμων ποικιλιών τομάτας της ποικιλίας 'Severianin' ήταν όμοια, στη φθινοπωρινή όμως καλλιέργεια το βάρος των άσπερμων καρπών ήταν χαρακτηριστικά μικρότερο.

Τέλος, ο Lukyanenko (1991) αναφέρει πως οι παρθενοκαρπικοί καρποί θεωρούνται πιο γευστικοί και περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση ξηράς ουσίας. Επίσης, περιέχουν περισσότερα διαλυτά στερεά (Falavinga *et al.*, 1978) και υψηλότερα ποσοστά σακχάρων αλλά λιγότερα οξέα (Janes, 1941) και κυτταρίνη, σε σχέση με τους κανονικούς καρπούς (Ho and Hewitt, 1986).

### 1.3 ΤΟ ΑΜΥΛΟ

Το άμυλο αποτελεί την κύρια αποθησαυριστική μορφή του άνθρακα στα φυτά και διακρίνεται σε δύο κατηγορίες, στο παροδικό και στο μόνιμο. Το παροδικό συντίθεται κυρίως στα φωτοσυνθετικά ενεργά φύλλα και θεωρείται ότι υδρολύεται και μετακινείται κυρίως κατά τη διάρκεια της νύχτας για την κάλυψη των ενεργειακών αναγκών των ετερότροφων ιστών. Το μόνιμο άμυλο συναντάται στους ετερότροφους ιστούς όπως στις ρίζες, στους κονδύλους, στους καρπούς, στα έμβρυα ή στο ενδοσπέρμιο (Neuhaus and Emes, 2000). Τα φυσικά χαρακτηριστικά των δύο ειδών αμύλου διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος των αμυλόκοκκων, το σχήμα και τη σύνθεσή τους. Το μόνιμο άμυλο αποτελείται από αμυλόζη και αμυλοπηκτίνη, ενώ το παροδικό κυρίως από αμυλοπηκτίνη. Το άμυλο συντίθεται σε πλαστίδια, τους αμυλοπλάστες και τους χλωροπλάστες (Smith and Denyer, 1992). Οι δύο τύποι πολυσακχαριτών, η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη, είναι οργανωμένοι σε μια τρισδιάστατη ημι-κρυσταλλική δομή, τον αμυλόκοκκο.

Η αμυλόζη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης μοριακού βάρους 105-106kD. Ανάλογα με το είδος του φυτού αποτελείται από 100 μέχρι αρκετές χιλιάδες κατάλοιπα γλυκόζης που συνδέονται μεταξύ τους με  $\alpha$ -(1,4) γλυκοζιδικούς 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 διαφέρει ανάλογα με το φυτικό είδος, την ποικιλία, το φυτικό όργανο, την ηλικία ανάπτυξης του οργάνου αλλά και τις συνθήκες ανάπτυξης του φυτού (Martin and Smith, 1995). Σε διάλυμα ιωδίου (KI) η αμυλόζη δίνει βαθύ κυανό χρώμα που αποδίδεται στο σχηματισμό ενώσεων εγκλεισμού του ιόντος ιωδίου στην κοιλότητα του ελικόμορφου μορίου της αμυλόζης (Stryer, 1988).

Η αμυλοπηκτίνη είναι ένας διακλαδιζόμενος πολυσακχαρίτης, μεγάλου μοριακού βάρους 107-109kD (Baily *et al.*, 1996) και αποτελεί το 75-80% του ολικού αμύλου. Αποτελείται από κατάλοιπα γλυκόζης τα οποία συνδέονται με  $\alpha$ -(1,4) γλυκοζιδικούς δεσμούς. Τα σημεία διακλάδωσης βρίσκονται κάθε 20-30 μόρια γλυκόζης και συνδέονται με  $\alpha$ -(1,6) γλυκοζιδικούς δεσμούς. Οι διακλαδώσεις από μόνες τους σχηματίζουν μια οργανωμένη δομή. Αυτές οι δομές ενώνονται με  $\alpha$ -(1,6) δεσμούς με εσωτερικές διακλαδώσεις ( $\beta$  αλυσίδες) που μπορεί να διακλαδίζονται σε



ένα ή περισσότερα σημεία. Ακόμη υπάρχει μια μοναδική αλυσίδα για κάθε μόριο αμυλοπηκτίνης που φέρει ένα ελεύθερο άκρο άνθρακα (Martin and Smith, 1995). Τα σημεία διακλάδωσης σχηματίζουν κάποιες δομές που λέγονται συσσωματώματα (clusters) και αποτελούνται από 15-20 μονάδες γλυκόζης τα οποία τοποθετούνται σε ομάδες με μήκος 9nm κατά μήκος του άξονα του μορίου. Αλυσίδες των 45 μονάδων γλυκόζης χωρίζονται σε δύο συσσωματώματα, ενώ αλυσίδες των 70 μονάδων γλυκόζης χωρίζονται σε τρία συσσωματώματα (Smith, 2002). Ένα τυπικό μόριο αμυλοπηκτίνης έχει μήκος 200-400nm και πλάτος 15nm (Martin and Smith, 1995). Μικρές ποσότητες φωσφορικών ομάδων ενώνονται εστερικά με το υδροξύλιο του άνθρακα 6. Οι φωσφορικές ομάδες σχετίζονται τόσο με τη σύνθεση όσο και με την αποδόμηση του αμύλου (Stryer, 1988).

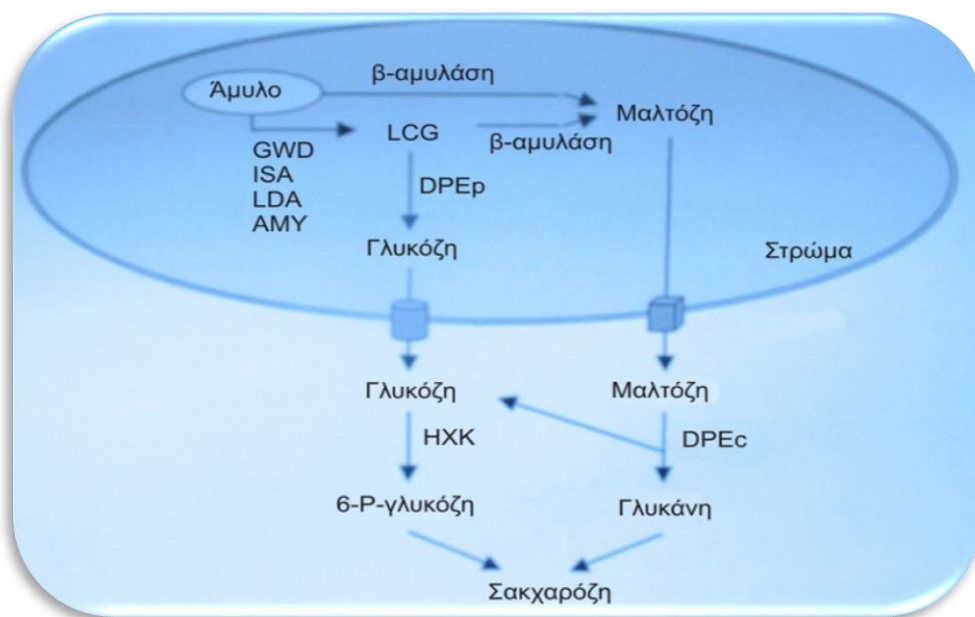
### 1.3.1 Η αποδόμηση του αμύλου

Η υδρόλυση του αμύλου πραγματοποιείται σε όλους τους φυτικούς ιστούς είτε πρόκειται για φωτοσυνθετικούς είτε για ετερότροφους ιστούς. Στους φωτοσυνθετικούς ιστούς, η υδρόλυση του αμύλου πραγματοποιείται παράλληλα με τη βιοσύνθεσή του. Φυσιολογικά το άμυλο δημιουργείται την ημέρα και υδρολύεται τη νύχτα, παρέχοντας τον πλεονάζοντα φωτοσυνθετικά καθηλωμένο άνθρακα κατά τη διάρκεια της νύχτας. Κατά τη διάρκεια της νύχτας, το μεγαλύτερο μέρος του αμύλου των χλωροπλαστών αποδομείται γρήγορα και μεταφέρεται κυρίως ως σακχαρόζη στους ιστούς καταναλωτές για την παραγωγή ενέργειας και αλυσίδων άνθρακα. Κατά τη διεργασία αυτή, παρατηρείται αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων αποδόμησης (Lea and Leegood, 1997).

Σε υγιή, μη καταπονημένα φυτά η υδρόλυση του αμύλου συντονίζεται με τη σύνθεση του αμύλου, ώστε ο ρυθμός της υδρόλυσης του αμύλου να είναι συνεχής κατά τη διάρκεια της νύχτας και αρκετός ώστε να καταναλώσει όλο σχεδόν το άμυλο που έχει συσσωρευτεί την προηγούμενη ημέρα. Ο ρυθμός της εξαγωγής του άνθρακα από τα φύλλα τη νύχτα μπορεί να παραμένει σταθερός και κατά τη διάρκεια της ημέρας ως αποτέλεσμα της υδρόλυσης του παροδικού αμύλου. 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 στα σπέρματα και τους κονδύλους, 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 δραστικότητα αυτών των υδρολυτικών ενζύμων του αμύλου αυξάνεται κατά την περίοδο της βλάστησης ή της ανάπτυξης (Lea and Leegood, 1997).



**Εικ. 4.** Απλοποιημένο διάγραμμα της υδρόλυσης του παροδικού αμύλου που δείχνει τη θέση της β-αμυλάσης. GDW: δικινάσες των γλυκανών, LCG: μακράς αλύσου γλυκάνες, LDA: οριακές δεξτρινάσες, AMY: α-αμυλάση, DPEp: πλαστιδιακή γλυκοτρανσφεράση, DPEc: κυτοπλασματική γλυκοτρανσφεράση, HXK: εξοζοκινάση, ISA: ισοαμυλάση (Karlan et al., 2006).

### 1.3.2 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 στην επιφάνεια του ημικρυσταλλικού αμυλόκοκκου. Αν και υπάρχουν μερικοί τύποι ενζύμων που είναι

ικανοί να απελευθερώσουν γλυκάνες από απομονωμένους αμυλόκοκκους *in vitro*, πειραματικά δεδομένα (Scheidig *et al.*, 2002; Steup *et al.*, 1983; Sun *et al.*, 1995) υποδεικνύουν ότι το μόνο ένζυμο που δρα με αυτό τον τρόπο *in planta* είναι η ενδοαμυλάση α-αμυλάση. Στο ενδοσπέρμιο των βλαστανόντων καρυόψεων των σιτηρών, οι α-αμυλάσες υδρολύουν τους α-(1,4) δεσμούς εντός των πολυμερών που βρίσκονται εκτεθειμένα στην επιφάνεια ή στις ρωγμές των αμυλόκοκκων. Στο *Arabidopsis* έχουν εντοπιστεί τρεις α-αμυλάσες. Από αυτές, η AMY3 εντοπίζεται στους χλωροπλάστες. Θεωρείται λοιπόν εύλογο να υποτεθεί ότι η AMY3 καταλύει την υδρόλυση του αμύλου στην επιφάνεια του αμυλόκοκκου κατά τη διάρκεια της νύχτας. Όμως, κανένας από αυτούς τους ισότυπους της α-αμυλάσης δεν είναι απαραίτητος για την αποδόμηση του αμύλου, αφού μεταλλάγματα που δεν έχουν το γονίδιο AMY1 (At4g25000) ή το AMY2 (At1g76130) ή το AMY3, παρουσιάζουν κανονικούς ρυθμούς αποδόμησης του αμύλου τη νύχτα. Τριπλό μετάλλαγμα, δηλαδή φυτά 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 δε φέρει αλλαγές και στη σύνθεση ή και στη δομή του αμύλου (Yu *et al.*, 2005).

Οποιοσδήποτε και να είναι ο μηχανισμός της απελευθέρωσης διαλυτών γλυκανών από τους αμυλόκοκκους, είναι ξεκάθαρο ότι αυτή η διαδικασία απαιτεί ένα νέο ένζυμο που ονομάστηκε δικινάση της γλυκάνης (GWD, glucan water dikinase). Μελέτες του ενζύμου αυτού στην πατάτα έδειξαν ότι η GWD μεταφέρει φωσφορικά από το ATP στη θέση 6 ή στη 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 προκαλούν σίγηση στα γονίδια που κωδικοποιούν την GWD ή επηρεάζουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου, μειώνουν

δραματικά και τη συγκέντρωση των φωσφορικών της αμυλοπηκτίνης και το ρυθμό 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 αγρίου τύπου (Caspar *et al.*, 1991; Yu *et al.*, 2001; Zeeman and Rees, 1999).

Οι απλούστερες πιθανές ερμηνείες για τη συμμετοχή της GWD στην αποδόμηση του αμύλου είναι ότι απαιτούνται είτε φωσφορικές ομάδες είτε το ίδιο το ένζυμο για τη δράση αγνώστων ενζύμων που υδρολύουν τις γλυκάνες στην επιφάνεια του αμυλόκοκκου. Οι φωσφορικές ομάδες πιθανόν επηρεάζουν το "πακετάρισμα" των πολυμερών της γλυκόζης μέσα στον αμυλόκοκκο και συνεπώς την πρόσβαση των υδρολυτικών ενζύμων (Blennow *et al.*, 2000; 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, η δικινάση της φωσφορογλυκάνης (PWD, phosphoglucan water dikinase) που απαιτείται για την ομαλή υδρόλυση του αμύλου. Μεταλλάγματα που δεν έχουν αυτό το ένζυμο παρουσιάζουν επίσης αυξημένα ποσά αμύλου στα φύλλα αλλά όχι στον ίδιο βαθμό με τα μεταλλάγματα της GWD. Είναι λοιπόν εύλογο να υποτεθεί ότι η GWD και η PWD δρουν μαζί για να δημιουργήσουν ένα πρότυπο φωσφορυλίωσης της αμυλοπηκτίνης που την κάνει προσιτή στα υδρολυτικά ένζυμα (Baunsgaard *et al.*, 2005; Kötting *et al.*, 2005).

Η περαιτέρω αποδόμηση του αμύλου μπορεί να γίνει με δύο διαφορετικούς τρόπους: είτε με υδρόλυση μέσω των αμυλασών (α και β) και του ενζύμου αποδιακλάδωσης τα οποία καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση των α-(1,4) και α-(1,6) γλυκοζιδικών δεσμών, είτε με φωσφορόλυση μέσω των φωσφορυλασών οι οποίες διασπών τους α-(1,4) γλυκοζιδικούς δεσμούς φωσφορολυτικά, με αποτέλεσμα το σχηματισμό φωσφορογλυκόζης (Heldt, 1991).

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

διατηρείται στον εστερικό δεσμό. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την υπό προϋποθέσεις αντιστροφή της αντίδρασης προς την πλευρά σύνθεσης του αμύλου.

Η φωσφορυλάση του αμύλου δε 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.
- Ένζυμο αποδιακλάδωσης, όπου υδρολύουν τους γλυκοζιδικούς δεσμούς στα σημεία διακλάδωσης, δεσμούς 1-6 (Heldt, 1991).

### 1.3.3 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 δε δρα πάνω σε δεσμούς α-(1,6). Επομένως, με υπόστρωμα την αμυλοπηκτίνη παράγει οριακές δεξτρίνες. Οι οριακές δεξτρίνες αποτελούνται από ένα μικρό αριθμό καταλοίπων γλυκόζης (4-10) και φέρουν τα αρχικά σημεία διακλάδωσης (Hopkins, 1995).

Η α-αμυλάση είναι ένα ένζυμο ευρύτατα διαδεδομένο τόσο στο φυτικό όσο και στο ζωικό βασίλειο καθώς και στους μικροοργανισμούς. Συγκρινόμενες σε αμινοξικό επίπεδο, οι α-αμυλάσες από φυτά, ζώα και μικροοργανισμούς αποκαλύπτουν τέσσερις υψηλά συντηρημένες περιοχές οι οποίες συσχετίζονται με

περιοχές που έχουν δομικό και λειτουργικό ρόλο για το ένζυμο (Nakazima *et al.*, 1986).

Στα φυτά απαντάται στα βλασάνοντα 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  $Ca^{2+}$  συμβάλλουν στην επαγωγή της δραστηριότητας της α-αμυλάσης (Hopkins, 1995). Αντίθετα, το ένζυμο παρεμποδίζεται από τα τελικά προϊόντα της υδρόλυσης του αμύλου καθώς και από τα βαρέα μέταλλα (Losch, 2004).

#### 1.3.4 Τα ένζυμα αποδιακλάδωσης

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

Διακρίνονται σε δύο ομάδες, τις πουλουλανάσες (EC 3.2.1.41) και την ισοαμυλάση (EC 3.2.1.68) ανάλογα με την ικανότητα υδρόλυσης του πουλουλανίου, ενός πολυσακχαρίτη με επαναλαμβανόμενες μονάδες μαλτοτριόζης που ενώνονται με 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. Απαντάται στις πατάτες, στα 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  $Hg^{2+}$  (Van de Maarel *et al.*, 2002).

Στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* υπάρχουν τέσσερις πρωτεΐνες που καταλύουν την υδρόλυση των α-(1,6) γλυκοζιτικών δεσμών. Μία από αυτές είναι μια οριακή

δεξτρινάση και οι υπόλοιπες τρεις ανήκουν στην τάξη των ισοαμυλασών των ενζύμων αποδιακλάδωσης (Nakamura, 1996). Η διευκρίνιση της συμμετοχής των ισοτύπων στην αποδόμηση του αμύλου γίνεται δυσκολότερη από το γεγονός ότι η ισοαμυλάση εμπλέκεται και στη βιοσύνθεση του αμύλου. Στα φύλλα του *Arabidopsis*, στο ενδοσπέρμιο των δημητριακών και στους κονδύλους της πατάτας, η μείωση ή η εξάλειψη της ενεργότητας της ισοαμυλάσης προκαλεί ανώμαλη σύνθεση του αμύλου. Ο αριθμός των αμυλόκοκκων αυξάνεται και ελάχιστο μέρος του αμύλου αντικαθίσταται με διαλυτή γλυκάνη με δεσμούς  $\alpha$ -(1,4) και  $\alpha$ -(1,6) γνωστή ως φυτογλυκογόνο (Burton *et al.*, 2002; Bustos *et al.*, 2004; James *et al.*, 1995; Zeeman *et al.*, 1998b). Ο τρόπος με τον οποίο η ισοαμυλάση καταστέλλει την έναρξη του σχηματισμού των αμυλόκοκκων και των σωματιδίων φυτογλυκογόνου σε κανονικές συνθήκες παραμένει προς διευκρίνιση. Στο *Arabidopsis*, μεταλλάξεις είτε στο γονίδιο ISA1 ή στο ISA2 (DBE1) προκαλεί απώλεια της ενεργότητας της ισοαμυλάσης και απώλεια της κανονικής δομής του αμύλου (Zeeman *et al.*, 1998b). Στην πατάτα, τα προϊόντα των γονιδίων StISA1 και StISA2 σχηματίζουν μαζί ένα ετεροτετραμερές που ευθύνεται για την ενεργότητα της ισοαμυλάσης του κονδύλου (Bustos *et al.*, 2004; Hussain *et al.*, 2003). Φαίνεται ότι το ίδιο ισχύει και για τα ένζυμα του *Arabidopsis*. Αν και τα γονίδια ISA1 και ISA2 είναι απαραίτητα για τη σύνθεση του αμύλου στα φύλλα του *Arabidopsis*, δεν ήταν απαραίτητα για την υδρόλυση των  $\alpha$ -(1,6) γλυκοζιτικών δεσμών κατά τη διάρκεια της αποδόμησης του αμύλου τη νύχτα. Στα μεταλλάγματα *isa1* και *isa2* (*dbe1*), και το άμυλο και το φυτογλυκογόνο αποδομούνται πλήρως τη νύχτα (Zeeman *et al.*, 1998b).

### 1.3.5 Η τύχη της μαλτόζης και της μαλτοτριόζης

Υπάρχουν μερικοί τρόποι μεταβολισμού της μαλτόζης μέσα στο πλαστίδιο 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 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. Μεταλλάξεις στο φορέα αυτό 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 μείωσή της κατά την 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).

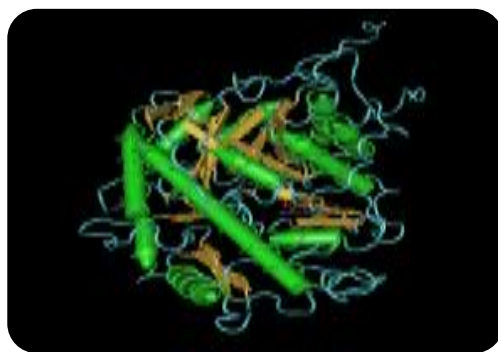


## 1.4 Η Β-ΑΜΥΛΑΣΗ

### 1.4.1 Η δομή του ενζύμου

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η β-αμυλάση (EC 3.2.1.2) είναι μια εξωυδρολάση που υδρολύει τους α-(1,4) γλυκοζιδικούς δεσμούς της αμυλόζης, αφαιρώντας μόρια β-μαλτόζης από το μη αναγωγικό τους άκρο. Η δράση της σε έναν πολύ- ή ολίγο- σακχαρίτη 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. Εξάιρεση αποτελεί η β-αμυλάση της γλυκοπατάτας που αποτελείται από τέσσερις πανομοιότυπες υπομονάδες των 56 KDa (Rochalska and Grabowska, 2007; Tanaka *et al.*, 2002; Ziegler, 1999; Shinke *et al.*, 1988).

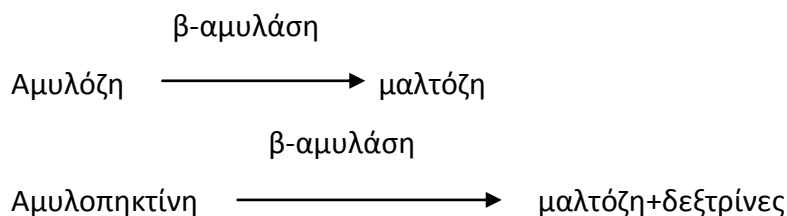
Το άριστο pH δράσης είναι 5.5-6.0, ενώ η άριστη θερμοκρασία δράσης έχει βρεθεί ότι είναι 55°C (Yamasaki, 2003). Το ένζυμο, αντίθετα με την α-αμυλάση, πιστεύεται ότι συντίθεται κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του σπέρματος και όχι κατά τη βλάστηση και αποτελεί περίπου το 1-2% του ολικού N στο σπέρμα (Kreis and Shewry, 1992). Στα σπέρματα των σιτηρών, το ένζυμο δημιουργείται κατά το σχηματισμό του σπέρματος και βρίσκεται σε ελεύθερη (διαλυτή) ή δεσμευμένη σε πρωτεϊνικά συσσωματώματα (αδιάλυτη) μορφή (Shinke *et al.*, 1988).



**Εικ. 5.** Η κρυσταλλική δομή της β-αμυλάσης σε γλυκοπατάτα (Cheong *et al.*, 2000) ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### 1.4.2 Η δραστηριότητα του ενζύμου

Η κύρια λειτουργία της β-αμυλάσης είναι η υδρόλυση του αμύλου στα φυτά (Kossmann and Lloyd, 2000). Βασισμένος, σε *in vitro* μελέτες, ο φυσιολογικός ρόλος της β-αμυλάσης στην υδρόλυση του αμύλου ήταν για πολλά χρόνια υπό αμφισβήτηση, και αυτό κυρίως γιατί θεωρούταν ότι ήταν καταλυτικά ανενεργή σε φυσικούς αμυλόκοκκους χωρίς την πρότερη υδρόλυση του αμύλου από άλλα αμυλολυτικά ένζυμα, όπως η α-αμυλάση (Beck and Ziegler, 1989). Παρόλα αυτά, τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι η β-αμυλάση παίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση του παροδικού αμύλου (Scheiding *et al.*, 2002). 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. Αυτή η δραστηριότητα αποδίδει ενέργεια και σκελετούς άνθρακα στο αναπτυσσόμενο έμβρυο μέσω του καταβολισμού των διαθέσιμων υποστρωμάτων. 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 σουλφυδρικές ομάδες όπως π.χ.  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ .

### 1.4.3 Εντοπισμός και ρύθμιση του ενζύμου

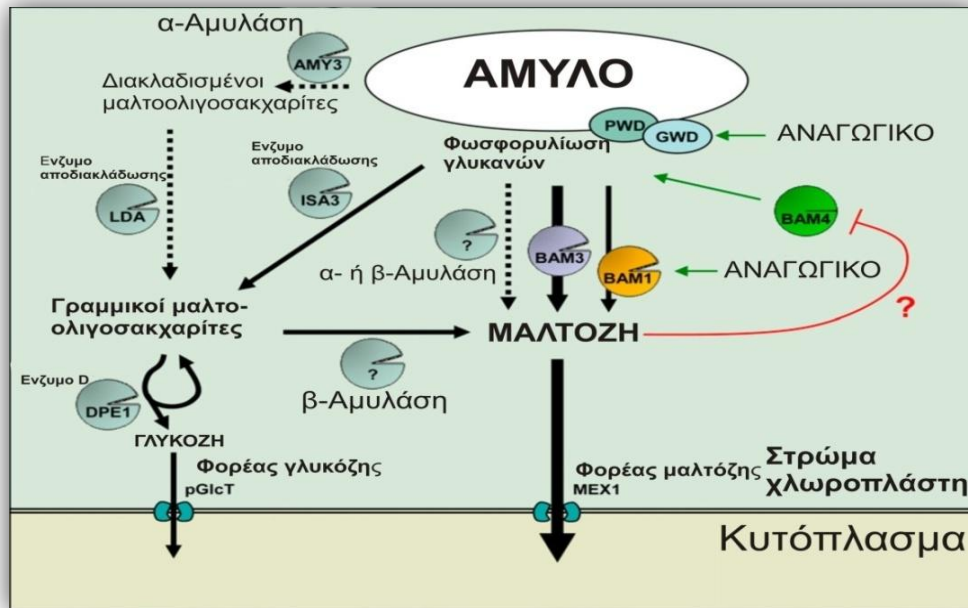
Το ένζυμο έχει βρεθεί σε φυτά και βακτήρια αλλά όχι στα ζώα. Οι β-αμυλάσες παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες όπως π.χ. μοριακό βάρος αλλά και ορισμένες διαφορές σε φυσικοχημικές ιδιότητες όπως π.χ. το άριστο pH (Kohno *et al.*, 1989). Απαντούν κυρίως σε αποθησαυριστικά όργανα διάφορων φυτικών ειδών, όπως στα σπέρματα και στις κονδυλώδεις ρίζες. Δύο τύποι β-αμυλασών έχουν χαρακτηριστεί και περιγραφεί στο σιτάρι (Daussant and Lauriere, 1990), το κριθάρι (Shewry *et al.*, 1988) και τη σίκαλη (Daussant *et al.*, 1991). Οι τύπου ενδοσπερμίου β-αμυλάσες αυξάνονται μόνο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης της καρύωσης, ενώ η άλλου τύπου β-αμυλάση, "μη ιστοειδική", εμφανίζεται σε διάφορα βλαστικά όργανα. Οι τύπου ενδοσπερμίου β-αμυλάσες εμφανίζουν μια συνεχόμενη αλληλουχία γλυκίνης στο C-τελικό άκρο της αμινοξικής τους ακολουθίας. Ειδικότερα, στο κριθάρι (Yoshingi *et al.*, 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 δε συντίθενται *de novo* κατά τη βλάστηση των σπερμάτων. Αντίθετα, η β-αμυλάση 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 στο 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 thaliana* π.χ., υπάρχουν εννέα ισότυποι τους οποίους οι Smith *et al.*, (2005) ονομάζουν BAM1 ως BAM9 παρέχοντας έτσι μια ενοποιημένη ονομασία. Έχουν αναγνωριστεί τρεις τουλάχιστον από τους εννέα ισότυπους β-αμυλασών που είναι μάλλον χλωροπλαστικοί και ρυθμίζονται από τα γονίδια At3g23920-(BAM1), At4g00490-(BAM2) και At4g17090-(BAM3). Ένας από αυτούς τους ισότυπους, προϊόν του γονιδίου του At4g17090-BAM3 με κικκαδικό ρυθμό (Lu *et al.*, 2005), είναι εξωχλωροπλαστική (CT-BMY) και συγκεντρώνει το 80%

της συνολικής αμυλολυτικής δραστηριότητας (Lin *et al.*, 1988). Η BAM3 εκφράζεται περισσότερο υπό χαμηλές θερμοκρασίες. Πρόσφατα οι Sparla *et al.* (2006) έδειξαν ότι ο BAM1 (που ονομάζεται TR-BMY και BMY7), κωδικοποιεί ένα ενεργό χλωροπλαστικό ισότυπο της β-αμυλάσης που ρυθμίζεται μέσω της αναγωγής του με τη θειορεδοξίνη (Sparla *et al.*, 2006). Ωστόσο, αρχικές αναφορές υποδεικνύουν ότι μετάλλαξη του BAM1 δεν έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του αμύλου των φύλλων, και εκφράζεται σε φωτοσυνθετικούς και μη φωτοσυνθετικούς ιστούς (Karlan and Guy, 2005). Ο BAM2 (που ονομάζεται επίσης και BMY9) και ο BAM4 (που ονομάζεται και BMY6) φέρουν επίσης πλαστιδιακό πεπτίδιο οδηγό (Lloyd *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2005). Όμως, οι προβλέψεις είναι ελλιπείς, και δεν έχει εντοπιστεί πειραματικά η υποκυτταρική θέση της πρωτεΐνης. Επιπροσθέτως, οι Karlan and Guy (2005) αναφέρουν ότι η μετάλλαξη του BAM2 δεν έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συγκέντρωσης του αμύλου στα φύλλα. Η BAM5 (που επίσης αποκαλείται BMY1 και RAM1) έχει μελετηθεί σε βάθος. Οι Laby *et al.* (2001) αναφέρουν ότι το 90% της δραστηριότητας 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 αναγνωρισθεί β-αμυλάσες σε ρίζες της μηδικής, διάφορα ψυχανθή όπως στο *Melilotus officinalis*, στο *Trifolium pratense*, στο *Lotus corniculatus* και στο *Pisum sativum*. Επιπλέον, β-αμυλάσες έχουν αναφερθεί στο χυμοτόπιο (μέρος όπου δεν υπάρχει άμυλο) στο μπιζέλι (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.



**Εικ. 6.** Το πρότυπο της αποδόμησης του αμύλου που παρουσιάζει τους ρόλους των διαφορετικών BAM πρωτεϊνών στο *Arabidopsis*. Η πιο σημαντική θεωρείται η BAM3. Η BAM1 φαίνεται να δρα συμπληρωματικά με τη BAM3. Το πρότυπο προτείνει ότι η BAM4 δρα ρυθμίζοντας την έκφραση της BAM1 και BAM3 (Lu *et al.*, 2005).

#### 1.4.4 Η β-αμυλάση σε καταστάσεις καταπόνησης

Η β-αμυλάση είναι ένα ένζυμο που “κινητοποιείται” από τα φυτά για την αντιμετώπιση καταστάσεων καταπόνησης. Αυτό έχει δειχθεί για την οσμωτική καταπόνηση και την αυξημένη αλατότητα (Dreier *et al.*, 1995; Datta *et al.*, 1999), καθώς και για τις χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες (Nielsen *et al.*, 1997; Seki *et al.*, 2001; Sung, 2001; Dreier *et al.*, 1995). Η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου σε συνθήκες καταπόνησης παρατηρείται σε πολλά φυτικά είδη (Dreier *et al.*, 1995; Datta *et al.*, 1999). Οσμωτική καταπόνηση του κριθαριού (*Hordeum vulgare*) (Dreier *et al.*, 1995), του κεχριού (*Pennisetum glaucum*) και του αραβόσιτου (*Zea mays*) (Datta *et al.*, 1999) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, η οποία συσχετίζεται και με μια αύξηση της συγκέντρωσης των ολικών πρωτεϊνών. Οι Todaka *et al.* (2000) αναφέρουν ότι σε κοτυληδόνες αγγουριού που εκτέθηκαν σε συνθήκες έλλειψης νερού, παρατηρήθηκαν έξι ισομορφές β-αμυλάσης, ενώ στο

μάρτυρα βρέθηκαν τρεις. Η υπόθεση που διατύπωσαν είναι ότι μάλλον πρόκειται για ενεργοποίηση των ισομορφών αυτών υπό συνθήκες καταπόνησης παρά σε *de novo* παραγωγή διαφορετικών ισομορφών από τα καταπονημένα φυτά. Όπως είναι αναμενόμενο και η καταπόνηση αλατότητας αυξάνει τη συγκέντρωση της β-αμυλάσης καθώς και τη δραστηκότητά της στο κριθάρι και στον αραβόσιτο (Dreier *et al.*, 1995; Datta *et al.*, 1999). Αναφορικά με την επίδραση της θερμοκρασιακής καταπόνησης έχει δειχθεί ότι οδηγεί στην επαγωγή της μεταγραφής και/ή στην αύξηση της δραστηκότητας της β-αμυλάσης (Dreier *et al.*, 1995; Datta *et al.*, 1999; Thomashow, 2002; Jung *et al.*, 2003; Seki *et al.*, 2001). Αυτή η αύξηση συνδέθηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης της μαλτόζης (Karlan and Guy, 2004; Nielsen *et al.*, 1997). Η έκθεση π.χ. φυτών *Arabidopsis* που είχαν αναπτυχθεί στους 20°C, στους 40°C, οδήγησε σε πενταπλασιασμό των μεταγραφημάτων ΒΜΥ7/ΒΑΜ1 (που κωδικοποιούν ένα χλωροπλαστικό πεπτίδιο (Karlan and Guy, 2004; Sung, 2001). Η αύξηση της δραστηκότητας του ενζύμου ακολουθείται από αύξηση της συσσώρευσης μαλτόζης, ενώ η δραστηκότητα τόσο της α-γλυκοζιδάσης όσο και της ενδοαμυλάσης, δεν παρουσιάζουν σημαντική μεταβολή (Nielsen *et al.*, 1997). Δεδομένης της γρήγορης συσσώρευσης των μεταγραφημάτων του ενζύμου, προτάθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης μαλτόζης αλλά και της φρουκτόζης και της γλυκόζης σε θερμοκρασιακή καταπόνηση, πιθανόν να βοηθά στην προστασία της φωτοσυνθετικής αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στο στρώμα των χλωροπλαστών (Karlan and Guy, 2005; Karlan *et al.*, 2007). Αυξημένες ποσότητες της ολικής μαλτόζης των φύλλων στο *Arabidopsis thaliana* έχουν παρατηρηθεί επίσης κατά τη διάρκεια θερμοκρασιακών καταπονήσεων (Karlan and Guy, 2004).

#### 1.4.5 Ο ρόλος της β-αμυλάσης στη βιομηχανία

Η παρασκευή ζύθου αποτελεί μια από τις παλαιότερες εφαρμογές των ενζύμων. Τα χρησιμοποιούμενα υλικά είναι η βύνη ζυθοποιίας (κριθάρι το οποίο άρχισε να φυτρώνει), νερό συγκεκριμένης ποιότητας, ζύμη και φυτικά πρόσθετα γεύσεως και αρώματος, π.χ. λυκίσκος. Συχνά προστίθενται ένζυμα και φυτικά αμυλούχα πρόσθετα (γνωστά ως adjuncts), π.χ. κριθάρι, ρύζι, αραβόσιτος, βρώμη και σιτάλευρο. Χαρακτηριστικό της βύνης είναι ότι παρουσιάζει χαμηλή περιεκτικότητα

συνολικής πρωτεΐνης (περίπου 1.5% άζωτο), αλλά ικανοποιητική συγκέντρωση αμυλασών και πρωτεασών. Τα συστατικά του αρχικού καρυόψευς που θα αποτελέσουν την πηγή δημιουργίας υποστρωμάτων της ζύμης (π.χ. άμυλο και πρωτεΐνες), θα πρέπει να υδρολυθούν στην απαραίτητη αφομοιώσιμη μορφή. Αυτό επιτελείται ενζυμικά κατά το στάδιο σχηματισμού του βυνογλεύκου, οπότε και παράγονται αφομοιώσιμα μικρότερου μοριακού βάρους.

Κατά την παρασκευή της βύνης βιοσυντίθενται κυρίως αμυλάσες και πρωτεάσες που θα χρησιμεύσουν στο μεταβολισμό των αποθεμάτων αμύλου και πρωτεϊνών του ενδοσπερμίου. Στη διάρκεια του σχηματισμού του βυνογλεύκου, τα ένζυμα εμφανίζουν διαφορετικές εξειδικεύσεις ως προς το υπόστρωμα και την άριστη θερμοκρασία λειτουργίας τους. Συνήθως για τη β-αμυλάση η άριστη θερμοκρασία είναι οι 64°C (Eglinton *et al.*, 1998). Με την επιλογή της μεθόδου της ισοθερμικής έγχυσης, η διαφορετική επιλογή της σταθερής θερμοκρασίας οδηγεί σε διαφορετικό βαθμό αδρανοποίησης της λιγότερο ανθεκτικής β-αμυλάσης, άρα και σε διαφορετική συγκέντρωση ζυμώσιμων σακχάρων. Η συνδυασμένη δράση των α- και β-αμυλασών οδηγεί τελικά στη μετατροπή του αμύλου της βύνης προς μίγμα ζυμώσιμων σακχάρων (80% περίπου), το οποίο αποτελείται κυρίως από μαλτόζη και γλυκόζη. Η δυνατότητα ρυθμίσεως της συγκέντρωσης των ζυμώσιμων σακχάρων είναι δυνατόν να οδηγήσει σε ειδικές ποικιλίες ζύθου. Στη ζύμωση του βυνογλεύκου, η εξωτερική προσθήκη της β-αμυλάσης του μύκητα *Aspergillus oryzae* οδηγεί τόσο προς ζυμώσιμη μαλτόζη όσο και προς μη ζυμώσιμες δεξτρίνες, περιορισμένες στους γλυκοζιδικούς δεσμούς α-(1,6), απαραίτητες για τις οργανοληπτικές ιδιότητες του ζύθου (Κλώνης, 1997).



## **ΣΚΟΠΟΣ**

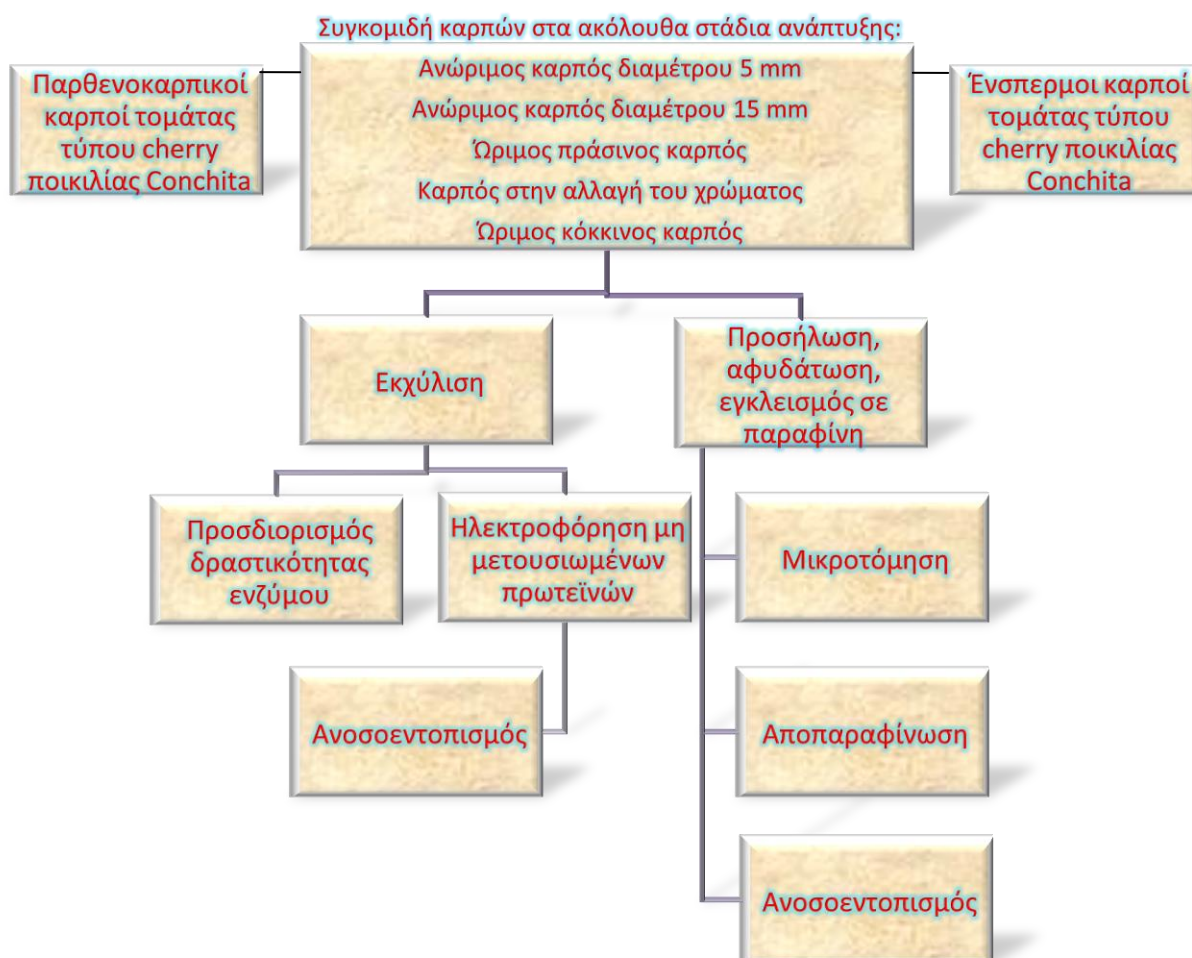
Σκοπός της παρούσας μελέτης αποτελεί η μελέτη της β-αμυλάσης, ενός ενζύμου με κυρίαρχο ρόλο την υδρόλυση του αμύλου στα φυτά. Η μελέτη του ενζύμου αποσκοπεί στον εντοπισμό πιθανών διαφορών μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας τύπου cherry, όσον αφορά τη δραστικότητα και τον εντοπισμό του.





## **2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

2.1. Οι διαδικασίες του πειράματος



Σχ. 1. Σχηματική παράσταση των διαδικασιών του πειράματος.

## 2.2 Το φυτικό υλικό

Για την παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν ένσπερμοι και άσπερμοι καρποί τομάτας τύπου cherry της ποικιλίας Conchita. Πρόκειται για πρώιμη ποικιλία που συγκομίζεται με ταξικαρπία. Κάθε ταξικαρπία μπορεί να φέρει 12 με 16 καρπούς (Εικ. 7). Οι καρποί της Conchita είναι λαμπεροί κόκκινοι με μέσο βάρος 20gr. Η ανάπτυξη και η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Εικ. 8). Η μεταφύτευση των νεαρών φυταρίων στο θερμοκήπιο πραγματοποιήθηκε το μήνα Νοέμβριο.

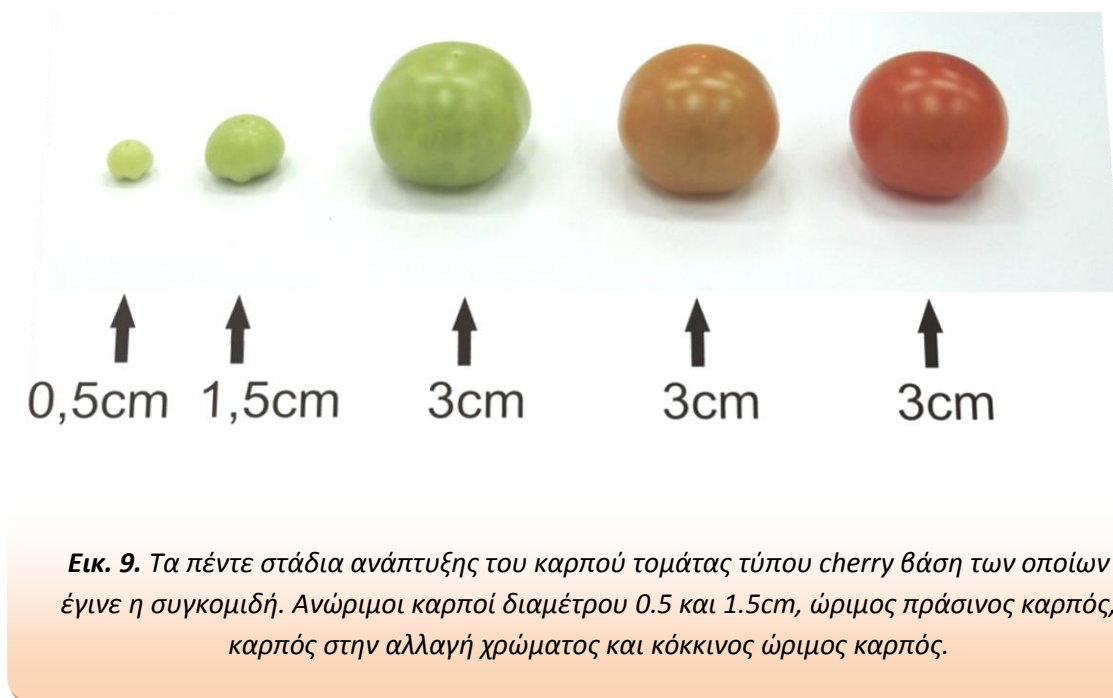
Η συγκομιδή των καρπών στα υπό μελέτη στάδια ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε από τη δεύτερη ταξικαρπία των φυτών. Για την παραλαβή των παρθενοκαρπικών καρπών πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες ενέργειες. Όταν ακόμη τα άνθη ήταν κλειστά και πριν αυτά καταστούν επιδεκτικά επικονίασης, με μία λαβίδα ανοίχτηκαν τα πέταλα και αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι ανθήρες παραμένοντας μόνο ο στύλος με το στίγμα. Ακολούθησε ψεκάσμος του στίγματος με κατάλληλη ορμόνη και το άνθος σημάνθηκε με ταμπελάκι όπου αναγραφόταν η ημερομηνία επέμβασης. Όταν οι καρποί έφτασαν στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης, συγκομίστηκαν. Η ορμόνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Ortomone με δραστική ουσία το β-ναφθόξυοξικό οξύ σε συγκέντρωση 50ppm. Οι άσπερμοι και ένσπερμοι καρποί συγκομίστηκαν σε πέντε διαφορετικά στάδια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξή τους: ανώριμοι καρποί διαμέτρου 0.5cm και 1.5cm, ώριμοι πράσινοι, καρποί στην αλλαγή του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι (Εικ. 9). Η δειγματοληψία έγινε την ενδέκατη πρωινή ώρα. Η μεταφορά τους από το θερμοκήπιο στο εργαστήριο γινόταν σε δοχείο με θρυμματισμένο πάγο. Αμέσως μετά τη συγκομιδή τους, ένα μέρος των καρπών χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των τομών για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου, οι δε υπόλοιποι αποθηκεύτηκαν σε κατάλληλο ψυκτικό χώρο στους -80°C ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα για την εκχύλιση των πρωτεϊνών και τη μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου.



**Εικ. 7.** Ταξικαρπία τομάτας cherry ποικιλίας Conchita.



**Εικ. 8.** Η καλλιέργεια στο θερμοκήπιο του Γ.Π.Α.



### 2.3 Η ανοσοβιοχημική μελέτη-Επεξεργασία των ιστών

Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν τομές από ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας τύπου cherry στα εξής στάδια ανάπτυξης: ανώριμος καρπός διαμέτρου 0.5cm και 1.5cm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή του χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποστεί την παρακάτω επεξεργασία:

#### Προσήλωση

Οι τομές από τα πέντε στάδια των κανονικών και παρθενοκαρπικών καρπών προσηλώθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα που περιείχε 4% παραφολμαλδεΐδη και 0.5% γλουταραλδεΐδη για χρονικό διάστημα 48h σε θερμοκρασία δωματίου.

#### Αφυδάτωση

Ακολούθως, οι τομές αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων αιθανόλης (50%, 70%, 80%, 90%, 95% και 100%) με σκοπό την απομάκρυνση του

προσηλωτικού διαλύματος. Ο χρόνος εμφάνισης των δειγμάτων στα παραπάνω διαλύματα ήταν για μία ώρα το καθένα εκτός από την καθαρή αλκοόλη όπου και παρέμειναν για 3h.

### **Διαφανοποίηση**

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

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

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

### **Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη**

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

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

### **Μικροτομήσεις**

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

### Αποπαραφίνωση

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

- 100% ξυλένιο για 10 λεπτά (X2)
- 75% ξυλένιο – 25% αλκοόλη για 10 λεπτά
- 50% ξυλένιο – 50% αλκοόλη για 10 λεπτά
- 25% ξυλένιο – 75% αλκοόλη για 10 λεπτά και
- 100% αλκοόλη για 10 λεπτά.

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

### 2.4 Η εκχύλιση του ενζύμου

Μετά την παραλαβή των δειγμάτων για τα πέντε στάδια των ένσπερμων και τα αντίστοιχα πέντε των άσπερμων καρπών ακολούθησε η εκχύλιση των πρωτεϊνών και οι μετρήσεις των ολικών τους πρωτεϊνών.

Για την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών τα δείγματα αφού τεμαχίστηκαν, τοποθετήθηκαν σε γουδί μαζί με υγρό άζωτο. Ακολούθως, τα δείγματα λειοτριβήθηκαν. Για κάθε στάδιο αναμιγνυόταν συγκεκριμένη ποσότητα (σε νωπό βάρος) καρπού με αντίστοιχο όγκο μέσου εκχύλισης (αναλογία 1:1). Η όλη διαδικασία διαρκούσε έως ότου προκύψουν ομοιογενή εκχυλίσματα και τα εκχυλίσματα τοποθετούνταν μέσα σε erpendorf στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15000g για 15min και 4°C. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων με τη μέθοδο Bearden (1978). Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα χωρίσθηκαν σε δύο μέρη. Στο ένα μέρος προστέθηκαν λίγοι κόκκοι κυανού της βρωμοφαινόλης για την ηλεκτροφόρηση. Το άλλο μέρος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της β-αμυλάσης. Το διάλυμα εκχύλισης των πρωτεϊνών ήταν αυτό που προτείνεται από τους Stenzel *et al.* (2003).



**Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών**

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

**2.5 Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων**

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

**Διάλυμα Bearden**

- i. Ζύγιση 10mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva 17524).
- ii. Το παραπάνω αραιώνεται σε 40ml 85% φωσφορικού οξέος.
- iii. Προσθήκη 200ml αποσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O).
- iv. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται την επόμενη ημέρα.

Η πρότυπη καμπύλη εξάρτησης της απορρόφησης του δείγματος από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών (BSA) σχεδιάστηκε για ποσότητες BSA μεταξύ 5 και 50μg. Μετά την εκχύλιση των πρωτεϊνών και τη φυγοκέντρηση ετοιμάσθηκαν 10 σωλήνες για κάθε δείγμα (5mm και 15mm ανώριμου, ώριμου πράσινου, αλλαγής χρώματος και ώριμου κόκκινου, για ένσπερμους και άσπερμους καρπούς) που περιείχαν 1.450ml dH<sub>2</sub>O, 50μl εκχυλίσματος και 1.5ml διαλύματος Bearden. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένας σωλήνας που περιείχε 1.5ml dH<sub>2</sub>O και 1.5ml διαλύματος Bearden. Ακολουθώς έγινε φωτομέτρηση στα 595nm. Μετά τις επαναληπτικές μετρήσεις για κάθε δείγμα υπολογίζεται η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης βάσει της πρότυπης καμπύλης.

## 2.6 Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας 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-νιτροφαινυλομαλτοπενταοζιδίου από τη 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 100ml ενζυμικού εκχυλίσματος (17 έως 22μg ολικών πρωτεϊνών κατά Bearden) και 100ml αντιδραστηρίου (Betamyl), ενώ για τα υπόλοιπα δείγματα 100ml ενζυμικού εκχυλίσματος και 100ml αντιδραστηρίου (Betamyl). Μετά από 10min σε υδατόλουτρο 40°C προστίθεντο 1.5ml 1% Trisma base για την περάτωση της αντίδρασης. Η μέτρηση της δραστηριότητας της β-αμυλάσης έγινε στα 410nm και αφορούσε την απελευθέρωση της p-νιτροφαινόλης. Όλες οι φωτομετρήσεις έγιναν με φασματοφωτόμετρο UV-160A (Shimadzu).

## 2.7 Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% ολικής συγκέντρωσης ακρυλαμίδιου με 2.7% bis-ακρυλαμίδιο, σε ασυνεχές σύστημα του οποίου τα συστατικά αναφέρονται παρακάτω. Ακολούθως φορτώθηκε με εκχύλισμα πρωτεϊνών που αντιστοιχούσε περίπου σε 40μg πρωτεΐνης από κάθε ιστό. Η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 70V για μία ώρα, δηλαδή όσο χρόνο χρειάστηκε η χρωστική να περάσει στην πηκτή ανάλυσης και 120V για τη συνέχεια μέχρι το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας, η πηκτή τοποθετήθηκε στα αντίστοιχα διαλύματα επώασης. Στη συνέχεια, αφέθηκε για λίγες ώρες μέχρι την εμφάνιση σήματος. Ακολούθως, οι πηκτές φωτογραφήθηκαν.

**A. Πηκτή ανάλυσης (Resolving Gel) 8%T, 2.7%C**

Μητρικό διάλυμα Ακρυλαμιδίου, Bis-Ακρυλαμιδίου (30%, 2.7%)	2.87ml
Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης	2.50ml
Αποσταγμένο νερό	4.45ml
10% Υπερθειικό Αμμώνιο	50μl
TEMED	10μl

**Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης**

Tris-HCl pH 8.9	378mM
-----------------	-------

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

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

**Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης**

Tris-HCl pH 6.8	63mM
-----------------	------

**Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών**

Tris	25mM
Γλυκίνη	192mM

**Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

- ❖ Ενυδάτωση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με αποσταγμένο νερό.
- ❖ Αντικατάσταση του αποσταγμένου νερού με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και επώασή του συμπεριλαμβανομένης της πηκτής για 10min.
- ❖ Τοποθέτηση 2 φύλλων χαρτιού 3MM που έχει κορεσθεί με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Αφαίρεση τυχόν φυσαλίδων αέρα με χρήση πιπέτας.
- ❖ Τοποθέτηση των φύλλων νιτροκυτταρίνης και της πηκτής αντίστοιχα.
- ❖ Πάνω από αυτά τοποθετούνται 2 φύλλα χαρτιού 3MM και αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες αέρα.
- ❖ Μεταφορά των πρωτεϊνών στα 200mA για 45min, υπό ψύξη.
- ❖ Μετά την ηλεκτροφόρηση σημειώνεται το φύλλο νιτροκυτταρίνης που είχε τοποθετηθεί προς την κάθοδο και φυλάσσεται μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.

**Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων**

- ❖ Κόβονται ταινίες νιτροκυτταρίνης από το φύλλο της νιτροκυτταρίνης αποφεύγοντας την επαφή με τα χέρια.
- ❖ Η λωρίδα αφήνεται να επιπλεύσει σε TBST (0.01% Tween 20) για 5min με τέτοιο τρόπο ώστε να μην παγιδευτεί αέρας.
- ❖ Δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της νιτροκυτταρίνης σε 1% ζελατίνης (BDH).
- ❖ Επώαση της ταινίας με πρωτογενές αντίσωμα (Rabbit anti-sweet potato  $\alpha$ -amylase polyclonal, Abcam), με αραιώση 1:1000. Οι αραιώσεις γίνονται σε TBST 1% ζελατίνης. Επώαση όλη τη νύχτα σε 25°C.
- ❖ Ξέπλυμα των ταινιών με TBST 1% ζελατίνης.
- ❖ Απομάκρυνση της περίσσειας του πρωτογενούς αντισώματος με TBST 1% ζελατίνης, 3φορές επί 5min.
- ❖ Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος mouse anti-rabbit IgG (Fc) AP conjugated σε αραιώση 1:5000 για 1h και 30min.
- ❖ Απομάκρυνση της περίσσειας του δευτερογενούς αντισώματος με TBST 1% ζελατίνης, 3φορές επί 5min.

- ❖ Ανίχνευση της β-αμυλάσης με την επώαση των ταινιών σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης για 3min παρουσία χρωμοφόρου.
- ❖ Αφυδάτωση και φύλαξη της νιτροκυτταρίνης μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.
- ❖ Φωτογράφιση της νιτροκυτταρίνης μέσω σάρωσής τους με επίπεδο σαρωτή.

#### **Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου στις μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης**

- ❖ Δέσμευση των μη ενεργών θέσεων των τομών για 1h σε 1% ζελατίνη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- ❖ Επώαση των τομών με διάλυμα αντισώματος σε αραιώση 1:1000 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 mouse anti-rabbit IgG (Fc) AP conjugated σε αραιώση 1:5000 για 1h και 30min.
- ❖ Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBST 3 φορές επί 5min για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος.
- ❖ Εντοπισμός της β-αμυλάσης μέσω της αντίδρασης της αλκαλικής φωσφατάσης με νιτρομπλέ του τετραζολίου (NBT) και 5βρωμο-4χλωρο-ινδολυλοφωσφορικό (NBT/BCIP).
- ❖ Αφυδάτωση των τομών σε σειρά EtOH.
- ❖ Εφαρμογή DPX.
- ❖ Σε κάθε περίπτωση, η χρώση του μάρτυρα έγινε με Orange G σε απόλυτη αλκοόλη.

#### **2.8 Εντοπισμός του αμύλου σε νωπές τομές καρπών**

Το άμυλο σε νωπές τομές καρπών εντοπίστηκε μετά από χρώση με διάλυμα 3% KI και 1.3% I, σύμφωνα με τον Jensen (1962).

## 2.9 Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης στις τομές

Μετά την αποπαραφίνωση ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- ❖ Οι τομές καλύπτονται με διάλυμα δεσμεύσεως μη ειδικών θέσεων και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h.
- ❖ Ακολουθεί επώαση των τομών σε 1:750 αραιώση του αντισώματος, σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST με 1% BSA (πρωτεΐνη ορού μόσχου), και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για τουλάχιστον 12h σε θερμοκρασία 4°C.
- ❖ Το μη δεσμευμένο αντίσωμα ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα TBST για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.
- ❖ Οι τομές επωάζονται σε διάλυμα TBST με 1% BSA, που περιέχει κατάλληλη αραιώση (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 Buffer 3 για 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 70%, 90%, 95% και δύο φορές σε 100% για ένα λεπτό σε κάθε διάλυμα.
- ❖ Τέλος, αφού στεγνώσουν καλά οι τομές, καλύπτονται με DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας, ώστε να μονιμοποιηθούν.

**Διαλύματα****Ρυθμιστικό διάλυμα TBST**

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

**Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης**

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

**Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης αλκαλικής φωσφατάσης-Buffer3**

Tris-HCl pH 9.5	10mM
NaCl	100mM
MgCl <sub>2</sub>	50mM

**Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών**

Tris	24mM
Γλυκίνη	192mM
Μεθανόλη	20%

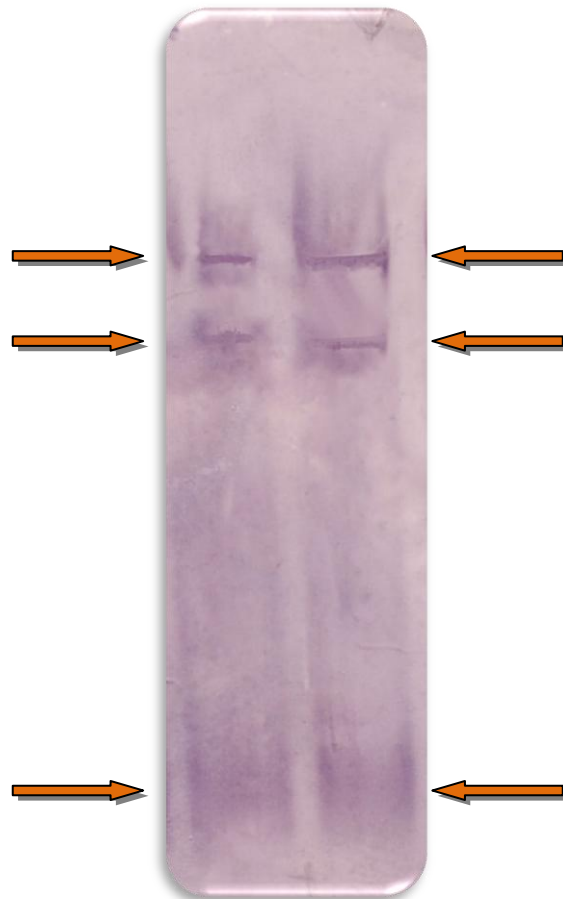


### **3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**



### 3.1 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων

Για τον ανοσοεντοπισμό της β-αμυλάσης χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που είχαν παραχθεί εναντίον της β-αμυλάσης της γλυκοπατάτας (*Ipomoea batatas* L.) (Abcam, Rabbit anti-sweet potato b-amylase polyclonal). Για το λόγο αυτό θεωρήσαμε σκόπιμο να εξεταστεί η καταλληλότητα των αντισωμάτων. Τα αποτελέσματα της ανοσοανίχνευσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καρπού τομάτας cherry στο στάδιο της αλλαγής χρώματος μετά την ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης φαίνονται στην *Εικ. 10*. Τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα κατά της β-αμυλάσης αναγνώρισαν τρία τουλάχιστον πεπτίδια (βέλη).



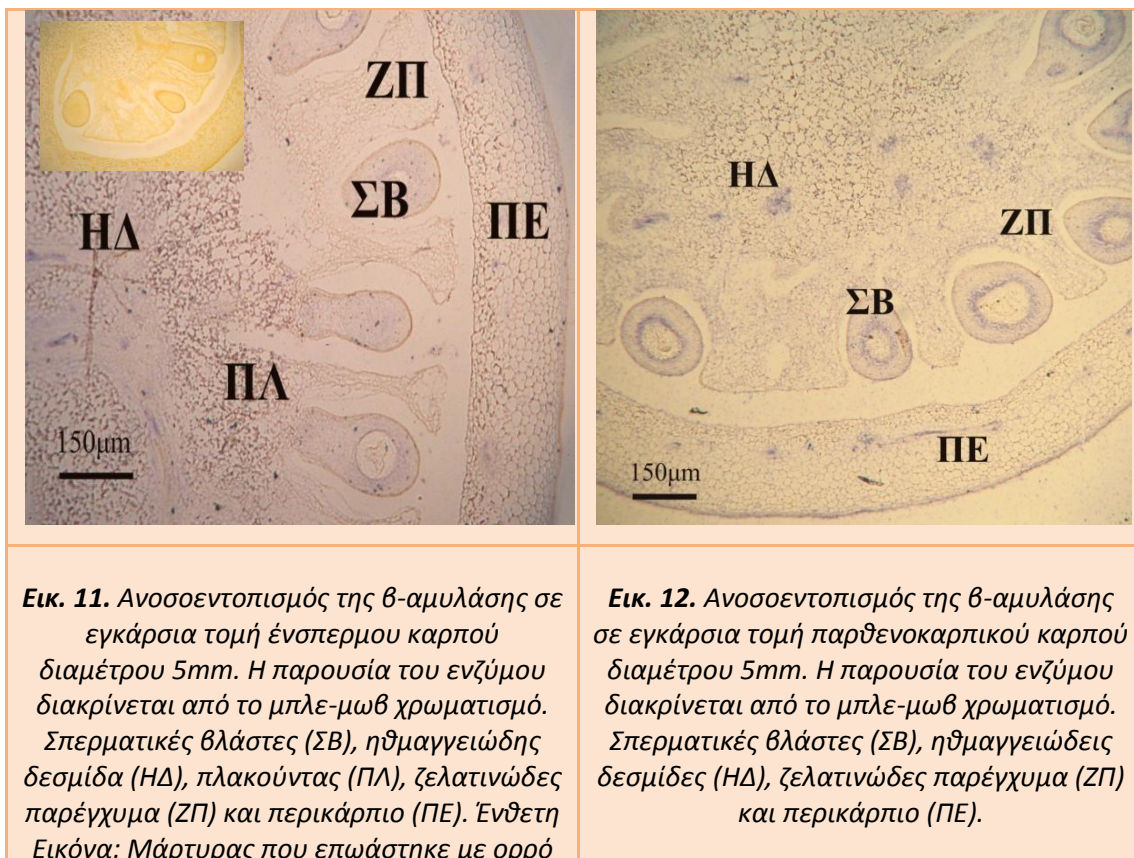
**Εικ. 10.** Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτρομεταφορά τους από πηκτή πολυακρυλαμίδης. Με βέλη σημειώνονται οι τρεις ζώνες που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα.

### 3.2 Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης στους καρπούς

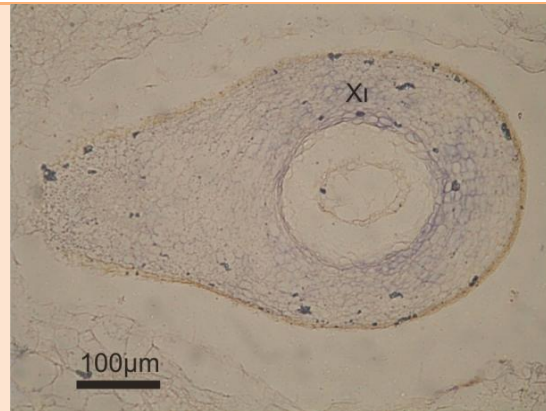
Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης δείχνει τους ιστούς στους οποίους κατά τη στιγμή της προσήλωσης υπάρχει το ένζυμο καθώς και τη σχετική αφθονία του. Η παρουσία μωβ-μπλε χρωματισμού σηματοδοτεί την παρουσία της β-αμυλάσης στους φυτικούς ιστούς.

#### 3.2.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm

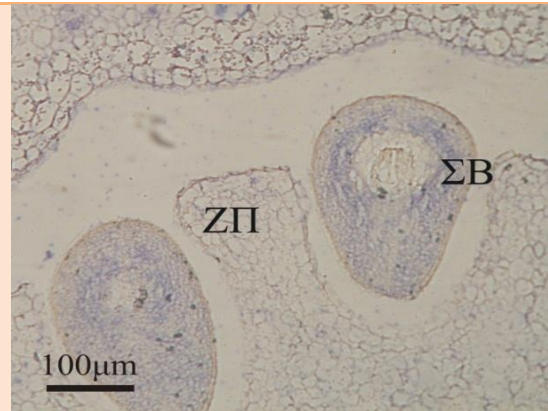
Σε εγκάρσιες τομές στο στάδιο των 5mm του ένσπερμου (Εικ. 11) και παρθενοκαρπικού (Εικ. 12) ανώριμου καρπού, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 13, 14, 15 και 16). Επιπλέον, η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται στους αμυλόκοκκους (Εικ. 17) και στο εσωτερικό φλοιώδες παρέγχυμα. Λιγότερο έντονο είναι το σήμα στην περιοχή του πλακούντα, του ζελατινώδους παρεγχύματος και του περικάρπιου.



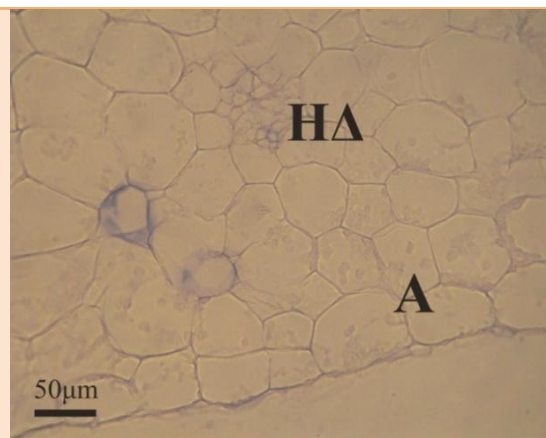
κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης.



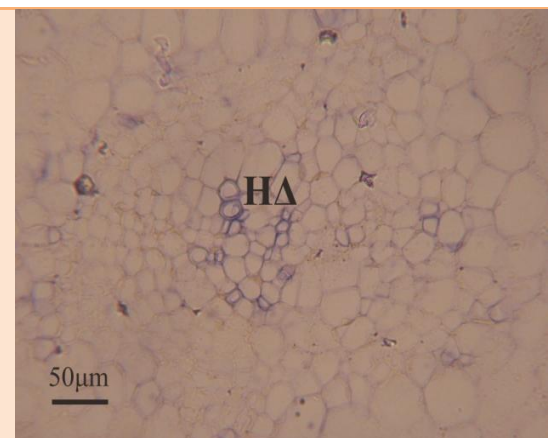
**Εικ. 13.** Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε λεπτομέρεια σπερματικής βλάστης ένσπερμου ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου παρουσιάζεται πιο έντονη στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα της σπερματικής βλάστης (Χι).



**Εικ. 14.** Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε λεπτομέρεια σπερματικής βλάστης παρθενοκαρπικού ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου παρουσιάζεται πιο έντονη στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ) και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ).

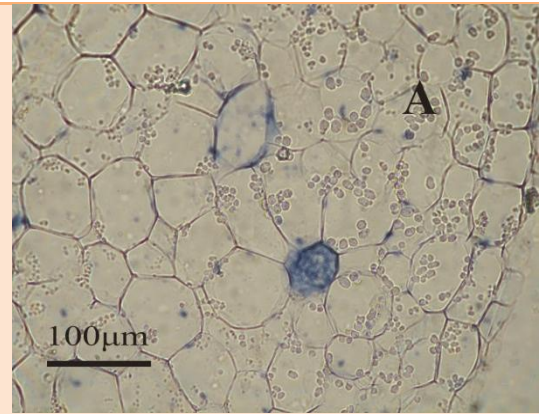


**Εικ. 15.** Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε ένσπερμο ανώριμο καρπό διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται στους αμυλόκοκκους (Α) και στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ) από το μπλε-μωβ χρωματισμό.



**Εικ. 16.** Λεπτομέρεια ηθμαγγειώδους δεσμίδας (ΗΔ) από παρθενοκαρπικό καρπό στο στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό στα αναπτυσσόμενα αγγεία του ξύλου και στον ηθμό.

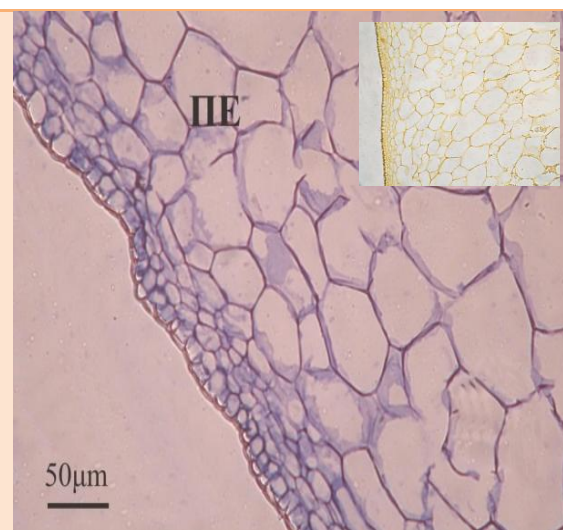
**Εικ. 17.** Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται στους αμυλόκοκκους (Α) από το μπλε-μωβ χρωματισμό.

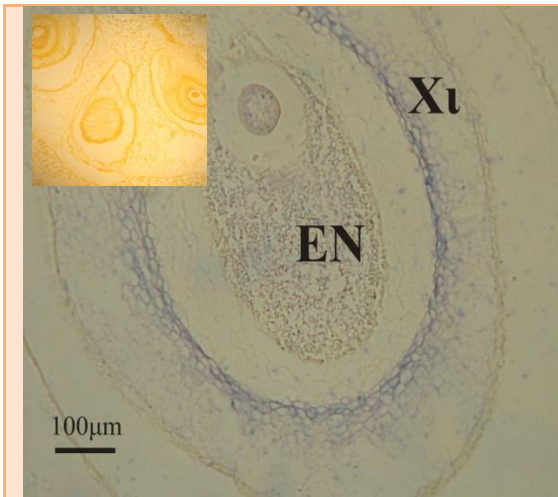


### 3.2.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm

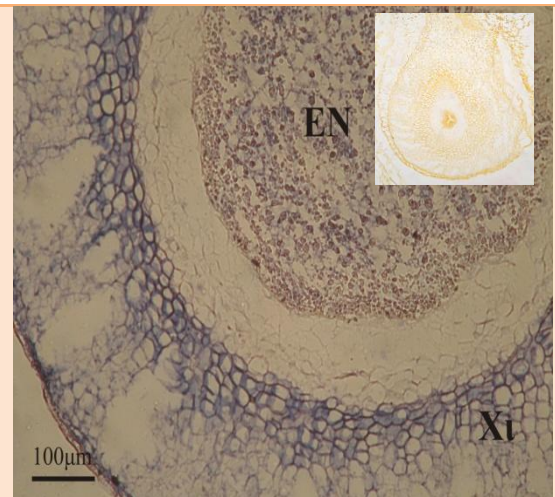
Στο στάδιο του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στους εσωτερικούς χιτώνες των σπερματικών βλαστών (Εικ. 19 και 20), στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 21) και στους αμυλόκοκκους (Εικ. 21 και 22). Ασθενέστερο ήταν το σήμα στα κύτταρα του εσωτερικού περικαρπίου σε σχέση με τις εξωτερικές στοιβάδες (Εικ. 18), και του ενδοσπερμίου σπερματικής βλάστης ένσπερμου καρπού σε σχέση με τον παρθενοκαρπικό (Εικ. 19 και 20).

**Εικ. 18.** Λεπτομέρεια περικαρπίου παρθενοκαρπικού ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm. Η δράση του ενζύμου εντοπίζεται κυρίως στην εξωτερική στοιβάδα του περικαρπίου (ΠΕ). Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

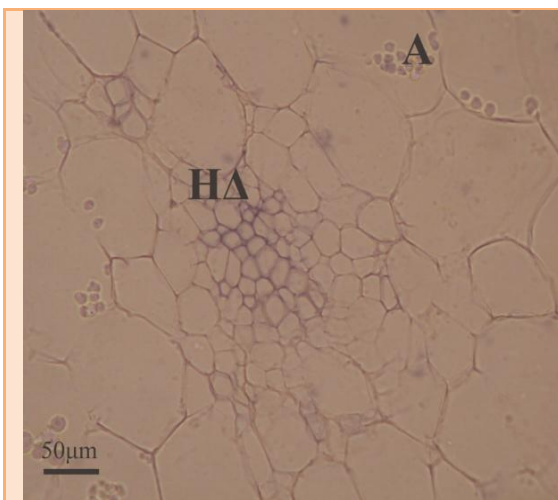




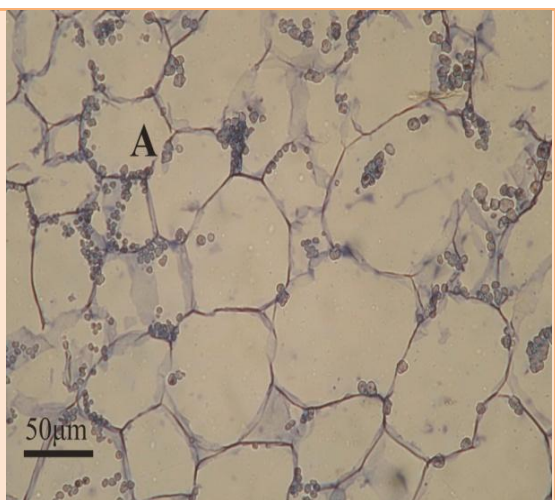
**Εικ. 19.** Σπερματική βλάστη ένσπερμου ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm. Διακρίνεται έντονη η παρουσία του ενζύμου στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα (Χι) της σπερματικής βλάστης και λιγότερο στο ενδοσπέρμιο (EN). Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.



**Εικ. 20.** Σπερματική βλάστη παρθενοκαρπικού ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm. Διακρίνεται έντονη η παρουσία του ενζύμου στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα (Χι) της σπερματικής βλάστης καθώς και στο ενδοσπέρμιο (EN). Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.



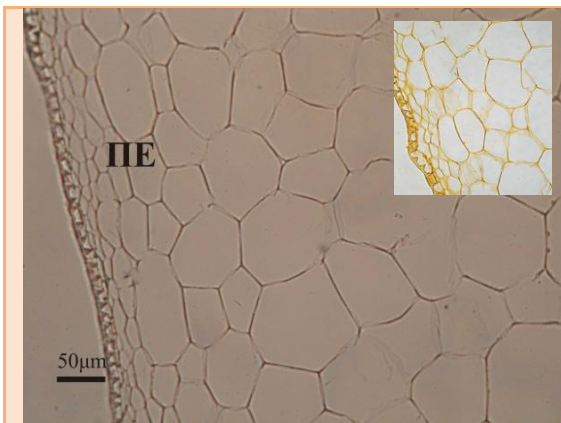
**Εικ. 21.** Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε ένσπερμο ανώριμο καρπό διαμέτρου 15mm. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται στους αμυλόκοκκους (A) και την ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ) από το μπλε-μωβ χρωματισμό.



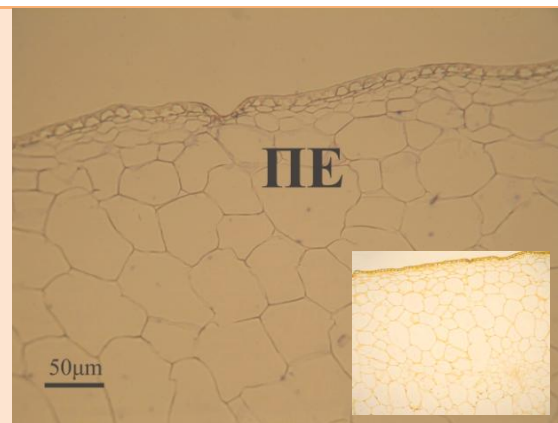
**Εικ. 22.** Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται στους αμυλόκοκκους (A) από το μπλε-μωβ χρωματισμό.

### 3.2.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού

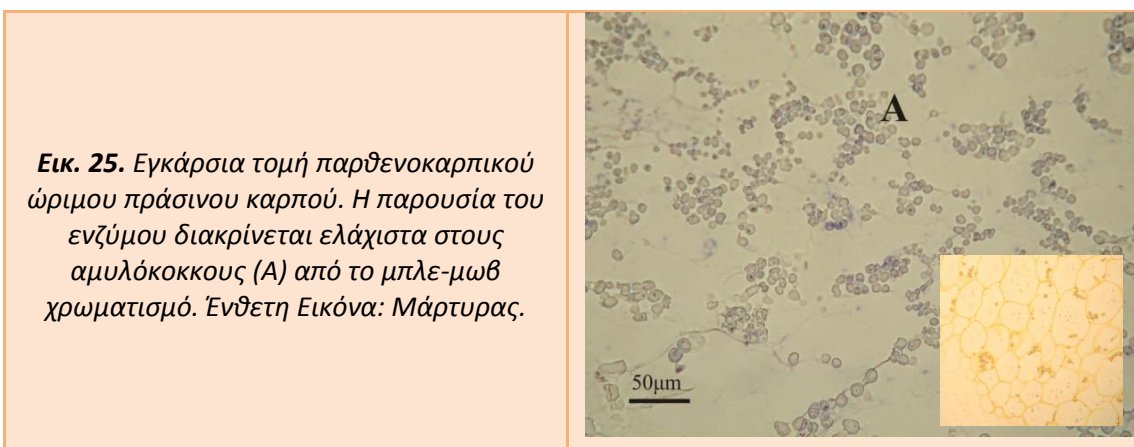
Κατά το στάδιο του ώριμου ένσπερμου πράσινου καρπού, η β-αμυλάση εντοπίστηκε κυρίως στους ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου (Εικ. 26) καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 28). Στον παρθενοκαρπικό ώριμο πράσινο καρπό, η παρουσία του ενζύμου εντοπίστηκε στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στους αμυλόκοκκους (Εικ. 25 και 29) καθώς και στα κύτταρα του χιτώνα της σπερματικής βλάστης (Εικ. 27). Και στις δύο περιπτώσεις, η β-αμυλάση δεν εντοπίστηκε στο περικάρπιο (Εικ. 23 και 24).



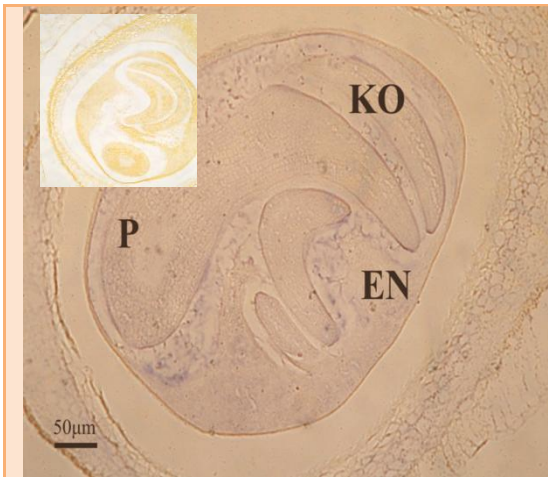
**Εικ. 23.** Λεπτομέρεια περικαρπίου (ΠΕ) από ένσπερμο ώριμο πράσινο καρπό. Δε διακρίνεται η παρουσία του ενζύμου. Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.



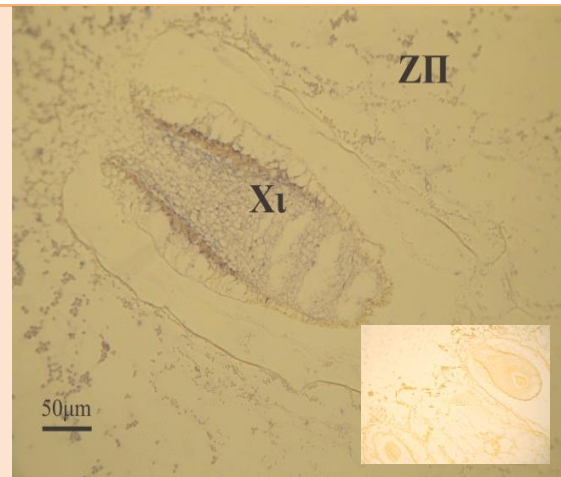
**Εικ. 24.** Λεπτομέρεια περικαρπίου (ΠΕ) από παρθενοκαρπικό ώριμο πράσινο καρπό. Δε διακρίνεται η παρουσία του ενζύμου. Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.



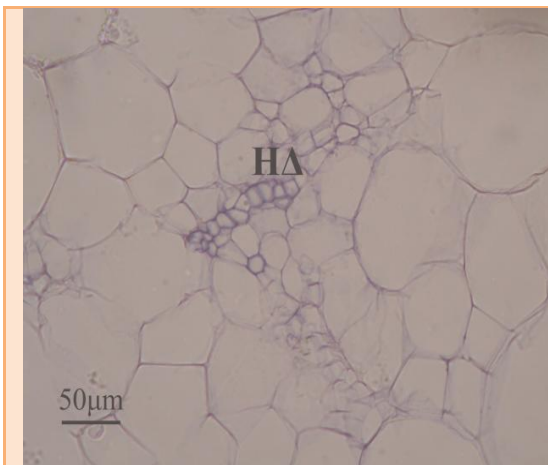
**Εικ. 25.** Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού ώριμου πράσινου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται ελάχιστα στους αμυλόκοκκους (Α) από το μπλε-μωβ χρωματισμό. Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.



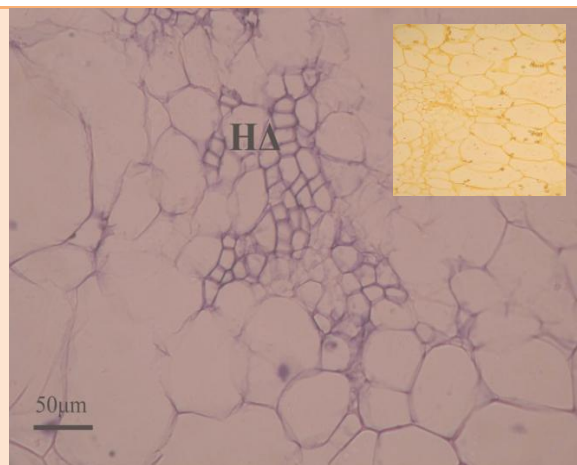
**Εικ. 26.** Λεπτομέρεια του αναπτυσσόμενου εμβρύου σε ένσπερμο ώριμο πράσινο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου είναι αισθητή στην περιοχή του ενδοσπερμίου (ΕΝ), στη ρίζα (Ρ) και στις κοτύλες (ΚΟ).  
Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.



**Εικ. 27.** Σπερματική βλάστη παρθενοκαρπικού ώριμου πράσινου καρπού. Ο εντοπισμός της β-αμυλάσης εστιάζεται στα κύτταρα του χιτώνα (Χι) και δε διακρίνεται σχεδόν καθόλου στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ). Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.



**Εικ. 28.** Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή ηθμαγγειώδους δεσμίδας (ΗΔ) από ένσπερμο ώριμο πράσινο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.



**Εικ. 29.** Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή ηθμαγγειώδους δεσμίδας (ΗΔ) από παρθενοκαρπικό ώριμο πράσινο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.  
Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.

### 3.2.4 Στάδιο αλλαγής χρώματος

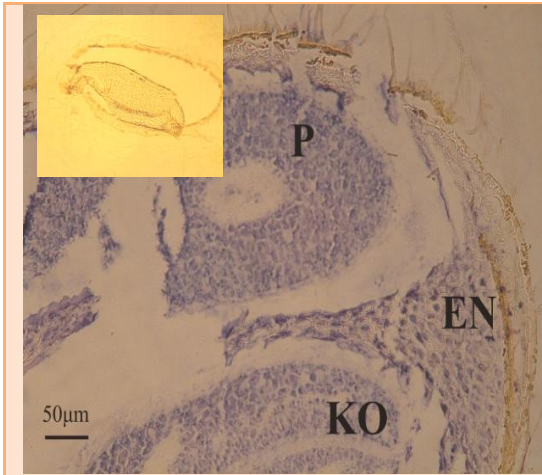
Στον ένσπερμο καρπό κατά το στάδιο της αλλαγής χρώματος, η β-αμυλάση εντοπίστηκε κυρίως στην εξωτερική στοιβάδα του περικαρπίου (Εικ. 30), στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου σπέρματος (Εικ. 32) καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 34). Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, παρατηρείται όμοια εικόνα για το περικάρπιο και τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 31 και 35) και επίσης είναι εμφανής η παρουσία της πρωτεΐνης στα κύτταρα του χιτώνα της σπερματικής βλάστης (Εικ. 33).



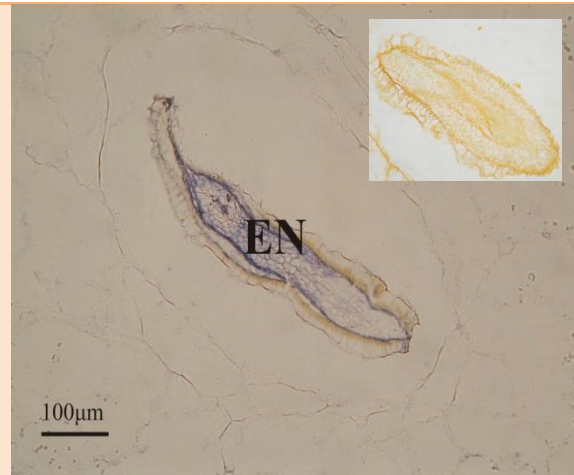
**Εικ. 30.** Λεπτομέρεια περικαρπίου (ΠΕ) ένσπερμου καρπού στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Η δράση του ενζύμου εντοπίζεται κυρίως στην εξωτερική στοιβάδα του περικαρπίου (ΠΕ). Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

**Εικ. 31.** Λεπτομέρεια περικαρπίου παρθενοκαρπικού καρπού στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Η δράση του ενζύμου εντοπίζεται κυρίως στην εξωτερική στοιβάδα του περικαρπίου (ΠΕ) και στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ). Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.

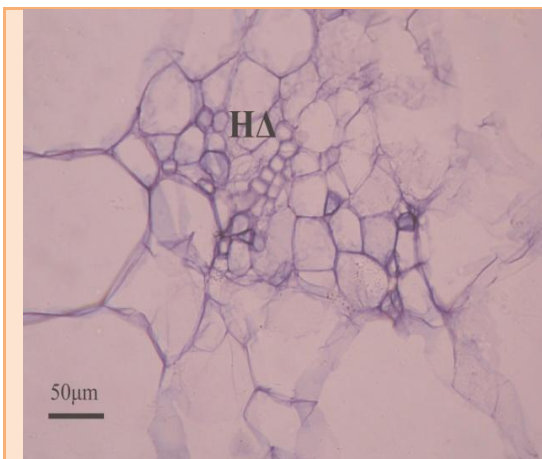




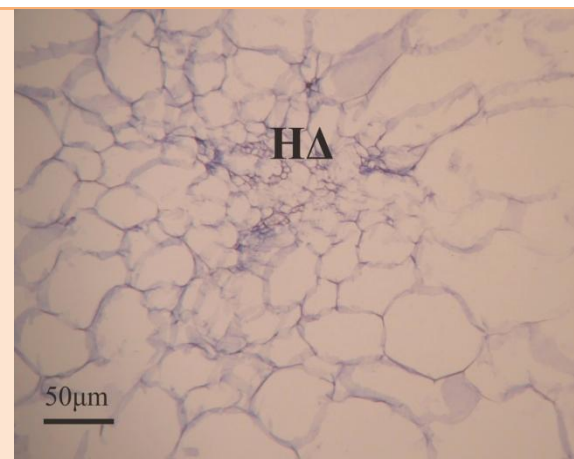
**Εικ. 32.** Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της β-αμυλάσης σε ένσπερμο καρπό στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου είναι έντονη στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου εμβρύου και ιδιαίτερα στη ρίζα (P), στις κοτύλες (KO) και στο ενδοσπέρμιο (EN), ενώ δεν εντοπίζεται στον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας. Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.



**Εικ. 33.** Σπερματική βλάστη παρθενοκαρπικού καρπού στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Ο εντοπισμός της β-αμυλάσης εστιάζεται στα κύτταρα του χιτώνα και διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.



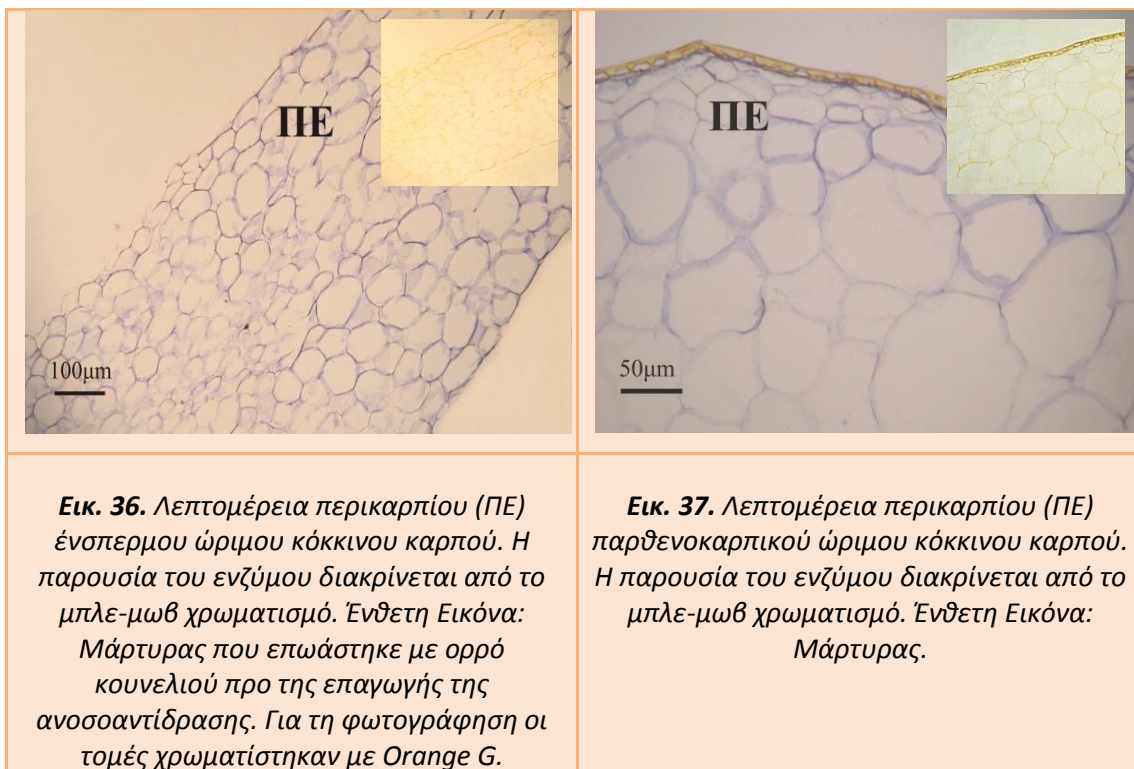
**Εικ. 34.** Ηθμαγγειώδης δεσμίδα (HD) από ένσπερμο καρπό στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.

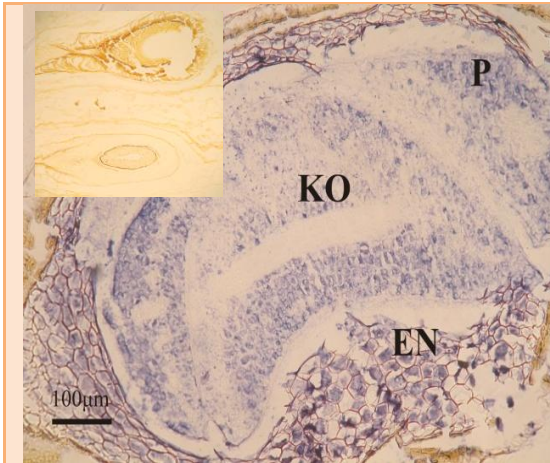


**Εικ. 35.** Λεπτομέρεια ηθμαγγειώδους δεσμίδας (HD) από παρθενοκαρπικό καρπό στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.

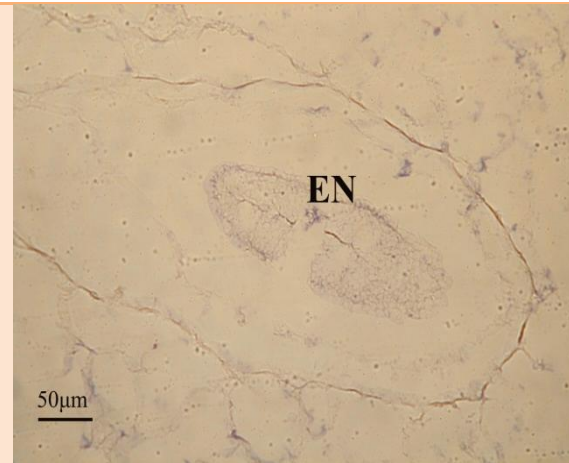
### 3.2.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού

Στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού, η παρουσία του ενζύμου ήταν έντονη στο εσωτερικό των αναπτυσσόμενων σπερμάτων, καθώς επίσης και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 38 και 40). Στον παρθενοκαρπικό καρπό το σήμα ήταν ασθενέστερο στη σπερματική βλάστη σε σχέση με τον ένσπερμο καρπό (Εικ. 39) και εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 41). Και στις δύο περιπτώσεις, παρατηρήθηκε ένα γενικό σήμα ανίχνευσης του ενζύμου στο περικάρπιο (Εικ. 36 και 37).

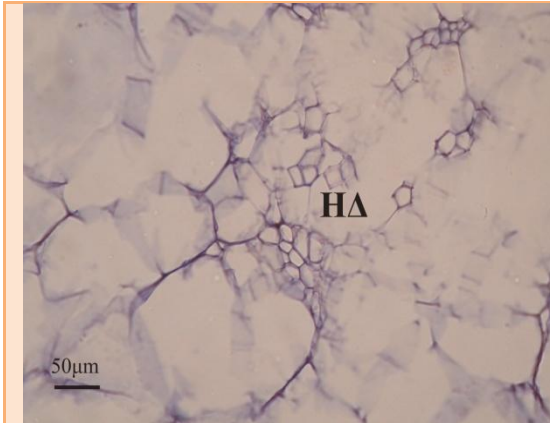




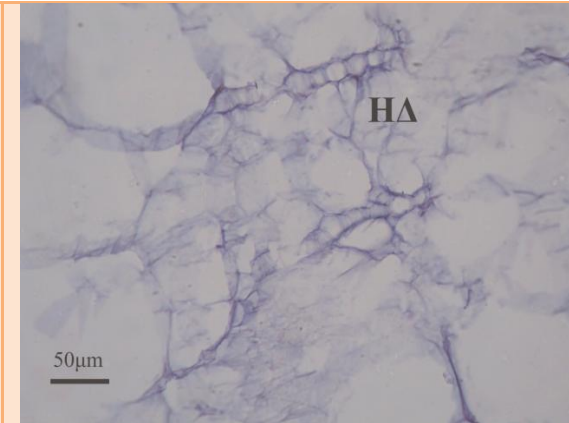
**Εικ. 38.** Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της β-αμυλάσης από ένσπερμο ώριμο κόκκινο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου είναι έντονη στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου εμβρύου και ιδιαίτερα στη ρίζα (P), στις κοτύλες (KO) και στο ενδοσπέρμιο (EN), ενώ δεν εντοπίζεται στον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας. Ένθετη Εικόνα: Μάρτυρας.



**Εικ. 39.** Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού ώριμου κόκκινου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου στο ενδοσπέρμιο (EN) διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.



**Εικ. 40.** Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή ηθμαγγειώδους δεσμίδας (ΗΔ) από ένσπερμο κόκκινο ώριμο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.

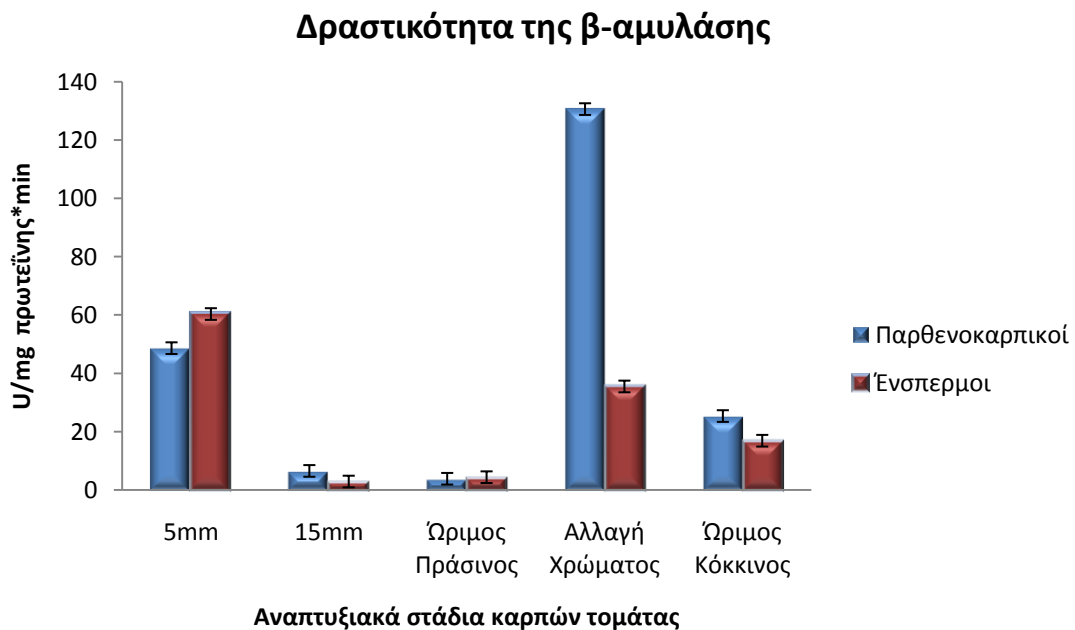


**Εικ. 41.** Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της β-αμυλάσης σε εγκάρσια τομή ηθμαγγειώδους δεσμίδας (ΗΔ) από παρθενοκαρπικό κόκκινο ώριμο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.

### 3.3 Ο προσδιορισμός της *in vitro* δραστικότητας της β-αμυλάσης

Η δραστικότητα της β-αμυλάσης προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα πέντε υπό εξέταση στάδια ανάπτυξης (ανώριμος καρπός διαμέτρου 5mm και 15mm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός) τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς (Σχ. 2).

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φανερώνουν πως η δραστικότητα του ενζύμου είναι πιο έντονη κυρίως στους παρθενοκαρπικούς καρπούς σε σχέση με τους κανονικούς. Πιο συγκεκριμένα, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η δραστικότητα του ενζύμου είναι υψηλότερη κατά το στάδιο του ανώριμου καρπού στα 15mm, στην αλλαγή του χρώματος και στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού. Αντίθετα, στους ένσπερμους καρπούς η δραστικότητα του ενζύμου ήταν πιο έντονη στα 5mm του ανώριμου και στον ώριμο πράσινο καρπό, σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς.



**Σχ. 2.** Δραστικότητα της β-αμυλάσης σε πέντε στάδια ανάπτυξης (ανώριμος καρπός διαμέτρου 5mm και 15mm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός) παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας.

## 3.4 Εντοπισμός του αμύλου στους καρπούς

 <p>0.5cm</p>	<p><b>Εικ. 42.</b> Στάδιο ανώριμου ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Το άμυλο εντοπίζεται στις εξωτερικές στρώσεις του πλακούντα και στο εσωτερικό περικάρπιο.</p>
 <p>0.15cm</p>	<p><b>Εικ. 43.</b> Στάδιο ανώριμου ένσπερμου καρπού διαμέτρου 15mm. Το άμυλο εντοπίζεται σε όλο τον πλακούντα και στο εσωτερικό περικάρπιο.</p>
 <p>3cm</p>	<p><b>Εικ. 44.</b> Στάδιο ώριμου πράσινου ένσπερμου καρπού. Το άμυλο εντοπίζεται και στο ζελατινώδες παρέγχυμα.</p>
 <p>3cm</p>	<p><b>Εικ. 45.</b> Στάδιο αλλαγής χρώματος ένσπερμου καρπού. Το μεγαλύτερο μέρος του αμύλου έχει υδρολυθεί. Παραμένει όμως στις εξωτερικές στρώσεις του πλακούντα.</p>
 <p>3cm</p>	<p><b>Εικ. 46.</b> Στάδιο ώριμου κόκκινου ένσπερμου καρπού. Το άμυλο εντοπίζεται σε ελάχιστες συγκεντρώσεις στις περιοχές όπου εκφύονται οι σπερματικές βλάστες.</p>



## **4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

#### 4.1 Ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης

Ο ανοσοεντοπισμός της β-αμυλάσης σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς, πραγματοποιήθηκε σε πέντε στάδια κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Τα στάδια που επιλέχθηκαν ήταν νεαροί πράσινοι καρποί διαμέτρου 5mm και 15mm, ώριμοι πράσινοι καρποί, καρποί στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι καρποί.

Η β-αμυλάση εντοπίστηκε έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες σε όλα τα υπό μελέτη στάδια. Στους ένσπερμους καρπούς, η β-αμυλάση εντοπίστηκε έντονα στα όργανα του εμβρύου και στο ενδοσπέρμιο. Από τον εντοπισμό του ενζύμου, είναι δυνατόν να λεχθεί ότι υδρόλυση του αμύλου γίνεται τόσο στους φωτοσυνθετικούς ιστούς όσο και στους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς του καρπού.

Πιο συγκεκριμένα, στο στάδιο των 5mm του ένσπερμου (*Εικ. 11*) και παρθενοκαρπικού (*Εικ. 12*) ανώριμου καρπού, βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στους αμυλόκοκκους (*Εικ. 13-17*). Λιγότερο έντονο είναι το σήμα στην περιοχή του πλακούντα, του ζελατινώδους παρεγχύματος και του περικαρπίου.

Στο στάδιο του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στους εσωτερικούς χιτώνες των σπερματικών βλαστών, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στους αμυλόκοκκους (*Εικ. 19-22*). Ασθενέστερο ήταν το σήμα στα κύτταρα του εσωτερικού περικαρπίου σε σχέση με τις εξωτερικές στοιβάδες (*Εικ. 18*), και του ενδοσπερμίου σπερματικής βλάστης ένσπερμου καρπού σε σχέση με τον παρθενοκαρπικό (*Εικ. 19 και 20*).

Κατά το στάδιο του ένσπερμου ώριμου πράσινου καρπού, η β-αμυλάση εντοπίστηκε κυρίως στους ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου (*Εικ. 26*) καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (*Εικ. 28*). Στον αντίστοιχο παρθενοκαρπικό καρπό, η παρουσία του ενζύμου εντοπίστηκε στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στους αμυλόκοκκους (*Εικ. 25 και 29*) καθώς και στα κύτταρα του χιτώνα της σπερματικής βλάστης (*Εικ. 27*). Και στις δύο περιπτώσεις, η β-αμυλάση δεν εντοπίστηκε στο περικάρπιο (*Εικ. 23 και 24*).

Στον ένσπερμο καρπό κατά το στάδιο της αλλαγής χρώματος, η β-αμυλάση εντοπίστηκε κυρίως στην εξωτερική στοιβάδα του περικαρπίου (Εικ. 30), στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου σπέρματος (Εικ. 32) και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 34). Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, παρατηρείται όμοια εικόνα για το περικάρπιο και τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 31 και 35) και επίσης είναι εμφανής η παρουσία της πρωτεΐνης στα κύτταρα του χιτώνα της σπερματικής βλάστης (Εικ. 33).

Στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού, η παρουσία του ενζύμου ήταν έντονη στο εσωτερικό των αναπτυσσόμενων σπερμάτων καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 38 και 40). Στον παρθενοκαρπικό καρπό, το σήμα ήταν ασθενέστερο στη σπερματική βλάστη σε σχέση με τον ένσπερμο καρπό (Εικ. 39) και εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικ. 41). Και στις δύο περιπτώσεις, παρατηρήθηκε ένα γενικό σήμα ανίχνευσης του ενζύμου στο περικάρπιο (Εικ. 36 και 37).

Η παρουσία της β-αμυλάσης στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες πιθανόν να σχετίζεται τόσο με τη λειτουργία των ηθμοσωλήνων, όσο με τη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων των αγγείων του ξύλου. Πράγματι, οι Wang *et al.* (1995) αναφέρουν ότι εντοπίζεται μια ειδική β-αμυλάση στους ηθμοσωλήνες του *Arabidopsis*. Είναι γνωστό επίσης, ότι οι ηθμοσωλήνες περιέχουν άμυλο το οποίο αποδομείται και επανασυντίθεται για τη λειτουργία τους. Επιπλέον, 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 μετά την εξέλιξη των κυττάρων σε αγγεία, ελαχιστοποιείται. Επιπλέον, στο *Arabidopsis* ταυτοποιήθηκε μια τρανφεράση της UDP-γλυκόζης (UDP1) που μεταφέρει την UDP-γλυκόζη σε κύτταρα που υπάρχει έντονη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος. Η UDP-γλυκόζη αποτελεί πρόδρομο μόριο της σύνθεσης τόσο της κυτταρίνης, όσο και της καλλόζης (Hong *et al.*, 2001).

Όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό των αμυλασών, οι Fulton *et al.* (2008) αναφέρουν ότι οι β-αμυλάσες BAM -1, -2, -3, και -4 του *Arabidopsis* που παίζουν κεντρικό ρόλο στην αποδόμηση του αμύλου του φύλλου, έχουν πλαστιδιακό πεπτιδίο οδηγό. Επίσης, οι Zhang και Wang (2002) αναφέρουν ότι η β-



αμυλάση λαμβάνει μέρος στην υδρόλυση του αμύλου των πλαστίδιων των μήλων. Παρόλο λοιπόν, που έχουν ταυτοποιηθεί πλαστιδιακές β-αμυλάσες (Lao *et al.*, 1999), η πλειοψηφία της δραστικότητας της β-αμυλάσης είναι εξωπλαστιδιακή (Beck and Ziegler, 1989; Nakamura *et al.*, 1991). Έτσι, π.χ. στο *Arabidopsis* το 80% της δραστικότητας της β-αμυλάσης που εντοπίζεται στα φύλλα ροζέτας είναι εξωπλαστιδιακή (Lin *et al.*, 1988b). Επίσης, και σε άλλα φυτά έχει αναφερθεί εξωπλαστιδιακή, πιθανώς κυτοπλασματική, δραστικότητα του ενζύμου (Levi and Preiss, 1978; Lin *et al.*, 1988; Manga and Sharma, 1990; Saeed and Duke, 1990; Sharma and Schorfer, 1987) ή και πιθανή χυμοτοπιακή (Lizotte *et al.*, 1990; Ziegler and Beck, 1986). Κατά τον ανοσοεντοπισμό της β-αμυλάσης, το ένζυμο, κατά τα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του καρπού, εντοπίστηκε σε ιστούς και όργανα στα οποία δεν ανιχνεύεται άμυλο, πράγμα που συμφωνεί με τα προηγούμενα ευρήματα. Επιπλέον, πρόσφατη έρευνα (Dauvillee *et al.*, 2009), έδειξε ότι το φύκος *Crypthecodinium cohnii* αποθηκεύει το άμυλο μέσω μιας UDP-γλυκόζης στο κυτόπλασμα. Είναι λοιπόν πιθανό, η β-αμυλάση να σχετίζεται με υδρόλυση του κυτοπλασμικού αμύλου το οποίο δεν είναι δυνατόν να ανιχνευθεί με τη χρώση του ιωδίου.

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 θεωρούνταν ότι ήταν καταλυτικά ανενεργή σε φυσικούς αμυλόκοκκους χωρίς την πρότερη υδρόλυση του αμύλου από άλλα αμυλολυτικά ένζυμα, όπως η α-αμυλάση (Beck and Ziegler, 1989). Παρόλα αυτά, τελευταίες μελέτες έχουν δείξει ότι η β-αμυλάση παίζει σημαντικό ρόλο στην υδρόλυση του παροδικού αμύλου (Scheidig *et al.*, 2002). 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.

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 και βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη του χλωροπλάστη. Μεταλλάξεις στο φορέα αυτό 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 μείωσή της κατά την 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 γονίδιο 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).

#### 4.2 Η δραστηριότητα της β-αμυλάσης *in vitro*

Η δραστηριότητα της β-αμυλάσης προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα πέντε υπό εξέταση στάδια ανάπτυξης (ανώριμος καρπός διαμέτρου 5mm και 15mm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός) τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς (Σχ. 2).

Οι τιμές της ενεργότητας της β-αμυλάσης στο πείραμα, κυμάνθηκαν μεταξύ 4 και 130U/mg πρωτεϊνών\*min (Σχ. 2). 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. Η ενεργότητα της β-αμυλάσης σε βλαστημένους καρπούς κριθαριού προσδιορίστηκε μεταξύ των 400-500U/g καρυόψεων (Dicko *et al.*, 2000).

Επίσης, στο αλεύρι του κριθαριού οι τιμές της ενεργότητας του ενζύμου έχουν προσδιοριστεί μεταξύ 230-1570U/g αλεύρου (Swanston and Molina-Cano, 2001; 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.

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φανερώνουν ότι το ένζυμο παρουσιάζει διακυμάνσεις με δύο περιοχές με υψηλή δραστηριότητα, στο στάδιο του ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm και στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του καρπού (Σχ. 2). Μελέτες της δραστηριότητας της β-αμυλάσης που σχετίζονται με τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης των καρπών δεν εντοπίστηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία. Οι περισσότερες έρευνες σχετίζονται με τη μεγάλη αποδόμηση του αμύλου κατά την ωρίμανση των καρπών. Η υψηλή δραστηριότητα της β-αμυλάσης στους καρπούς διαμέτρου 5mm είναι δυνατόν να αποδοθεί στις έντονες βιοχημικές διεργασίες που έχουν σχέση με την ανάπτυξη του καρπού στο στάδιο αυτό. Η παρατηρούμενη συσσώρευση του αμύλου σε συνδυασμό με την υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου κατά το στάδιο αυτό, καταδεικνύει την ταυτόχρονη σύνθεση και αποδόμηση του αμύλου στον καρπό της τομάτας, όπως συμβαίνει και με τη σακχαρόζη (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). Παρόμοια εικόνα με ταυτόχρονη σύνθεση και αποδόμηση αμύλου και αύξηση της δραστηριότητας της β-αμυλάσης, παρατήρησαν οι Mita *et al.* (1995) στα φύλλα του *Arabidopsis thaliana* μετά την παροχή σακχαρόζης.

Η δραστηριότητα του ενζύμου ήταν υψηλότερη στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του καρπού, γεγονός το οποίο υποδηλώνει τη συμμετοχή του ενζύμου στη μεγάλη υδρόλυση του αμύλου που συμβαίνει σε αυτά τα στάδια. Οι Peroni *et al.* (2008), υποστήριξαν τη συμμετοχή τόσο της α- όσο και της β-αμυλάσης στην αποδόμηση του αμύλου κατά την ωρίμανση καρπών μάνγκο. Οι Oliveira do Nascimento *et al.* (2006), αναφέρουν ότι η δραστηριότητα της β-αμυλάσης κατά την ωρίμανση της μπανάνας συσχετίζεται θετικά με την αποδόμηση του αμύλου στον καρπό αυτό.



## **5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

- ↪ Από τον εντοπισμό του ενζύμου, είναι δυνατόν να λεχθεί ότι υδρόλυση του αμύλου γίνεται τόσο σε ιστούς που εντοπίζεται το άμυλο, όσο και σε ιστούς που δεν εντοπίζεται το άμυλο. Στους ιστούς που παρατηρείται συσσώρευση αμύλου, το ένζυμο εντοπίζεται στους αμυλόκοκκους.
- ↪ Η δραστικότητα της β-αμυλάσης παρουσιάστηκε αυξημένη σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης (ανώριμος καρπός διαμέτρου 5mm) και στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος.
- ↪ Η υψηλή δραστικότητα του ενζύμου στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του καρπού υποδηλώνει τη συμμετοχή του ενζύμου στη μεγάλη υδρόλυση του αμύλου που συμβαίνει σε αυτά τα στάδια.
- ↪ Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς μετρήθηκε υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα στα τελευταία στάδια της ανάπτυξής τους.
- ↪ Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου, η β-αμυλάση εντοπίζεται σε όλα τα όργανά του.
- ↪ Η παρουσία της β-αμυλάσης στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, πιθανόν να σχετίζεται είτε με τη λειτουργία των ηθμοσωλήνων, είτε με τη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων των αγγείων του ξύλου.



## **6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- Abdalla A, Verkerk K** (1968) Growth, flowering and fruit set of the tomato at high temperature. *Neth J Agri Sci* **16**: 71-76
- Alabadi D, Aguero MS, Perez-Amador MA, Carbonell J** (1996) Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries: changes in unpollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin and gibberellin. *Plant Physiol* **112**: 1237-1244
- Allaby M** (1998) Oxford dictionary of plant sciences. Oxford University Press, New York. pp. 262
- Anders VN, Tove C, Bojko M, Marcussen J** (1997) Purification and characterization of b-amylase from leaves of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiol Plant* **99**: 190-196
- Anderson LE, Goldhaber IM, Li D, Tang X, Xiang M, Prakash N** (1995). Αναφορά από **Winter H, Huber SC** (2000) **Archbold DD, Jr Dennis FG, Fiore JA** (1982) Accumulation of <sup>14</sup>C labelled material from foliarapplied <sup>14</sup>C sucrose by tomato ovaries during fruit set and initial development. *J Am Soc Hort Sci* **107**: 19-23
- Asahira T, Hosoki T, Shinya K** (1982) Regulation of low temperature-induced malformation of tomato fruit by plant growth regulators. *J Japan Soc Hort Sci* **50**: 468-474
- Asahira T, Takagi H, Takeda Y, Tsukamoto Y** (1968). Αναφορά από **Atherton J, Rudich G** (1986) **Asahira T, Takeda Y, Nishio T, Hirabayashi M, Tsukamoto Y** (1967). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005) **Atherton J, Rudich G** (1986) Tomato crop. A scientific basis for improvement. Chapman and Hall UK
- Avigad G, Dey M** (1997) Plant Biochemistry. Academic Press, London, New York. pp. 143-203
- Avigad G, Dey PM** (1997) Carbohydrate metabolism: Storage carbohydrates. In: Plant biochemistry (ed. Dey PM & Harborne JB). Academic Press. pp. 143–204
- Baily C, Benamar A, Carbinov F, Come D** (1996) Changes in malondialdehyde content and superoxide dismutase catalase and glutathione reductase activities in sunflower as related to deterioration during accelerated aging. *Plant Physiol* **97**: 104–110
- Baunsgaard L, Lütken H, Mikkelsen R, Glaring MA, Pham TT, Blennow A** (2005) A novel isoform of glucan, water dikinase phosphorylates pre-phosphorylated alpha-glucans and is involved in starch degradation in *Arabidopsis*. *Plant J* **41**: 595-605
- Bearden JC** (1978) Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved proteindye binding assay. *Biochi & Biophys Acta* **533**: 525-529

- Beck E, Ziegler P** (1989) Biosynthesis and degradation of starch in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **40**: 95-117
- Bianchi A, Soressi GP** (1969). Αναφορά από **Gorguet B, Van Heusden AW, Lindhout P** (2005) **Blazquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR, Weigel D** (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* **10**: 791-800
- Blennow A, Engelsens SB, Munck L, Møller BL** (2000) Starch molecular structure and phosphorylation investigated by a combined chromatographic and chemometric approach. *Carbohydr Polymers* **41**: 163-174
- Blennow A, Engelsens SB, Nielsen TH, Baunsgaard L, Mikkelsen R** (2002) Starch phosphorylation: a new front line in starch research. *Trends Plant Sci* **7**: 445-450
- Bohner J, Bangerth F** (1988a). Αναφορά από **Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) **Bruneau JM, Worrell AC, Cambou B, Lando D, Voelker TA** (1991) Sucrose phosphate synthase, a key enzyme for sucrose biosynthesis in plants. *Plant Physiol* **96**: 473-478
- Boos W, Schuman H** (1998) Maltose/maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 204-29
- Bunger-Kibler S, Bangerth F** (1982) Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regul* **1**: 143-154
- Burton R, Jenner H, Carrangis L, Fahy B, Fincher G, Hylton C, Laurie D, Parker M, Waite D, Van Wegen S, Verhoeven T, Denyer K** (2002) Starch granule initiation and growth are altered in barley mutants that lack isoamylase activity. *Plant J* **31**: 97-112
- Bustos R, Fahy B, Hylton CM, Seale R, Mebane NM, Edwards A, Martin C, Smith AM** (2004) Starch granule initiation is controlled by a heteromultimeric isoamylase in potato tubers. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 2215-20
- 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
- Clancy J, 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
- Coombe B** (1976). Αναφορά από **Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) **Crookes PR, Grierson D** (1983) Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role



- of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol* **172**: 1088-1093
- Datta R, Selvi MT, Seetharama N, Sharma R** (1999) Stress-mediated enhancement of beta-amylase activity in pearl millet and maize leaves is dependent on light. *J Plant Physiol* **154**: 657–664
- Daussant J, Lauriere C** (1990) Detection and partial characterization of two antigenically distinct f-amylases in developing kernels of wheat. *Planta* **181**: 505-511
- Daussant J, Sadowski J, Rorat T, Mayer C, Lauriere C** (1991) Independent regulatory aspects and posttranslational modifications of two fl-amylases of rye. *Plant Physiol* **96**: 84-90
- Dauvillée D, Deschamps P, Ral JP, Plancke C, Putaux JL, Devassine J, Durand-Terrasson A, Devin A** (2009) Genetic dissection of floridean starch synthesis in the cytosol of the model dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106(50)**:21126-30
- Davies JW, Cocking EC** (1965). Αναφορά από **Atherton J, Rudich G** (1986) **Davoren JD, Nykiforuk CL, Laroche A, Weselake RJ** (2002) Sucrose-induced changes in the transcriptome of cell suspension cultures of oilseed rape reveal genes associated with lipid biosynthesis. *Plant Physiol Biochem* **40**: 719-725
- Dicko M, Searle-van Leeuwen M, Hilhorst R, Traore A** (2000) Extraction, partial purification and characterization of b-amylase from the bulbs of *G. klattianus*. *Bioresource Technology* **73**: 183-185
- Dreier W, Schnarrenberger C, Borner T** (1995) Light- and stress- dependent enhancement of amylolytic activities in white and green barley leaves: beta-amylases are stress-induced proteins. *J Plant Physiol* **145**: 342–348
- Eglinton JK, Langridge P, Evans DE** (1998) Thermostability variation in alleles of barley Beta-Amylase. *J Cereal Science* **28**: 301-309
- Falavigna A, Badino M, Soressi GP** (1978). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005) **FAO** (1985). Αναφορά από **Wangdi PC** (1992) Cherry tomato varietal trial. In: Training report 1991. 10th Regional Training Course in Vegetable Production and Research. AVRDC-TOP Bangkok, Thailand
- Fos M, Nuez F, Garcia-Martinez JL** (2000) The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol* **122**: 471-479

- Fos M, Proano K, Alabadi D, Nuez F, Carbonell J, Garcia-Martinez JL** (2003) Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic *pat-2* tomato ovaries. *Plant Physiol* **131**: 359-366
- Fos M, Proano K, Nuez F, Garcia-Martinez JL** (2001) Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. *Physiol Plantarum* **111**: 545-550
- Fulton D, Stettler M, Mettler T, Vaughan C, Li J, Francisco P, Gil M, Reinhold H, Eicke S, Messerli G, Dorken G, Halliday K, Smith A, Smith S, Zeeman S** (2008) B-AMYLASE4, a Noncatalytic Protein Required for Starch Breakdown, Acts Upstream of Three Active b-Amylases in *Arabidopsis* Chloroplasts. *The Plant Cell* **20**: 1040-1058
- Gana J, Kalengamaliro N, Cunningham S, Volenec J** (1998) Expression of b-Amylase from Alfalfa Taproots. *Plant Physiol* **118**: 1495-1505
- George W, Scott J, Spiltstoesser W** (1984) Parthenocarpy in tomato. *Hort Rev* **6**: 65-84
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM** (2006) AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1873-1886
- Gorguet B, Van Heusden AW, Lindhout P** (2005) Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biol* **7**: 131-139
- Gough C, Hobson GE** (1990) A comparison of the productivity, quality, shelf life characteristics and consumer reaction to the crop from cherry tomato plants grown at different levels of salinity. *J Hort Sc* **65**: 431-439
- Grierson D, Kader AA** (1986) Fruit ripening and quality. In: *The Tomato Crop*. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company. pp. 241-275
- Groot SPC, Bruinsma J, Karszen CM** (1987) The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: Studies with a gibberellin-deficient mutant. *Physiol Plantarum* **71**: 184-190
- Gustafson FG** (1936) Inducement of fruit development by growth promoting chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* **22**: 628-636
- Gustafson FG** (1942) Parthenocarpy: natural and artificial. *Bot Rev* **8**: 599-654

- Hallman E, Kobryń J** (2003) Yield and quality of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) cultivated on rockwool and cocofibre. *Acta Horti* **614**: 693-697
- Hara-Nishimura I, Nishimura M, Daussant J** (1986) Conversion of free  $\beta$ -amylase on starch granules in the barley endosperm during desiccation phase of seed development. *Protoplasma* **134**: 149-153
- Harris WM, Spurr AR** (1969) Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am J Bot* **56**: 380–389
- Heiser C, Anderson G** (1999). Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007) **Hendrix DL, Huber SC** (1986) Diurnal fluctuations in cotton leaf carbon export, carbohydrate content, and sucrose synthesizing enzymes. *Plant Physiol* **81**: 584-586
- Heldt HW** (1991) Plant Biochemistry and Molecular Biology. Oxford University press. pp. 137
- Hendrix DL, Grange RI** (1991) Carbon partitioning and export from mature cotton leaves. *Plant Physiol* **95**: 228–233
- Ho LC, Hewitt JD** (1986) Fruit development. In: The Tomato Crop. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company. pp. 201-239
- Ho LC, Sjut V, Hoad GV** (1983) The effect of assimilate supply on fruit growth and hormone levels in tomato plants. *Plant Growth Regul* **1**: 155-171
- Hobson G** (1988) Cherry tomatoes. The Garden. pp. 55-60
- Hong Z, Zhang Z, Olson JM, Verma D** (2001) A Novel UDP-Glucose Transferase Is Part of the Callose Synthase Complex and Interacts with Phragmoplastin at the Forming Cell Plate. *The Plant Cell* **13**: 769–779
- Hopkins WG** (1995) Introduction to plant physiology. John Wiley and sons, INC. pp. 245
- Houghtalin HB** (1935). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986) **Howlett FS** (1939) The modification of flower structure by environment in varieties of *Lycopersicon esculentum*. *J Agr Res* **58**: 79-117
- Hussain H, Mant A, Seale R, Zeeman S, Hinchliffe E, Edwards A, Hylton C, Bornemann S, Smith AM, Martin C, Bustos R** (2003) Three isoforms of isoamylase contribute different catalytic properties for the debranching of potato glucans. *Plant Cell* **15**: 133-49

- James MG, Robertson DS, Myers AM** (1995) Characterization of the maize gene *sugary1*, a determinant of starch composition of kernels. *Plant Cell* **7**: 417-29
- Janes BE** (1941) Some chemical differences between artificially produced parthenocarpic fruits and normal seeded fruits of tomato. *Am J Bot* **28**: 639-646
- Jensen WA** (1962) Botanical Histochemistry. Freeman and Company. San Francisco and London. pp. 201
- Jung SH, Lee JY, Lee DH** (2003) Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in Arabidopsis leaves undergoing cold stress. *Plant Mol Biol* **52**: 553-567
- Kaplan F, Guy CL** (2004) Beta-Amylase induction and the protective role of maltose during temperature shock. *Plant Physiol* **135**: 1674-1684
- Kaplan F, Guy CL** (2005) Beta-Amylase RNAi Lines Exhibit Increased Sensitivity Of Photosynthetic Electron Transport Chain To Freezing Stress. *Plant J* **44**: 730-743
- Kaplan F, 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. *Plant J* **50**: 967-981
- Kaplan F, Sung SY, Guy CL** (2006) Roles of  $\beta$ -amylase and starch breakdown during temperatures stress. *Physiol Plantarum* **126**: 120-128
- Kataoka K, Uemachi A, Nonaka M, Yazawa S** (2004) Effect of endogenous gibberellins in the early stages of fruit growth and development of the 'Severianin' tomato. *J Hort Sci Biot* **79**: 54-58
- Kataoka K, Uemachi A, Yazawa S** (2003) Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in *pat-2* and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Sci Hort* **98**: 9-16
- Κλώνης ΙΔ** (1997) Ενζυμική Βιοτεχνολογία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, Κρήτη
- Kohno A, Nanmori T, Shinke R** (1989) Purification of  $\beta$ -amylase from Alfalfa (*Medicago sativa*) seeds. *J Biochem* **105**: 231-233
- Kojima K, Tamura Y, Nakano M, Han D-S Niimi Y** (2003) Distribution of indole-acetic acid, gibberellin and cytokinins in apoplast and symplast of parthenocarpic tomato fruits. *Plant Growth Regul* **41**: 99-104
- Koltunow AM, Grossniklaus U** (2003) Apomixis: A developmental perspective. *Annu Rev Plant Bio* **54**: 547-574

- Kötting O, Pusch K, Tiessen A, Geigenberger P, Steup M, Ritte G** (2005) Identification of a novel enzyme required for starch metabolism in *Arabidopsis* leaves. The phosphoglucan, water dikinase. *Plant Physiol* **137**: 242-52
- Kreis M, Shewry PR** (1992) The control of protein synthesis in developing barley seeds. In: Shewry, P.R. (Ed.), *Barley: Genetics, Biochemistry, Molecular Biology and Biotechnology*. C.A.B. International, Wallingford. pp. 319–368
- Kruger NJ, Rees T** (1993) Maltose metabolism by pea chloroplasts. *Planta* **158**: 271-73
- Laby RJ, Kim D, Gibson SI** (2001) The *ram1* mutant of *Arabidopsis* exhibits severely decreased b-amylase activity. *Plant Physiol* **127**: 1798–1807
- Lao N, Schoneveld O, Mould R, Hibberd J, Gray J, Kavanagh T** (1999) An *Arabidopsis* gene encoding a chloroplast-targeted beta-amylase. *Plant J* **20**: 519-527
- Lauriere C, Doyen C, Thevenot C, Daussant J** (1992) b-amylase in cereals: A Study of the Maize  $\beta$ -Amylase System. *Plant Physiol* **100**: 887–893
- Lea PG, Leegood RC** (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Wiley press. pp. 223-225
- Levi C, Preiss J** (1978) Amylopectin degradation in pea chloroplast extracts. *Plant Physiol* **61**: 218-220
- Lifschitz E, Brodai L, Hareven D, Hurwitz C, Prihadash A, Pnueli L, Samach A, Zamir D** (1993). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005) **Lin S, Splittstoesser WE, George WL** (1983) A comparison of normal seeds and pseudoembryos produced in parthenocarpic fruit of 'Severianin' tomato. *HortScience* **18**: 75-76
- 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, 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
- Lloyd JR, Kossmann J, Ritte G** (2005) Leaf starch degradation comes out of the shadows. *Trends Plant Sci* **10**: 130–137
- Long VH** (1998) Cherry tomato seed production. AVRDC-ARC Research Report **Lunn JE, Furbank RT** (1997) Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C4 plants. *Planta* **202**: 106–111

- Losch R** (2004) Plant mitochondrial respiration under the influence of Heavy Metals. Springer Publications. pp. 64-68
- Lu Y, Gehan JP, Sharkey TD** (2005) Day-length and circadian effects on starch degradation and maltose metabolism. *Plant Physiol* **138**: 2280–2291
- Lukyanenko AN** (1991) Parthenocarpy in tomato. In: Genetic improvement of tomato (ed. Kalloo G). Monographs on Theor Appl Genet Springer-Verlag, Berlin. pp. 167-177
- Manga VA, Sharma R** (1990) Lack of functional interrelationship between fl-amylase photoregulation and chloroplast development in mustard (*Sinapis alba* L.) cotyledons. *Plant Cell Physiol* **31**: 167-172
- Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP** (1978) Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiol* **19**: 1281-1288
- Martin C, Smith AM** (1995) Starch biosynthesis. *The Plant Cell* **7**: 971-985
- Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP** (1998) The parthenocarpic fruit (*pat*) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* **125**: 107-114
- Meredith FI, Purcell AE** (1966) Changes in the concentration of carotenes of ripening homestead tomatoes. *J Am Soc Hort Sci* **89**: 544-548
- Mikkelsen R, Baunsgaard L, Blennow A** (2004) Functional characterisation of alpha-glucan, water dikinase, the starch phosphorylating enzyme. *Biochem J* **377**: 525-532
- 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
- Mohr W, Stein M** (1969) Fine structure of fruit development in tomato. *Can J Plant Sci* **49**: 549–553
- Muller CH** (1940). Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007) **Nguyen-Quoc B, N'Tchobo H, Foyer C, Yelle S** (1999) Overexpression of sucrose phosphate synthase increases sucrose unloading in transformed tomato fruit. *J Exp Bot* **50**: 785-791
- Nakamura K, Ohto M, Yoshida N** (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

- Nakamura Y** (1996) Some properties of starch debranching enzymes and their possible role in amylopectin biosynthesis. *Plant Sci* **121**: 1-18
- Nakazima R, Imanaka T, Aida S** (1986) Nucleotide sequence of the *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase gene. *Appl Microbial Biotechnol* **23**: 355-360
- Neuhaus HE, Emes MJ** (2000) Non photosynthetic metabolism in plastids. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **51**: 111-140
- Nguyen-Quoc B, Foyer C** (2001) A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose synthase in sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Bot* **52**: 881-889
- Nielsen TH, Deiting U, Stitt M** (1997) A P-Amylase in Potato Tubers 1s Induced by Storage at Low Temperature. *Plant Physiol* **11**: 503-510
- Nielsen TH, Wischmann B, Enevoldsen K, Møller BL** (1994) Starch phosphorylation in potato tubers proceeds concurrently with de novo biosynthesis of starch. *Plant Physiol* **105**: 111-117
- Nitsch JP** (1952). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005) **Nogler GA** (1984). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005) **N'tchobo H, Dali N, Nguyen-Quoc B, Foyer C, Yelle S** (1999) Starch synthesis in tomato remains constant throughout fruit development and is dependent on sucrose supply and sucrose synthase activity. *J Exp Bot* **50**: 1457-1463
- Nuez F, Costa J, Cuartero J** (1986) Genetics of the parthenocarp for tomato varieties 'Sub- Artic Plenty', '75/59' and 'Severianin'. *Z Pflanzenzucht* **96**: 200-206
- Okamoto K, Akazawa T** (1980) Enzymic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds. *Plant Physiol* **65**: 81-84
- Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Soressi GP, Mazzucato A, Mariotti L, Ceccarelli N** (2007) Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta* **226**: 877-888
- Oliveira do Nascimento J, Junior A, Bassinello P, Cordenunsi B, Mainardi J, Purgatto E, Lajolo F** (2006) Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biology and Technology* **40**: 41-47
- Omidiji MO** (1979). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986) **Ολύμπιος XM** (2001) Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. Σταμούλης, Αθήνα. σελ. 40-44
- Osborne DJ, Went FW** (1953). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005) **Pagnussat G, Curatti L, Salerno G** (2000) Rice sucrose-phosphate

- synthase: Identification of an isoform specific for heterotrophic tissues with distinct metabolite regulation from the mature leaf enzyme. *Physiol Plantarum* **108**: 337-344
- Pecaut P, Philouze J** (1978) A *sha-pat* line obtained by natural mutation. *Tomato Genet Coop Rep* **28**: 12
- Peroni F, Koike C, Louro R, Purgatto E, Oliveira do Nascimento J, Lajolo F, Cordenunsi B** (2008) Mango Starch Degradation. II. The Binding of  $\alpha$ -Amylase and  $\beta$ -Amylase to the Starch Granule *J. Agric. Food Chem* **56(16)**: 7416–7421
- Philouze J** (1981). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986) **Philouze J** (1983b) Natural parthenocarpy in tomato. I. Bibliographical review. *Agronomie* **3**: 611-620
- Philouze J** (1985). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005) **Philouze J** (1989) Natural parthenocarpy in tomato. IV. A study of the polygenic control of parthenocarpy in line 75/59. *Agronomie* **9**: 63-75
- Philouze J, Maisonneuve B** (1978) Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety *Severianin*. *Tomato Genet Coop Rep* **28**: 12-13
- Philouze J, Pecaut P** (1986) Natural parthenocarpy in tomato. III. Study of the parthenocarpy due to the gene *pat* (parthenocarpic fruit) in the line *Montfavet 191*. *Agronomie* **6**: 243-248
- Preil W** (1973) Influence of temperature on the parthenocarpy of tomatoes. *Angew Bot* **47**: 135-140
- Quiros CF** (1974). Αναφορά από **Warnock SJ** (1988) A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *Hortscience* **23**: 669-673
- Rabinowitch HD, Budowski P, Kedar N** (1975) Carotenoids and epoxide cycles in mature-green tomatoes. *Planta* **122**: 91–97
- Raffo A, Leopardi C, Fogliano V, Ambrosino P, Salucci M, Gennaro L, Bugianesi R, Giufridda F, Quaglia G** (2002) Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. *Naomi F1*) harvested at different ripening stages. *J Agr Food Chem* **50**: 6550–6556
- Reidel EJ, Turgeon R, 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(10)**: 1607–1613
- Rick CM** (1976). Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007) **Rick CM** (1978) The tomato. *Sci Amer* **239**: 77-87



- Ritte G, Lloyd JR, Eckermann N, Rottmann A, Kossmann J, Steup M** (2002) The starch-related R1 protein is an alpha-glucan, water dikinase. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 7166-7171
- Ritte G, Scharf A, Eckermann N, Häbel S, Steup M** (2004) Phosphorylation of transitory starch is increased during degradation. *Plant Physiol* **135**: 2068-77
- Rochalska M, Grabowska K** (2007) Influence of magnetic fields on the activity of enzymes:  $\alpha$ - and  $\beta$ -amylase and glutathione S-transferase (GST) in wheat plants *Int. Agrophysics* **21**: 185-188
- Rorat T, Sadowski L, Grellet F, Daussant L, Delseny M** (1991) Characterization of cDNA clones for rye endosperm-specific  $\beta$ -amylase and analysis of  $\beta$ -amylase deficiency in rye mutant lines. *Theor Appl Genet* **83**: 257-263
- Ross JJ, O'Neill DP** (2001) New interactions between classical plant hormones. *Trends Plant Sci* **6**: 2-4
- Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Huub L, Kerckhoffs J, Elliott RC** (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* **21**: 547-552
- Rosso SW** (1968). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986) **Rubatzhy VE, Yamaguchi M** (1997) *World vegetables (principles, production and nutritive values)*. Chapman and Hall, London. pp. 533-553
- Saeed M, Duke S** (1990) Amylases in pea tissues with reduced chloroplast density and/or function. *Plant Physiol* **94**: 1813-1819
- Sawhney VK, Greyson RI** (1971) Induction of multilocular ovary in the tomato by gibberellic acid. *J Am Soc Hort* **96**: 196-198
- Scheidig A, Frolich A, Schulze S, Lloyd JR, Kossmann J** (2002) Down regulation of a chloroplast-targeted alpha-amylase leads to a starch-excess phenotype in leaves. *Plant J* **30**: 581-591
- Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K** (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *The Plant Cell* **13**: 61-72
- Setha OE** (1995) Cherry tomato varietal trial. ARC Training report **Siegl G, MacKintosh C, Stitt M** (1990) Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. *FEBS Lett* **270**: 198-202
- Sharma R, Schopfer P** (1987) Phytochrome-mediated regulation of  $\beta$ -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  $\beta$ -amylase in seeds and vegetative tissues of barley. *Planta* **176**: 127-134
- Shinke R, Mikami B, Morita Y, Takeda Y** (1988) Plant  $\beta$ -amylases. In: The Amylase Research Society of Japan (Ed.), Handbook of Amylases and Related Enzymes. Pergamon, Oxford. pp. 211-213
- Simpson DJ, Baquar MR, McGlasson WB, Lee TH** (1976). Αναφορά από **Grierson D, Kader AA** (1986) **Sjut V, Bangerth F** (1982) Induced parthenocarpy: a way of changing the levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.): 1. Extractable hormones. *Plant Growth Regul* **1**: 243-251
- Smith AM, Denyer K** (1992) Starch synthesis in developing pea embryos. *New Phytol* **122**: 21-23
- Smith O** (1935). Αναφορά από **Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) **Sonnewald U, Quick WP, MacRae E, Krause KP, Stitt M** (1993) Purification, cloning and expression of spinach leaf sucrose-phosphate synthase in *Escherichia coli*. *Planta* **189**: 174-181
- 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, Sparla F, Zaffagnini M, Wedel N, Scheibe R, Pupillo P, Trost P** (2005) Regulation of Photosynthetic GAPDH Dissected by Mutants. *Plant Physiol* **10**: 105-107
- Sparla F, Costa A, Schiavo FL, Pupillo P, Trost P** (2006) Redox Regulation of a Novel Plastid-Targeted  $\beta$ -Amylase of Arabidopsis. *Plant Physiol* **141**: 840-850
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA, Wasternack C** (2003) Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato: amplification in wound signalling. *Plant J* **33**: 577-589
- Steup M, Robenek H, Melkonian M** (1983) In-vitro degradation of starch granules isolated from spinach chloroplasts. *Planta* **158**: 28-36
- Stryer L** (1988) Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, pp. 21-23
- Sun Z, Duke SH, Henson CA** (1995) The role of pea chloroplast  $\alpha$ -glucosidase in transitory starch degradation. *Plant Physiol* **108**: 211-17
- Sung DY** (2001) Characterization of Arabidopsis heat shock protein 70 (Hsp70) gene family and microarray analysis of gene expression in response to temperature extremes. PhD thesis. University of Florida, Gainesville, FL. pp. 156-158

- Swanston JS, Molina-Cano JL** (2001) Beta-Amylase Activity and Thermostability in Two Mutants Derived from the Malting Barley cv. Triumph. *Journal of Cereal Science* **33**:155–161
- Tanaka N, Kajimoto S, Mitani D, Kunugi S** (2002) Effects of guanidine hydrochloride and high pressure on substrate flexibility of  $\beta$ -amylase. *Acta Biochimica and Biophysica* **1596**: 318-325
- Taylor IB** (1986) Biosystematics of the tomato. In: The Tomato Crop. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company, London. pp. 1–34
- Thomas TH** (1982). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986) **Tognetti JA, Salerno GL, Crespi MD, Pontis HG** (1990). Αναφορά από **Winter H, Huber SC** (2000) **Torozer D, Huber SC** (1997) Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase. *Plant Physiol* **114**:947-955
- Thomashow LS, Bonsall RF, Weller DM** (2002) Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. *Manual of Environmental Microbiology*. pp. 636-647
- Todaka D, Matsushima H, Morohashi Y** (2000) Water stress enhances  $\beta$ -amylase activity in cucumber cotyledons. *Journal of Experimental Botany* **51**: 739-745
- Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007) Tomato. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry: Transgenic Crops. 59 (ed. Pua EC, Davey MR) Springer-Verlag. pp. 163-180
- Van der Maarel MJEC, Van der Veen B, Uitdehaag JCM, Leemhuis H, Dijkhuizen L** (2002) Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *J Biotech* **94**: 137-155
- Varga A, Bruinsma J** (1986) Tomato. In: CRC Handbook of Fruit Set and Development. S.P. Monselise, ed (Boca Raton, FL: CRC Press). pp. 461-480
- Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P** (2000) Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends Biotechnol* **18**: 233-242
- Vickery RS, Bruinsma J** (1973) Compartments and permeability for potassium in developing fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Exp Bot* **24**: 1261–1270
- Walker AJ** (1975). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986) **Walker JL, Huber SC** (1989) Regulation of sucrose-phosphate synthase activity in spinach leaves by protein level and covalent modification. *Planta* **177**: 116-120
- Wang Q, Monroe J, Sjolund RD** (1995) Identification and Characterization of a Phloem-Specific [ $\beta$ ]-Amylase. *Plant Physiol* **109**: 743-750

- Wang SM, Lue WL, Eimert K, Chen J** (1996) Phytohormone regulated  $\beta$ -amylase gene expression in rice. *Plant Mol Biol* **31**: 975-982
- 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
- Wilson LA, Sterling C** (1976) Studies on the cuticle of tomato fruit. I. Fine structure of the cuticle. *Z Pflanzenphysiol* **77**: 359-371
- Wischmann B, Nielsen TH, Møller BL** (1999) In vitro biosynthesis of phosphorylated starch in intact potato amyloplasts. *Plant Physiol* **119**: 1-8
- Xuan PT** (1999) Effect of potassium nitrate on seed production of cherry tomato. ARC Training report **Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q** (2001) Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrosephosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. *J Exp Bot* **52**: 2169-2179
- Yamasaki Y** (2003)  $\beta$ -Amylase in germinating millet seeds. *Phytochemistry* **64**: 935-939
- Yin C, Zhang GP, Wang JM, 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  $\beta$ -amylase cDNA from barley. *Biochem J* **115**: 47-51
- Yu TS, Kofler H, Häusler RE, Hille D, Flügge UI, Zeeman SC, Smith AM, Kossmann J, Lloyd J, Ritte G et al** (2001) The *Arabidopsis* *sex1* mutant is defective in the R1 protein, a general regulator of starch degradation in plants, and not in the chloroplast hexose transporter. *The Plant Cell* **13**: 1907-1918
- 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, Rees T** (1999) Changes in carbohydrate metabolism and assimilate export in starch-excess mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell Env* **22**: 1445-1453
- Zeeman SC, Umemoto T, Lue WL, Au-Yeung P, Martin C et al** (1998b) A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplastic isoamylase accumulates both starch and phytoglycogen. *Plant Cell* **10**: 1699-71
- Zhang D, Wang Y** (2002) Beta-amylase in developing apple fruits: activities, amounts and subcellular localization. *Sci China C Life Sci* **45(4)**:429-40

**Ziegler P** (1999) Cereal beta-amylases. *J Cereal Sci* **29**: 195–204

**Ziegler P, Beck K** (1986) Exoamylase activity in vacuoles isolated from pea and wheat leaf protoplasts. *Plant Physiol* **82**: 1119-1121

ΠΗΓΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

[www.Wikipedia.org](http://www.Wikipedia.org)