

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ & ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ

**Μελέτη ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του
αζώτου σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς
τομάτας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗ ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΪΒΑΛΑΚΙ

ΤΣΙΛΙΚΟΧΡΥΣΟΣ Ι. ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2011

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥ
ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗ ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΪΒΑΛΑΚΙ

«Μελέτη ενζύμων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του
αζώτου σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς τομάτας
κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους»

Εξεταστική Επιτροπή:

Αν. Καθηγητής Γ. Αϊβαλάκις, Επιβλέπων

Καθηγητής Κ. Φασσέας, Μέλος

Αν. Καθηγητής Κ. Ακουμιανάκης, Μέλος

Η ανάθεση της παρούσας μελέτης
έγινε με απόφαση της υπ. αριθ. 4 της
18/11/2009 Γενικής Συνέλευσης του
Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

ΤΣΙΛΙΚΟΧΡΥΣΟΣ Ι. ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής δεν θα ήταν εφικτή χωρίς τη συμβολή ορισμένων ανθρώπων, τους οποίους θα ήθελα στο σημείο αυτό να ευχαριστήσω.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Γ. Αϊβαλάκι, για την ανάθεση του θέματος και την επίβλεψη της μελέτης, για το χρόνο που διέθεσε για τη συνεργασία μας, για τις πολύτιμες οδηγίες και συμβουλές του, και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Κ. Φασσέα, και Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κ. Ακουμιανάκη, για την αξιολόγηση και διόρθωση της παρούσας εργασίας.

Το Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών για την παραχώρηση του φυτικού υλικού και την άποψη συνεργασία μας, και ιδιαίτερα τον Δρ. Ι. Καραπάνο. Επίσης, από το Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, τη Δρ. Α.Ε. Νικολοπούλου για την παροχή υλικοτεχνικής υποστήριξης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους και φίλους κ.κ. Α. Λεκατσά, Α. Ροπόκη, Κ. Σκαρμούτσο, Μ. Χρηστάκη, Δ. Μαυροειδή, Στ. Τζαγκαράκη, Χρ. Διαμαντή, Ε. Χαρίνου, για τη δημιουργική συνεργασία μας καθ'όλη τη διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών, ιδιαιτέρως, δε, τους Γ. Τσανικλίδη και Β. Ρούνη για τη σημαντική βοήθεια τους κατά την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

Τσιλικόχρυσος Γεώργιος

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη	6
Abstract	7
Εισαγωγή	8
1.1 Η τομάτα τύπου cherry	8
1.1.1. Ταξινόμηση - Βοτανικά χαρακτηριστικά.....	8
1.1.2. Περιγραφή του καρπού της τομάτας τύπου cherry.....	9
1.1.3. Η ανάπτυξη του καρπού.....	11
1.1.3.1. Στάδια ανάπτυξης του καρπού.....	12
1.1.3.2. Ο αζωτούχος μεταβολισμός κατά την ωρίμανση του καρπού.....	13
1.2 Η παρθενοκαρπία	14
1.2.1. Περιγραφή και σημασία του φαινομένου.....	14
1.2.2. Ο ρόλος των ορμονών στην εμφάνιση της παρθενοκαρπίας.....	15
1.2.3. Το γενετικό υπόβαθρο της παρθενοκαρπίας.....	18
1.2.4. Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας.....	18
1.3 Συνθετάση της γλουταμίνης	19
1.3.1. Εισαγωγή.....	19
1.3.2. Τύποι και Δομή της GS.....	20
1.3.3. Οι ισότυποι της GS.....	21
1.3.3.1. Ο κυτοπλασμικός ισότυπος (GS1).....	22
1.3.3.2. Ο πλαστιδιακός ισότυπος (GS2).....	25
1.3.4. Ρύθμιση της GS.....	26
1.3.5. Η GS κατά την ωρίμανση καρπών τομάτας.....	30
1.4 Αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος	32
1.4.1. Εισαγωγή.....	32
1.4.2. Τύποι, Δομή και Εντοπισμός της GDH.....	32
1.4.3. Οι ισότυποι της GDH.....	34
1.4.4. Ο φυσιολογικός ρόλος της GDH.....	35
1.4.5. Ρύθμιση της GDH.....	38
1.4.6. Η GDH κατά την ωρίμανση καρπών τομάτας.....	43
Υλικά & Μέθοδοι	44
2.1 Η διαδικασία του πειράματος	44
2.2 Το φυτικό υλικό	44
2.3 Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων	46
2.3.1. Εκχύλιση των ενζύμων.....	46
2.3.2. Μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.....	46
2.3.3. Ηλεκτροφορήσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών.....	47
2.3.4. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	48
2.3.5. Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.....	48
2.4 Ανοσοεντοπισμός	50
2.4.1. Προσήλωση.....	50
2.4.2. Αφυδάτωση.....	50
2.4.3. Διαφανοποίηση.....	50
2.4.4. Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη.....	50
2.4.5. Προετοιμασία αντικειμενοφόρων.....	51
2.4.6. Μικροτόμηση.....	51
2.4.7. Αποπαραφίνωση.....	52
2.4.8. Ανοσοεντοπισμός.....	52

2.5 <i>In situ</i> εντοπισμός ενζυμικής δραστηριότητας (GDH).	53
2.6. Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν GDH & GS στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού.	55
2.6.1. Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.	55
2.6.2. Έλεγχος της ποιότητας του παραλαμβανόμενου RNA.	56
2.6.3. Υδρόλυση DNA των δειγμάτων.	57
2.6.4. Παρασκευή cDNA.	58
2.6.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR).	59
Αποτελέσματα	61
3.1. Έλεγχος καταλληλότητας αντισωμάτων GDH & GS	61
3.2. Ανοσοεντοπισμός των ενζύμων GDH & GS.	62
3.2.1. Ανώριμος καρπός διαμέτρου 0,5cm.	62
3.2.2. Ανώριμος καρπός διαμέτρου 1,5cm.	64
3.2.3. Ωριμος πράσινος καρπός.	66
3.2.4. Ωριμος καρπός στο στάδιο αλλαγής χρώματος.	68
3.2.5. Ωριμος κόκκινος καρπός.	70
3.3. <i>In situ</i> εντοπισμός της δραστηριότητας της GDH.	72
3.3.1. Συνολική παρουσίαση όλων των σταδίων ανάπτυξης του καρπού.	72
3.3.2. Αναλυτική παρουσίαση για κάθε στάδιο ανάπτυξης του καρπού.	74
3.4. Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν GDH & GS στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού.	77
3.4.1. Έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν την GDH.	77
3.4.2. Έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν την GS.	85
Συζήτηση	93
4.1 GS και GDH στους ένσπερους καρπούς.	94
4.2 GS και GDH στους παρθενοκαρπικούς καρπούς.	97
Συμπεράσματα	99
Βιβλιογραφία	100

Περίληψη

Μελετήθηκε η συνθετάση της γλουταμίνης (GS) και η αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος (GDH) 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 παρθενοκαρπικές τομάτες αναπτύχθηκαν μετά την αφαίρεση των ανθών από κλειστά άνθη και την ακόλουθη εφαρμογή 50ppm β-ναφθοξυοξικού οξέος.

Για τη μελέτη των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε ο ανοσοεντοπισμός των δυο πρωτεϊνών και ο *in situ* εντοπισμός της δραστηριότητας της GDH σε τομές των καρπών από τα παραπάνω στάδια. Τόσο η GS όσο και η GDH εντοπίστηκαν έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες σε όλα τα υπό μελέτη στάδια, τόσο στους παρθενοκαρπικούς όσο και στους ένσπερμους καρπούς. Στους ένσπερμους καρπούς και τα δύο ένζυμα εντοπίστηκαν έντονα στα όργανα του εμβρύου και το ενδοσπέρμιο. Τέλος, και τα δύο ένζυμα εντοπίστηκαν επίσης στο ζελατινώδες παρέγχυμα ενώ το σήμα του εντοπισμού στο περικάρπιο και τον πλακούντα ήταν λιγότερο έντονο. Από τον εντοπισμό του ενζύμου είναι δυνατόν να λεχθεί ότι το ένζυμο είναι ενεργό σε όλους τους ιστούς του καρπού καθόλα τα στάδια ανάπτυξής του.

Η μελέτη της έκφρασης των γονιδίων έδειξε ότι στον καρπό εκφράζονται κυρίως ο κυτοπλασματικός ισότυπος GS και πολύ λιγότερο ο πλαστιδιακός σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του καρπού. Αυτό σημαίνει ότι η συνεισφορά των πλαστιδίων στο μεταβολισμό του αζώτου στους καρπούς της τομάτας είναι πιθανόν μικρή. Επίσης, από τους δύο ισότυπους της GDH που εξετάστηκαν ο ένας (AAB39508) εκφράζεται κατά μία τάξη μεγέθους περισσότερο στον καρπό.

Η έκφραση της κυτοπλασματικής GS και της GDH (AAB39508) ακολουθούν το ίδιο πρότυπο. Η αυξημένη έκφραση των δύο αυτών γονιδίων κατά τη διάρκεια της αύξησης του σπέρματος στους ένσπερμους καρπούς, πιθανόν να σχετίζεται με την αύξηση του εμβρύου στους καρπούς αυτούς.

Abstract

In the present study, glutamine synthetase (GS) and glutamate dehydrogenase (GDH) in parthenocarpic and seeded tomato fruits were studied using immunolocalization and gene expression techniques. The selected stages of fruits were: developing fruits of diameter 5mm and 15mm, mature green, breaker and red ripe fruits. Parthenocarpic fruits were developed after the application of 50ppm β -naphthoxyacetic acid on emasculated closed flowers.

Both enzymes were heavily localized in the vascular bundles of all organs examined of parthenocarpic and seeded fruits. In seeded fruits both proteins were also heavily localized in embryo organs and in the endosperm. The localization signal was also present in locular parenchyma, while in the tissues of placenta and pericarp it was less intense. From immunolocalization pattern it is possible to conclude that the enzyme can be active in all fruit tissues through fruit development.

Gene expression studies revealed that during fruit development the expression of cytosolic isoform of GS was much higher than the plastidial one. Similarly, the expression of the first GDH gene that was studied (AAB39508) was almost 10 times higher than the second GDH gene that was studied.

Moreover, the expression patterns of cytosolic GS and GDH (AAB39508) were very similar. These patterns change through fruit development, in way almost inverse in seeded fruits in respect to parthenocarpic fruits. The increased expression of these two genes in seeded fruits during seed development could be attributed to the embryo development.

Εισαγωγή

1.1 Η τομάτα τύπου cherry.

1.1.1. Ταξινόμηση - Βοτανικά χαρακτηριστικά.

Η τομάτα ανήκει στην οικογένεια Solanaceae (Σολανώδη). Το 1753 ο Linnaeus κατέταξε το φυτό στο γένος *Solanum*, ενώ λίγο αργότερα ο Miller περιέλαβε την καλλιεργούμενη τομάτα και κάποια άγρια είδη του φυτού στο γένος *Lycopersicon*. Η φυλογενετική ταξινόμηση της οικογένειας Solanaceae αναθεωρήθηκε πρόσφατα και το γένος *Lycopersicon* επανεντάχθηκε στο γένος *Solanum* με νέα ονοματολογία. Ο τομέας (section) *Lycopersicon* του γένους *Solanum* αποτελείται από την καλλιεργούμενη τομάτα (*Solanum lycopersicum*) και 12 άγρια είδη (Bai and Linhout, 2007). Σύμφωνα με την μέχρι σήμερα κατάταξη, το είδος *Solanum lycopersicum* περιλαμβάνει δυο κύριες ποικιλίες, τη *Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum* και τη *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*, γνωστή ως τομάτα τύπου cherry.

Έχουν διατυπωθεί διάφορες υποθέσεις σχετικά με την περιοχή όπου πρωτοκαλλιεργήθηκε η τομάτα, με επικρατέστερες το Περού και το Μεξικό. Από την Κεντρική Αμερική και μέσω των Ισπανών κατακτητών, η τομάτα έφτασε στην Ευρώπη στα μέσα του 16^{ου} αιώνα, όπου η καλλιέργεια της μέσω της επιλεκτικής διαδικασίας οδήγησε, τελικά, στις σημερινές μεγαλόκαρπες ποικιλίες (Frary *et al.*, 2000). Το είδος *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* θεωρείται ως πρόγονη μορφή της σύγχρονης καλλιεργούμενης τομάτας (Taylor, 1986). Ωστόσο, πρόσφατες γενετικές έρευνες έδειξαν ότι τα φυτά τύπου *cerasiforme* αποτελούν ένα σύνολο από άγριες και καλλιεργούμενες τομάτες και όχι ένα ενιαίο προγονικό είδος (Nesbitt and Tanksley, 2002).

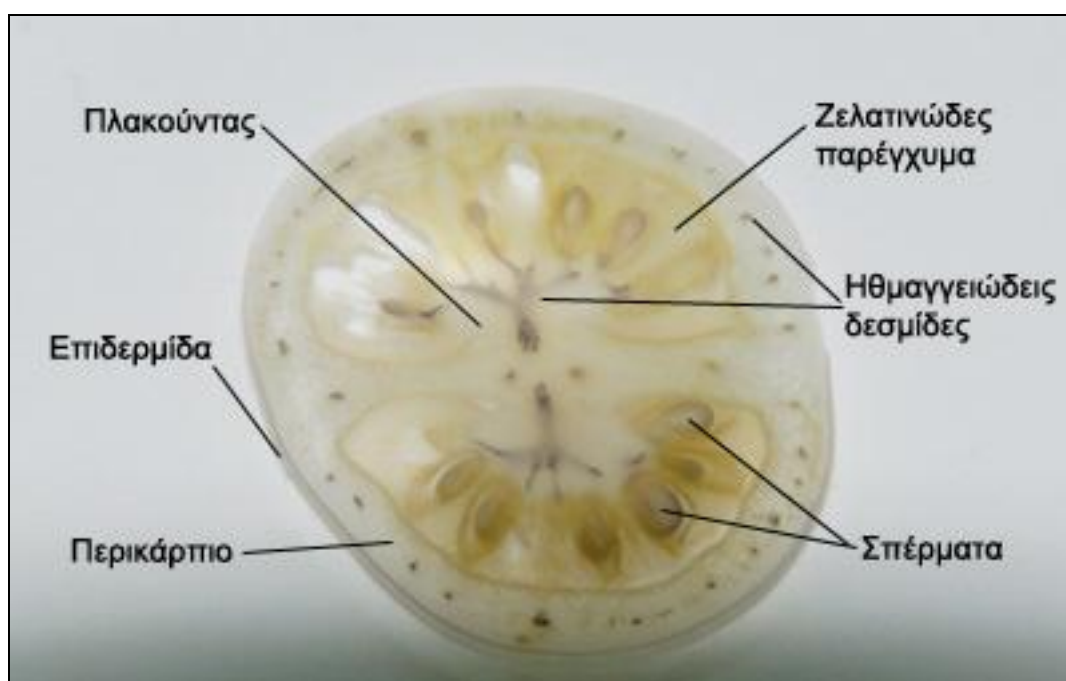
Το φυτό τομάτας τύπου cherry χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευρωστία και μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 3,0-3,6m. Φέρει κανονικό φύλλωμα, μικρότερου όμως μεγέθους σε σχέση με τις μεγαλόκαρπες ποικιλίες (Rubatzhy and Yamaguchi, 1997). Σχηματίζει μακριές ταξιανθίες ικανές να παράγουν μέχρι και 30 καρπούς η κάθε μία (Hobson, 1988). Τα άνθη έχουν κίτρινο χρώμα και μοιάζουν με αυτά της μεγαλόκαρπης τομάτας, είναι όμως μάλλον μικρότερα σε μέγεθος και οι ανθήρες τους είναι πολύ λεπτοί και μακριοί. Το βάρος των σπερμάτων δεν 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 (Xuan, 1999). Ο καρπός είναι ράγα κίτρινου ή κόκκινου χρώματος, με στρογγυλό ή αψοειδές σχήμα και είναι δίχωρος ή σπανιότερα τρίχωρος (Rubatzhy and Yamaguchi, 1997).

Η τομάτα κατέχει σημαντική θέση στην ανθρώπινη διατροφή και αποτελεί πηγή βιταμινών (Α και Κ), αλάτων (φώσφορο και κάλιο) και αντιοξειδωτικών (φαινολικά, φολικό οξύ, βιταμίνες C και E, λυκοπένιο και β-καροτένιο) (Toor and Savage, 2006). Γενικά, οι ποικιλίες τομάτας τύπου cherry χαρακτηρίζονται από υψηλότερα επίπεδα ξηρής ουσίας και στερεών διαλυτών συστατικών, αναλογικά με τις μεγαλόκαρπες ποικιλίες. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στην υψηλότερη περιεκτικότητα σε σάκχαρα (φρουκτόζη και γλυκόζη) και οργανικά οξέα (κιτρικό και μηλικό), στα οποία οφείλεται η έντονη γεύση και άρωμα των μικρόκαρπων ποικιλιών (Stevens *et al.*, 1977; Picha, 1986). Ομοίως, έχει διαπιστωθεί υψηλότερη συγκέντρωση στα επίπεδα των αντιοξειδωτικών (καροτενοειδή, φλαβονοειδή, ασκορβικό οξύ) (Slimestad and Verheul, 2005; Lenucci *et al.*, 2006).

1.1.2. Περιγραφή του καρπού της τομάτας τύπου cherry.

Ο καρπός της τομάτας cherry αποτελείται από το περικάρπιο, το ζελατινώδες παρέγχυμα που περιλαμβάνει τα σπέρματα και τον πλακούντα (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Ανατομία δίχωρου καρπού τομάτας τύπου cherry

Το περικάρπιο προέρχεται από το εξωτερικό τοίχωμα της ωοθήκης και σχηματίζεται από τουλάχιστον δυο καρπόφυλλα που χωρίζονται από το septum. Αποτελείται από το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο και ένα μονοκύτταρο στρώμα ενδοκαρπίου. Ο έλεγχος του ρυθμού αύξησης (Thompson *et al.*, 1998) και η μηχανική ακεραιότητα (Bertin *et al.*, 2000) του καρπού πραγματοποιείται κυρίως από τον ιστό του εξωκαρπίου, ο οποίος αποτελείται από την εφυμενίδα, την επιδερμίδα και μερικές υποδερμικές κυτταρικές στιβάδες. Η φυτική εφυμενίδα καλύπτει την επιδερμίδα σαν μια συνεχής εξωκυτταρική μεμβράνη, και αποτελείται από δύο κυρίως συστατικά που αναφέρονται μαζί ως κηροί, το αδιάλυτο βιοπολυμερές κουτίνη και τα διαλυτά λιπίδια (Kolattukudy, 1980). Μικρές ποσότητες πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων σταδιακά συνδέουν την εφυμενίδα με την επιδερμίδα (Holloway, 1994). Πρωτεΐνες που εκφράζονται στον ιστό του εξωκαρπίου, σχετίζονται με την άμυνα εναντίον παθογόνων (γλυκανάση και χιτινάση) και την αντοχή σε καταστάσεις καταπόνησης (υψηλές θερμοκρασίες, υπεριώδης ακτινοβολία) (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005). Ο κύριος όγκος της κυτταρικής διαίρεσης στο περικάρπιο πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά την άνθηση. Κατά τα πρώιμα στάδια της φάσης της αύξησης των κυττάρων, και ενώ τα κύτταρα του εξωκαρπίου συνεχίζουν να διαιρούνται, τα κύτταρα του μεσοκαρπίου διαστέλλονται και αυξάνουν σημαντικά τον όγκο τους (Joubes *et al.*, 1999), σε σημείο που ξεπερνούν τα 500 μm σε διάμετρο, 25 ημέρες μετά την άνθηση (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005).

Το περικάρπιο περικλείει την κοιλότητα του ζελατινώδους παρεγχύματος όπου βρίσκονται τα σπέρματα προσκολλημένα σε ένα κεντρικό παρεγχυματικό άξονα, που ονομάζεται collumella (Gillaspy *et al.*, 1993). Μετά την γονιμοποίηση των ωοκυττάρων, το περιφερειακό μέρος της collumella εξελίσσεται στον ιστό του ζελατινώδους παρεγχύματος, που τελικά θα περικλείσει τα σπέρματα και θα γεμίσει την κοιλότητα του ζελατινώδους παρεγχύματος. Στους ανώριμους καρπούς το ζελατινώδες παρέγχυμα παρουσιάζεται σφικτό, αλλά καθώς ο καρπός ωριμάζει τα κυτταρικά τοιχώματα αρχίζουν να αποδομούνται, και τελικά ο ιστός αποκτά την εμφάνιση πηκτής (Varga and Bruinsma, 1986). Τα κύτταρα του χαρακτηρίζονται από λεπτά τοιχώματα και μεγάλα χυμοτόπια. Η ποσότητα του ζελατινώδους παρεγχύματος είναι αναλογικά πολύ υψηλότερη στον καρπό τομάτας τύπου Cherry σε σχέση με τις σύγχρονες καλλιεργούμενες ποικιλίες (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005).

Στον ιστό του ζελατινώδους παρεγχύματος έχει βρεθεί ένας απρόσμενα μεγάλος αριθμός γονιδίων (15) που σχετίζονται με τη λειτουργία των χλωροπλαστών (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005), γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ιστός είναι ικανός για φωτοσυνθετική δράση (Laval-Martin *et al.*, 1977) παρά το γεγονός ότι περικλείεται από το περικάρπιο. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι η ποσότητα CO₂ που σχηματίζεται από την αναπνοή του καρπού, και η οποία μπορεί να φτάσει το 25% του εισερχόμενου άνθρακα στον αναπτυσσόμενο καρπό (Ho, 1996), συγκρατείται μερικά από την εφυμενίδα και επαναδεσμεύεται μέσω της φωτοσύνθεσης ή σε συνθήκες σκότους μέσω της PEP καρβοξυλάσης. Αντίθετα, ο ιστός του εξωκαρπίου, στο εξωτερικό μέρος του καρπού, δεν περιέχει πολλούς χλωροπλάστες (Gillaspy *et al.*, 1993).

Ο πλακούντας είναι η περιοχή της ωοθήκης από την οποία εκφύονται οι σπερματικές βλάστες με τις οποίες συνδέονται μέσω του ομφαλικού ιμάντα, και πρόκειται για τον ιστό που τροφοδοτεί τις σπερματικές βλάστες με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξή τους.

1.1.3. Η ανάπτυξη του καρπού.

Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του, το φυτό επενδύει ενέργεια και άνθρακα στην ανάπτυξη του βλαστού και των φύλλων, και την αύξηση του ριζικού συστήματος. Μετά την έναρξη της άνθησης στην κηπευτική τομάτα, ο αναπτυσσόμενος καρπός γίνεται ο σημαντικότερος αποδέκτης των θρεπτικών συστατικών (Kortstee *et al.*, 2007). Όπως είδαμε παραπάνω, κατά τη διαδικασία ανάπτυξης του καρπού της τομάτας τα τοιχώματα της ωοθήκης σχηματίζουν το περικάρπιο, και ένα τμήμα του πλακούντα εξελίσσεται στον ιστό του ζελατινώδους παρεγχύματος που γεμίζει τις κοιλότητες του ζελατινώδους παρεγχύματος και περιβάλλει τα αναπτυσσόμενα σπέρματα (Gillaspy *et al.*, 1993).

Η ανάπτυξη και ωρίμανση του καρπού της τομάτας συνοδεύεται από φυσιολογικές αλλαγές που αντιστοιχούν στην μεταβολή από μερικώς φωτοσυνθετικό σε πλήρως ετεροτροφικό μεταβολισμό. Οι πιο εμφανείς από αυτές είναι η μετατροπή των χλωροπλαστών σε χρωμοπλάστες (Bartley *et al.*, 1994), οι αλλαγές στην σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Scheible and Pauly, 2004), η αύξηση της αναπνοής και της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου, και οι αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνθεση του καρπού.

1.1.3.1. Στάδια ανάπτυξης του καρπού.

Ο Tanksley (2004) αναφέρει τέσσερα στάδια σχηματισμού του καρπού.

1. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει μια χρονική περίοδο 2-3 εβδομάδων από την έναρξη της άνθησης μέχρι τον σχηματισμό του ώριμου άνθους και κατόπιν την επιτυχημένη επικονίαση και γονιμοποίησή του.

2. Ακολουθεί το στάδιο της έντονης κυτταρικής διαίρεσης που αρχίζει με την καρπόδεση και διαρκεί μέχρι περίπου 2 εβδομάδες μετά την γονιμοποίηση. Η περίοδος αυτή χαρακτηρίζεται από υψηλή μεταβολική δραστηριότητα και ταχεία κυτταρική διαίρεση (Gillaspy *et al.*, 1993). Ο ρυθμός της μιτωτικής δράσης (mitotic index) του περικαρπίου τριπλασιάζεται τις πρώτες 10 ημέρες μετά την άνθηση (Kortstee *et al.*, 2007), και οι κυτταρικές στιβάδες του περικαρπίου αυξάνονται από 20 σε 30 (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005). Ο ρυθμός αύξησης και το τελικό μέγεθος του καρπού, καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την κυτταρική παραγωγή κατά την διάρκεια του σχηματισμού της ωοθήκης και των δύο πρώτων εβδομάδων μετά την επικονίαση (Bunger-Kibler and Bangerth, 1983). Η ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης εξαρτάται άμεσα από τα επίπεδα των υδατανθράκων και τη μορφή με την οποία είναι διαθέσιμα (Francis and Halford, 2006).

3. Το τρίτο στάδιο αναφέρεται στην περίοδο της ταχείας κυτταρικής αύξησης κατά την οποία τα κύτταρα διογκώνονται κατά 10 φορές. Η διεύρυνση των κυττάρων αποτελεί την μακρύτερη φάση της ανάπτυξης του καρπού (6 περίπου εβδομάδες) και μπορεί να συμβάλει έως και κατά 90% στην αύξηση του βάρους του καρπού, ανάλογα με την καλλιεργούμενη ποικιλία (Lemaire-Chamley *et al.*, 2005). Σε αυτή τη φάση ο καρπός φτάνει στο μεγαλύτερο μέγεθός του. Όπως και κατά την διάρκεια της ωρίμανσης, έτσι και στην φάση αύξησης των κυττάρων, σημειώνονται σημαντικές δομικές, βιοχημικές και φυσιολογικές αλλαγές. Οι αλλαγές στη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων και η συνεχής συσσώρευση νερού, σακχάρων και οργανικών οξέων στα χυμοτόπια επιτρέπουν τη διατήρηση της πίεσης που διευρύνει τα κύτταρα. Ενώ κάποιοι ιστοί διαφοροποιούνται, λ.χ. ζελατινώδες παρέγχυμα, κάποιοι άλλοι, όπως το εξωκάρπιο, διατηρούν την μιτωτική δραστηριότητα μέχρι αργά στην διαδικασία της ανάπτυξης του καρπού (Joubes *et al.*, 1999; Cong *et al.*, 2002).

4. Ακολούθως, 45 με 55 ημέρες μετά την επικονίαση, λαμβάνει χώρα η ωρίμανση του καρπού. Η ωρίμανση του καρπού ξεκινά αφού τα σπέρματα έχουν σχηματιστεί πλήρως και ο καρπός έχει φτάσει στο τελικό του μέγεθος (Gillaspy *et al.*,

1993; Brady, 1987). Κατά το στάδιο της ωρίμανσης παρατηρούνται οι χημικές και δομικές αλλαγές που καθορίζουν το άρωμα, την γεύση, την υφή και τη βιοχημική σύνθεση του καρπού. Οι οργανοληπτικές ιδιότητες της τομάτας γίνονται πιο έντονες εξαιτίας των δραστικών αλλαγών στην περιεκτικότητα του καρπού σε σάκχαρα, οργανικά οξέα και αμινοξέα (Sorrequieta *et al.*, 2009). Ειδικότερα, το γλουταμινικό και το ασπαραγγινικό οξύ συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην γεύση της (Fuke and Konosu, 1991).

1.1.3.2. Ο αζωτούχος μεταβολισμός κατά την ωρίμανση του καρπού.

Ως όργανα καταβόθρες, οι καρποί εξαρτώνται από τη μεταφορά σακχαρόζης, αμινοξέων και οργανικών οξέων για την ανάπτυξη των κυττάρων τους (Boggio *et al.*, 2000). Στους αναπτυσσόμενους καρπούς τομάτας, περίπου το 70% της ολικής περιεκτικότητας σε αμινοξέα στο περικάρπιο, ανήκει στην οικογένεια του γλουταμινικού οξέος (Valle *et al.*, 1998). Η κυρίαρχη αζωτούχος μορφή στα αρχικά στάδια ανάπτυξης του καρπού ήταν το γ-αμινοβουτυρικό οξύ (GABA), στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού ήταν η γλουταμίνη και στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού ήταν το γλουταμινικό οξύ (Valle *et al.*, 1998; Boggio *et al.*, 2000).

Η συσσώρευση γλουταμινικού οξέος σε καρπούς τομάτας φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας ωρίμανσης. Οι Nagata και Saijo (1992) έδειξαν ότι καρποί τομάτας με παρεμποδιστές ωρίμανσης περιείχαν λιγότερη από την μισή συγκέντρωση σε γλουταμινικό οξύ σε σχέση με τους μάρτυρες.

Η διαδικασία της ωρίμανσης των καρπών στην τομάτα συνοδεύεται από σημαντικές αλλαγές στην πρωτεϊνική σύνθεση του καρπού, κυρίως λόγω της μετατροπής των χλωροπλαστών από χρωμοπλάστες (Bathgate *et al.*, 1985; Kahlau and Bock, 2008). Το γλουταμινικό οξύ είναι πρόδρομη ένωση της βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης (Pontoppidan and Kannangara, 1994). Ο τερματισμός της διαδικασίας βιοσύνθεσης της χλωροφύλλης, φαίνεται ως η λογική αιτία της συσσώρευσης του γλουταμινικού οξέος κατά το στάδιο της ωρίμανσης (Carrari *et al.*, 2006). Ωστόσο, σε μεταλλαγμένο καρπό τομάτας, ο οποίος χαρακτηρίζεται από την μη αποδόμηση των χλωροπλαστών κατά την ωρίμανση, η συγκέντρωση του γλουταμινικού οξέος σημείωσε επίσης αύξηση (Bortolotti *et al.*, 2003), γεγονός που υποδεικνύει ότι η συσσώρευση του γλουταμινικού οξέος στο περικάρπιο ώριμων καρπών τομάτας δεν οφείλεται κατά κύριο λόγο στη μετάβαση από χλωροπλάστες σε χρωμοπλάστες.

Γενικότερα, η περιεκτικότητα σε ελεύθερα αμινοξέα στο περικάρπιο του καρπού της τομάτας αυξάνει στο στάδιο της ωρίμανσης, γεγονός που υποδεικνύει έντονη δράση διάφορων πεπτιδασών και εκτεταμένη αποδόμηση πρωτεϊνών (Boggio *et al.*, 2000; Sorrequieta *et al.*, 2009). Παράλληλα, το γλουταμινικό οξύ είναι η κύρια αζωτούχα μορφή στο χυμό του ηθμού της τομάτας (Valle *et al.*, 1998). Φαίνεται, λοιπόν, ότι στους ώριμους καρπούς ένα μέρος της υψηλής συγκέντρωσης του γλουταμινικού οξέος προέρχεται από την παροχή μέσω του ηθμού, και ένα μέρος σχηματίζεται από την αποδόμηση των ενδογενών πεπτιδίων.

Βασιζόμενοι σε βιοχημικές μελέτες των ενζύμων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των αμινοξέων και στην κινητική των αμινοξέων κατά την ωρίμανση καρπών τομάτας, οι Sorrequieta *et al.* (2009) απέδωσαν την αύξηση της περιεκτικότητας του γλουταμινικού οξέος αφενός στην αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων GDH (αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος) και GABA-T (τρανσαμινάση του γ-αμινοβουτυρικού οξέος) κατά την ωρίμανση, και αφετέρου στην αποφυγή της ανάλωσης του γλουταμινικού οξέος μέσω της GDC (αποκαρβοξυλάση του γλουταμινικού οξέος), η οποία δεν εντοπίστηκε στους ώριμους καρπούς, και της GS (συνθετάση της γλουταμίνης), της οποίας η δραστηριότητα μειώνεται σημαντικά σε σχέση με τους πράσινους καρπούς.

1.2 Η παρθενοκαρπία.

1.2.1. Περιγραφή και σημασία του φαινομένου.

Η ανάπτυξη του καρπού ξεκινά με την επιτυχή γονιμοποίηση των σπερματικών βλαστών και συμβαίνει παράλληλα με τον σχηματισμό των σπερμάτων. Πιστεύεται ότι τα σχηματιζόμενα σπέρματα ελέγχουν σε ένα βαθμό και την ανάπτυξη του καρπού (Denny, 1992; Meinke and Sussex, 1979). Απουσία γονιμοποίησης, συνήθως, τα άνθη δεν αναπτύσσονται περαιτέρω. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρείται σχηματισμός άσπερμων καρπών, είτε σε φυσικά άσπερμες ποικιλίες είτε μετά τον χειρισμό των ανθέων με ορμόνες. Το φαινόμενο κατά το οποίο η ωοθήκη αναπτύσσεται σε άσπερμο καρπό χωρίς να μεσολαβήσουν η επικονίαση και η γονιμοποίηση ονομάζεται παρθενοκαρπία (Lukyanenko, 1991).

Έχουν αναγνωριστεί δυο τύποι φυσικής παρθενοκαρπίας με βάση την ικανότητα παραγωγής βιώσιμων σπερμάτων παρουσία γόνιμης γύρης (George *et al.*, 1984). Στην περίπτωση της προαιρετικής παρθενοκαρπίας, το φυτό είναι ικανό να παράγει

βιώσιμα σπέρματα και οφείλεται σε μηχανισμούς που εμποδίζουν τη γονιμοποίηση. Αντίθετα, τα υποχρεωτικά παρθενοκαρπικά φυτά δεν παράγουν βιώσιμα σπέρματα ακόμα και παρουσία γόνιμης γύρης.

Η φυσική παρθενοκαρπία μπορεί να διεγερθεί και να πραγματοποιηθεί με τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς τρόπους: (α) λόγω διαταραχών και αλλαγών των επιπέδων των φυτικών αυξητικών ορμονών, ιδιαίτερα στους ιστούς της ωοθήκης (Gustafson, 1939), (β) λόγω γονιδιακά κατευθυνόμενων τροποποιήσεων στην παροχή και κατανομή άνθρακα στον αναπτυσσόμενο καρπό (D'Aoust *et al.*, 1999), και (γ) λόγω οργανικών βλαβών που σχετίζονται με την επικονίαση (Yasuda, 1930).

Η καρπόδεση της τομάτας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες που επηρεάζουν το σχηματισμό της γύρης και το άνοιγμα του ανθήρα. Ως αποτέλεσμα αυτού η καλλιέργεια της τομάτας περιορίζεται σε συγκεκριμένες κλιματικές ζώνες (de Jong *et al.*, 2009). Η μικρότερη εξάρτηση του σχηματισμού του καρπού από την επιτυχία της γονιμοποίησης μπορεί να επιτρέψει την παραγωγή της τομάτας σε περιοχές και εποχές μέχρι τώρα ακατάλληλες. Για το λόγο αυτό, η φυσική παρθενοκαρπία στην τομάτα έχει μελετηθεί ευρέως με στόχο την αντιμετώπιση της περιορισμένης ή ανεπιτυχούς καρποφορίας σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η χαμηλή ή η υψηλή υγρασία, η χαμηλή ένταση φωτισμού, οι χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες και οι υψηλής εντάσεως άνεμοι (George *et al.*, 1984).

1.2.2. Ο ρόλος των ορμονών στην εμφάνιση της παρθενοκαρπίας.

Ο Gustafson (1936) παρατήρησε ότι η εφαρμογή αυξινών στα στίγματα φυτών τομάτας προκαλούν την ωοθήκη να αναπτυχθεί σε παρθενοκαρπικό καρπό. Επίσης, ίδια αποτελέσματα σημειώθηκαν με την εφαρμογή εκχυλίσματος γύρης στο εξωτερικό ωοθήκης, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι οι κόκκοι γύρης περιέχουν φυτοορμόνες παρόμοιες των αυξινών. Με την επικονίαση, η γύρη μεταφέρει ικανή ποσότητα των ορμονών αυτών στην ωοθήκη προκαλώντας την ανάπτυξη του καρπού (Gustafson, 1937). Οι Wittwer *et al.* (1957) παρατήρησαν ότι και άλλη μια ομάδα αυξητικών ουσιών, οι γιββερελλίνες, μπορούν να διεγείρουν την εμφάνιση παρθενοκαρπίας και αμέσως μετά αναφέρθηκε η παρουσία φυτοορμονών που προσομοιάζουν με γιββερελλίνες, σε πολλές οικογένειες φυτών (Phinney *et al.*, 1957). Αργότερα οι Sastry and Muir (1963) έδειξαν ότι στην πραγματικότητα οι

βλαστώνοντες γυρεόκκοκοι μεταφέρουν γιββερελλίνη και όχι αυξίνη στην ωοθήκη. Ακολούθως, η γιββερελλίνη επάγει την αύξηση της συγκέντρωσης των αυξινών στην ωοθήκη σε επίπεδα ικανά για την έναρξη του σχηματισμού του καρπού. Σε παρθενοκαρπικές ποικιλίες, οι παραπάνω ορμόνες έχουν φτάσει σε ικανά επίπεδα πριν την επικονίαση, με αποτέλεσμα τη δημιουργία άσπερμων καρπών (Gustafson, 1939; Mapelli *et al.*, 1978). Υπάρχει μια πολύ στενή σχέση ρύθμισης των δυο ορμονών κατά την ανάπτυξη του καρπού, καθώς αφενός η εφαρμογή γιββερελλίνης επάγει την αύξηση της συγκέντρωσης των αυξινών (Sastry and Muir, 1963), και αφετέρου οι αυξίνες φαίνεται να διεγείρουν τη βιοσύνθεση των γιββερελλινών (Koshioka *et al.*, 1994).

Παρά το γεγονός ότι οι ορμόνες που αναφέρθηκαν οδηγούν στην εμφάνιση παρθενοκαρπίας, πιστεύεται ότι επιδρούν με διαφορετικό τρόπο στη διαίρεση και αύξηση των κυττάρων κατά την ανάπτυξη του καρπού. Ο χειρισμός με την φυσική αυξίνη ινδουλο-οξεικό οξύ (IAA), συντομεύει την περίοδο που διαρκεί η φάση της διαίρεσης των κυττάρων (περίπου 10 ημέρες ενώ σε φυσιολογικές συνθήκες διαρκεί 14 ημέρες περίπου). Στην περίπτωση αυτή, ο ρυθμός της διαίρεσης των κυττάρων είναι μεγαλύτερος σε σχέση με ένσπερμο καρπό, με αποτέλεσμα την ταχεία αρχική αύξηση του όγκου του περικαρπίου. Ωστόσο, στη συνέχεια, κατά την επόμενη φάση η αύξηση των κυττάρων είναι περιορισμένη και το τελικό αποτέλεσμα της εφαρμογής IAA είναι καρποί μικρότερου μεγέθους (Bunger-Kibler and Bangerth, 1983). Ο χειρισμός με τις συνθετικές αυξίνες 4-χλωροφαινόξυ-οξεικό οξύ (4-CPA) και 2,4-διχλωροφαινόξυ-οξεικό οξύ (2,4 D), προκαλεί τον σχηματισμό παρθενοκαρπικών καρπών μεγέθους παρόμοιου με ενός ένσπερμου καρπού, ενώ ταυτόχρονα περιέχουν μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων περικαρπίου (Bunger-Kibler and Bangerth, 1983).

Ο χειρισμός με γιββερελλίνες οδηγεί στο σχηματισμό παρθενοκαρπικών καρπών μικρότερου μεγέθους σε σχέση με ένα ένσπερμο καρπό, καθώς παρατηρείται μικρότερος ρυθμός διαίρεσης κυττάρων. Φαίνεται, όμως, ότι το πάχος περικαρπίου είναι σε συγκρίσιμα επίπεδα και ότι αποτελείται από λιγότερα αλλά μεγαλύτερου όγκου κύτταρα (Bunger-Kibler and Bangerth, 1983), γεγονός που υποδεικνύει ότι η διεύρυνση των κυττάρων ενισχύεται με την χρήση γιββερελλινών.

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 (4 εβδομάδες μετά την άνθηση) μπορεί να

μην είναι σημαντική για τη μετέπειτα ανάπτυξη του καρπού. Αντίθετα, ένα χαμηλό επίπεδο ενδογενών γιββερελλίνων 1-4 εβδομάδες μετά την άνθηση ενδέχεται να προκαλέσει παρεμπόδιση της ανάπτυξης (Kataoka *et al.*, 2004).

Είναι γνωστό ότι υψηλές θερμοκρασίες μειώνουν τα επίπεδα των αυξινών και των γιββερελλίνων τις πρώτες ημέρες της ανάπτυξης του νεαρού καρπού (5 με 10 ημέρες μετά την άνθηση) (Kuo and Tsai, 1984; Iwahori, 1967). Πιθανότατα, η ελάττωση στα επίπεδα των ορμονών λόγω υψηλών θερμοκρασιών να ευθύνεται για τα προβλήματα της καρπόδεσης σε θερμές περιόδους. Αντίθετα, στην περίπτωση της φυσικής παρθενοκαρπίας, έχει προταθεί ότι είναι αποτέλεσμα συνθηκών που προκαλούν μια ελάχιστη συγκέντρωση αυξητικών ουσιών στην ωοθήκη ικανή να πυροδοτήσει την αύξηση του καρπού απουσία επικονίασης και γονιμοποίησης (Gustafson, 1939).

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. Οι Kataoka *et al.* (2003) αναφέρουν ότι η ανάπτυξη του ψευδοέμβριου σχετίζεται στενά με την καρπόδεση και την ανάπτυξη. Για αυτό το λόγο τα ψευδοέμβρυα μπορούν να λειτουργήσουν ως υποκατάστατα σπερμάτων σε ότι αφορά τον έλεγχο της ανάπτυξης του καρπού. Στην παρθενοκαρπική ποικιλία *Severianin*, η ανάπτυξη των ψευδοέμβριων συσχετίζεται με την ανάπτυξη του καρπού και βρίσκεται υπό τον έλεγχο της GA3 και/ή του ουνικοναζολίου (uniconazole), ενός παρεμποδιστή της βιοσύνθεσης γιββερελλίνων (Kataoka *et al.*, 2003).

Επίσης έχει αναφερθεί η επαγωγή παρθενοκαρπίας με την χρήση μαλεϊκού υδραζιδίου, στρεπτομυκίνης και πολυαμινών (Schwabe and Mills, 1981). Ωστόσο, 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 γιββερελλίνων υποδεικνύει πως οι πολυαμίνες δεν 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 γιββερελλίνων.

1.2.3. Το γενετικό υπόβαθρο της παρθενοκαρπίας.

Το γενετικό υπόβαθρο της προαιρετικής παρθενοκαρπίας στην τομάτα είναι αντικείμενο μελέτης αρκετών εργασιών (George *et al.*, 1984; Nuez *et al.*, 1986; Philouze, 1983; Vardy *et al.*, 1989; 1989a). Πιο συγκεκριμένα, οι Vardy *et al.* (1989) αναφέρουν ότι στην σειρά RP 75/59, η παρθενοκαρπία κληρονομείται με την μορφή τριών υπολειπόμενων γονιδίων με αθροιστική λειτουργία. Επίσης οι George *et al.* (1984) μελετώντας τις παρθενοκαρπικές σειρές Montfavet 191 και Severianin, αναγνώρισαν δυο διαφορετικές χρωματοσωμικές περιοχές (loci) υπεύθυνες για την εμφάνιση της παρθενοκαρπίας, τις οποίες ονόμασαν *pat* και *pat-2* αντίστοιχα. Τέλος, οι Nuez *et al.* (1986) παρατήρησαν ακόμα μια υπολειμματική χρωματοσωμική περιοχή στο γονιδίωμα τομάτας ποικιλίας Sub Artic Plenty.

Τα γονίδια που εμπλέκονται στην προαιρετική παρθενοκαρπία (*pat-1*, *pat-2*, *pat-3/pat-4*) διεγείρουν ένα ή περισσότερα σκαλοπάτια του μονοπατιού βιοσύνθεσης γιββερελλίνων, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των ενεργών γιββερελλίνων και επομένως το σχηματισμό παρθενοκαρπικών καρπών (Gorguet *et al.*, 2005).

1.2.4. Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας.

Παρά τα όποια πλεονεκτήματα παρουσιάζει το φαινόμενο της παρθενοκαρπίας, η εφαρμογή της στην καλλιέργεια της τομάτας είναι περιορισμένη, καθώς οι μεταλλάξεις που σχηματίζουν άσπερμους καρπούς συχνά συνδέονται με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά όπως αρσενική και θηλυκή στειρότητα και παραμόρφωση καρπών (Varoquaux *et al.*, 2000). Άσπερμοι καρποί που παράγονται σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών (Asakira *et al.*, 1982) αλλά και από τη χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης (Osborne and Went, 1953) συχνά εμφανίζουν δυσμορφίες.

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.

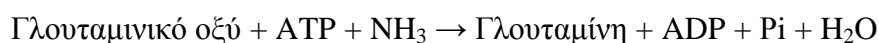
Ο Lukyanenko (1991) αναφέρει πως οι παρθενοκαρπικοί καρποί θεωρούνται πιο γευστικοί και περιέχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση ξηράς ουσίας. Επίσης, περιέχουν περισσότερα διαλυτά στερεά (Falavinga *et al.*, 1978) και υψηλότερα ποσοστά σακχάρων αλλά λιγότερα οξέα (Janes, 1941) και κυτταρίνη σε σχέση με τους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

Η χρήση αυξινών και γιββερελλίνων για την επίτευξη παρθενοκαρπίας, προκαλεί, επίσης, κάποιες διαφοροποιήσεις στην μορφολογία των καρπών. Πιο συγκεκριμένα, η εφαρμογή 2,4D οδηγεί στην εμφάνιση μεγαλύτερου αριθμού ηθμαγγειωδών δεσμίδων οι οποίες συνδέονται με εγκάρσιες τραχειίδες. Οι τραχειίδες αυτές δεν σχηματίζονται στην περίπτωση των φυσιολογικά γονιμοποιημένων ή των χειρισθέντων με γιββερελλίνη καρπών, και ο ρόλος τους πιστεύεται ότι είναι η παροχή θρεπτικών συστατικών στον πολύ υψηλό αριθμό κυττάρων του περικαρπίου κατά την εφαρμογή αυξινών (Serrani *et al.*, 2007). Στην περίπτωση του χειρισμού με γιββερελλίνη ή μεγάλες δόσεις αυξινών, ο ιστός του ζελατινώδους παρεγχύματος δεν αναπτύσσεται (Serrani *et al.*, 2007), και οι σπερματικές βλάστες εκφυλλίζονται. Στους χειρισθέντες με αυξίνη καρπούς, αντίθετα, οι σπερματικές βλάστες δεν εκφυλλίζονται αλλά παρατηρούνται διαιρέσεις των κυττάρων του εσωτερικού χιτώνα και σχηματισμός ψευδοέμβρυων (Serrani *et al.*, 2007).

1.3 Συνθετάση της γλουταμίνης.

1.3.1. Εισαγωγή.

Η συνθετάση της γλουταμίνης (GS, EC 6.3.1.2) απομονώθηκε για πρώτη φορά και χαρακτηρίστηκε το 1956 (από Mifflin and Habash, 2002). Η GS καταλύει την ένωση αμμωνίας και γλουταμινικού οξέος προς το σχηματισμό γλουταμίνης με ταυτόχρονη υδρόλυση ATP. Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της είναι η πολύ μεγάλη συγγένεια της με την αμμωνία ($K_m = 2-50\mu\text{M}$), και επομένως η ικανότητα να ενσωματώνει αποτελεσματικά την αμμωνία σε οργανικούς σχηματισμούς.

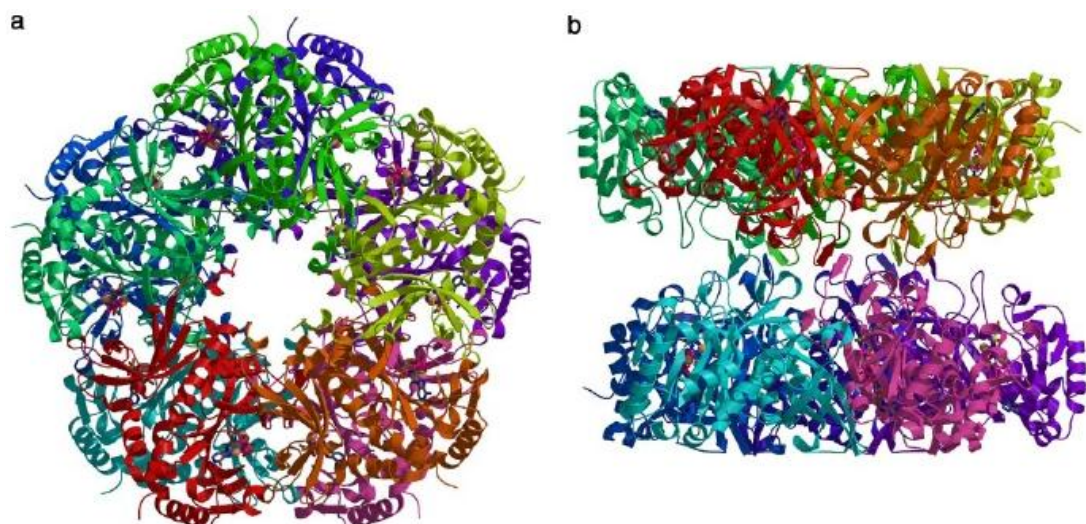


Το ένζυμο λαμβάνει μέρος στο μεταβολισμό του αζώτου, δεσμεύοντας το αμμώνιο που προέρχεται από πρωτογενή αζωτούχα πρόσληψη και από εσωτερικά μονοπάτια ανακύκλωσης του αζώτου. Στα φυτικά κύτταρα, η αφομοίωση του αζώτου πραγματοποιείται σε διαφορετικά τμήματα μεταξύ κυτταροπλάσματος και χλωροπλαστών ανάλογα με την πηγή του αμμωνίου. Ως πρωτογενής προέλευση του αμμωνίου θεωρείται η απευθείας πρόσληψη από το έδαφος, η αναγωγή των νιτρικών ή και του ατμοσφαιρικού αζώτου. Ως δευτερογενείς πηγές θεωρούνται ο καταβολισμός των αμινοξέων, μετά την αποδόμηση των πρωτεϊνών, το άζωτο που παράγεται κατά τη φωτοαναπνοή και η παραγωγή αζώτου από τη δράση των ενζύμων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των φαινυλοπροπανοειδών και των αλκαλοειδών.

1.3.2. Τύποι και Δομή της GS.

Τρεις τύποι της GS έχουν περιγραφεί στους ζωντανούς οργανισμούς, με διαφοροποιημένα μοριακά βάρη, στερεοχημικές δομές και γονιδιακές ακολουθίες. Οι τύποι I και II συναντώνται και σε προκαρυωτικούς και σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς, με την GSI να είναι πιο συχνή στους προκαρυωτικούς και η GSII στους ευκαρυωτικούς. Ο τρίτος τύπος GSIII απομονώθηκε στα βακτηριακά γένη *Bacteroides*, *Butynivbrio* και κάποια κυανοβακτήρια. Εκτιμάται ότι οι τύποι I και II δημιουργήθηκαν από γονιδιακό διπλασιασμό που έλαβε χώρα πριν 3500 εκατομμύρια χρόνια (Kumada *et al.*, 1993), γεγονός που υποδεικνύει το γονίδιο του ενζύμου είναι από τα αρχαιότερα που υφίστανται και λειτουργούν. Στα ανώτερα φυτά πιο άφθονος τύπος είναι ο GSII. Η ύπαρξη γονιδίων που κωδικοποιούν τον τύπο GSI έχουν αναφερθεί στα φυτά *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana* και *Saccharum* sp. (Marthis *et al.*, 2000; Nogueira *et al.*, 2005), αλλά μέχρι στιγμής η λειτουργία τους παραμένει άγνωστη.

Το πολυπεπίδιο της GSII στα φυτά σχηματίζει δεκαμερές (Unno *et al.*, 2006) ενώ το βακτηριακό GSI έχει δωδεκαμερή δομή (Almassy *et al.*, 1986; Krajewski *et al.*, 2005). Τα κυτοπλασμικά GS δεκαμερή αποτελούνται από δυο αντικριστούς πενταμερείς δακτυλίους υπομονάδων, έχουν 10 ενεργά κέντρα, κάθε ένα από τα οποία σχηματίζεται από συνεχόμενες υπομονάδες του πενταμερούς (Unno *et al.*, 2006) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.2: Δομή της πρωτεΐνης GS1a στον αραβόσιτο: (a) Κάτοψη και (b) πλάγια όψη. Κάθε υπομονάδα αναπαρίσταται με διαφορετικό χρώμα (Unno *et al.*, 2006):

1.3.3. Οι ισότυποι της GS.

Στα ανώτερα φυτά συναντούμε δυο ισότυπους του τύπου II οι οποίες διαφέρουν ως προς τις βιοχημικές τους ιδιότητες και το μοριακό βάρος των υπομονάδων τους, με την πλαστιδιακή μορφή να έχει μεγαλύτερο μοριακό βάρος (44-45 KDa) από την κυτοπλασμική μορφή (38-40 KDa) (Forde and Cullimore, 1989). Η σχετική συγκέντρωση των δυο ισότυπων διαφέρει μεταξύ των φυτών και μεταξύ των οργάνων του ίδιου φυτού, και εξαρτάται από το φωτοσυνθετικό τύπο του φυτού και από τις συνθήκες ανάπτυξης (Hirel *et al.*, 1993). Στα ώριμα φύλλα των C_4 φυτών λ.χ., η αναλογία της συγκέντρωσης της κυτοπλασμικής προς την πλαστιδιακή GS είναι πολύ μεγαλύτερη σε σχέση με τα C_3 φυτά (Becker *et al.*, 1993). Η υψηλή περιεκτικότητα σε κυτοπλασμική GS1 στα φύλλα των C_4 φυτών οφείλεται στην μικρή φωτοαναπνευστική δραστηριότητα και στο διαχωρισμό των διαδικασιών της φωτοαναπνοής και της αναγωγής των νιτρικών σε διαφορετικά διαμερίσματα (ηθμαγγειώδεις δεσμίδες του κολεού και μεσόφυλλο αντίστοιχα) (Oaks, 1994).

Τα δυο ισόζυμα ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο σε συγκεκριμένα κύτταρα και όργανα, ανάλογα με τα μεταβολικά και περιβαλλοντικά ερεθίσματα και το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Αυτή η εξειδίκευση εξασφαλίζει τη γρήγορη επαναδέσμευση του αμμωνίου που προέρχεται από διάφορες πηγές.

Η αρχική θέση των Edwards *et al.* (1990) ότι η κυτοπλασμική και η χλωροπλαστική ισόμορφη της GS έχουν μη επικαλυπτόμενες λειτουργίες σε

φωτοσυνθετικούς και μη ιστούς έχει επιβεβαιωθεί από πλήθος μεταγενέστερων εργασιών (Pereira *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 1992).

Στα ανώτερα φυτά η GS κωδικοποιείται από μια οικογένεια γονιδίων του πυρήνα και όχι από οργανιδιακό DNA. Στα αγγειόσπερμα το χλωροπλαστικό ισοένζυμο GS2 κωδικοποιείται από ένα γονίδιο (Lightfoot *et al.*, 1988; Peterman and Goodman, 1991), ενώ η κυτοπλασμική μορφή GS1 από δυο έως πέντε γονίδια (Cullimore *et al.*, 1984; Bennet *et al.*, 1989). Τα γενετικά δεδομένα δείχνουν ότι η GS2 είναι ομομερής (αποτελείται από όμοιες υπομονάδες), ενώ η GS1 μπορεί να είναι ομο- ή ετερο-μερής πρωτεΐνη. Σύμφωνα με φυλογενετικές μελέτες τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δυο ισομορφές προέρχονται από το διπλασιασμό ενός κοινού προγόνου πριν από 300 εκατομμύρια χρόνια, νωρίτερα δηλαδή από τη διαφοροποίηση των μονοκότυλων και δικότυλων φυτών (Kumada *et al.*, 1993).

1.3.3.1. Ο κυτοπλασμικός ισότυπος (GS1).

Ο κυτοπλασμικός ισότυπος του ενζύμου (GS1) εντοπίζεται κυρίως σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς (ρίζες, κόνδυλοι), αλλά και σε φωτοσυνθετικούς ιστούς σε πολλή μικρότερη αναλογία στο ολικό ένζυμο από την GS2. Σε εργασία που αφορούσε φυτά καπνού φάνηκε ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ισότυπο Gln1-3, εκφράζεται σε ρίζες και άνθη, ενώ το γονίδιο που κωδικοποιεί τον ισότυπο Gln1-5 μεταγράφεται σε υψηλό βαθμό στο βλαστό και μικρότερο βαθμό σε ρίζες και άνθη (Dubois *et al.*, 1996).

Η GS1 κωδικοποιείται από μικρή οικογένεια γονιδίων, τα οποία εξελικτικά, είναι υψηλώς συντηρημένα στα διάφορα φυτικά είδη. Τα γονίδια αυτά ρυθμίζονται σε σχέση με τα επίπεδα και τη μορφή του αζώτου των φυτών, και από περιβαλλοντικά ερεθίσματα όπως η διαθεσιμότητα του αζώτου και βιοτικές ή και αβιοτικές καταπονήσεις.

Η GS1 μπορεί να είναι ομο- ή ετερομερής. Στην τελευταία περίπτωση πολλά διαφορετικά ενζυμικά μόρια (διαφορετικά GS1 ισοένζυμα) μπορεί να είναι ενεργά είτε ταυτόχρονα, είτε σε διαφορετικό χρόνο ή ιστό. Σε φυμάτια απομονώθηκαν διάφορα ισοένζυμα GS_n που ήταν ενεργά την ίδια στιγμή (Temple *et al.*, 1996), ενώ δυο διαφορετικά ισοένζυμα GS1 ήταν ταυτόχρονα ενεργά σε φύλλα και ρίζες κριθαριού (Mack, 1995). Τα προϊόντα του γονιδίου *StGS1a* σε φυτά πατάτας εμπλέκονται στο μηχανισμό ρύθμισης της προλίνης, ενώ τα προϊόντα του γονιδίου

StGS1b δεσμεύουν το αμμώνιο που προέρχεται από τον καταβολισμό των πρωτεϊνών κατά τη γήρανση (Teixeira *et al.*, 2005). Σε φύλλα ζαχαρότευτλου (Brechlin *et al.*, 1999), η σύνθεση των υπομονάδων της GS1 μεταβλήθηκε από ετερομερή σε ομομερή κατά τη γήρανση και μάρανση των φύλλων. Η μεταβολή στη σύνθεση των υπομονάδων συνοδεύεται με αλλαγές στη δραστικότητα και την κινητική των ισοενζύμων και αποτελεί ένα τρόπο ρύθμισης της δραστικότητας των ενζύμων.

Ο ρόλος του κυτοπλασμικού ισότυπου GS1 είναι διπλός (Bernard and Habash, 2009). α) Η αφομοίωση NH_4^+ από πρωτογενείς πηγές σε ρίζες, φυμάτια και φύλλα και β) η δέσμευση του NH_4^+ που προέρχεται από επανακινητοποίηση του αζώτου.

Ο εντοπισμός πολυπεπτιδίων και μεταγραφημάτων κυτοπλασμικού GS στις ρίζες (Sukanya *et al.*, 1994; Ishiyama *et al.*, 2004a) και η παρατήρηση ότι η θέση μεταγραφημάτων του γονιδίου *OsGln1;2* συμπίπτει με τις θέσεις πρόσληψης αζώτου (Sonoda *et al.*, 2003; Ishiyama *et al.*, 2004a; Tabuchi *et al.*, 2007), οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η GS1 συμμετέχει στην αφομοίωση του αμμωνίου κατά την πρωτογενή πρόσληψη αζώτου.

Πρωτογενής πρόσληψη του αμμωνίου μπορεί να πραγματοποιηθεί και στα κύτταρα του ξυλώδους παρεγχύματος του βλαστού κατά τη μεταφορά του προσληφθέντος αμμωνίου από τις ρίζες στα φύλλα (Finnemann & Schjoerring, 1999).

Αφομοίωση του νιτρικού αζώτου είναι δυνατόν να συμβαίνει στις ρίζες ή στο βλαστό. Σε ρίζες κριθαριού (οπού κυρίως απαντάται η GS1 μορφή) η δραστικότητα της GS ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση νιτρικής λίπανσης, χωρίς όμως ανάλογη αύξηση της συγκέντρωσης των πολυπεπτιδίων. Αυτό υποδεικνύει ότι η κυτοπλασμική GS εμπλέκεται και στη δέσμευση αμμωνίου που προέρχεται από την αναγωγή νιτρικών και ότι λαμβάνει χώρα μετα-μεταφραστική ρύθμιση που εξαρτάται από την πηγή του αζώτου (Peat & Toblin, 1996).

Στα ετήσια C_3 φυτά η GS1 δεν είναι τόσο άφθονη στο μεσόφυλλο όσο στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των φύλλων και του βλαστού και ιδιαίτερα στα παρεγχυματικά κύτταρα γύρω από αυτές, γεγονός που σημαίνει ότι και εκεί λαμβάνει χώρα αφομοίωση αμμωνίου (Kamachi *et al.*, 1992; Carvalho *et al.*, 2000).

Η GS1 εντοπίζεται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες τόσο των C_3 όσο και των C_4 ειδών (Sakurai *et al.*, 1996; Kichey *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006). Ο εντοπισμός της κυτοπλασμικής GS στις ηθμαγγειώδεις ιστούς και η ρύθμισή της από παράγοντες ανάπτυξης υποδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της στην επανακινητοποίηση του αζώτου.

Η συγκέντρωση GS1 στα κύτταρα μεσόφυλλου φυτών τομάτας ως αντίδραση σε παράγοντες καταπόνησης, όπως η παρουσία παθογόνων (Perez-Garcia *et al.*, 1998) και η γήρανση (Brugiere *et al.*, 2000; Kichey *et al.*, 2005) υποδεικνύουν ότι ο ισότυπος αυτός κατέχει κεντρικό ρόλο στην επαναδέσμευση του αζώτου που απελευθερώνεται κατά την κατάρρευση του φυτοσυνθετικού μηχανισμού.

Η αύξηση των επιπέδων των μεταγραφημάτων της GS1 και της παρουσίας GS1 υπομονάδων κατά τη γήρανση των φύλλων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο κυτοπλασμικός ισότυπος στα φύλλα εμπλέκεται στο σχηματισμό γλουταμίνης. Η γλουταμίνη στην συνέχεια μετακινείται από τα γερασμένα φύλλα στα όργανα καταβόθρες (sink) (Ochs *et al.*, 1999), είτε αυτά είναι σπέρματα στα ετήσια φυτά (Hirel *et al.*, 2001; Habash *et al.*, 2007) είτε όργανα διαχείμασης στα πολυετή φυτά (Cooke & Weih, 2005). Το 98% της ολικής δραστηριότητας της GS στα γερασμένα φύλλα, αποδίδεται στην δράση της GS1. Στο τέλος της διαδικασίας της γήρανσης, η GS1 ήταν το μόνο ενεργό ισοένζυμο, γεγονός που υποδεικνύει ότι η GS1 είναι πολύ ανθεκτική στην πρωτεϊνική και ενζυμική αποδόμηση κατά τη γήρανση. Κατά τη γήρανση των φύλλων, λοιπόν, φαίνεται ότι ο ρόλος της GS1 είναι η δέσμευση του αμμωνίου από τον καταβολισμό των αμινοξέων.

Γνωστός είναι και ο ρόλος της κυτοπλασμικής GS στην επανακινητοποίηση του αζώτου κατά το γέμισμα των σπερμάτων και αργότερα κατά την βλάστησή τους. Σημαντική συσχέτιση έχει παρατηρηθεί μεταξύ αριθμού και μεγέθους σπερμάτων και ενός γονιδίου (*OsGln1;1*) που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη GS στο ρύζι (Yamaya *et al.*, 2002; Obara *et al.*, 2004). Σε φυτά αραβόσιτου έχει επίσης αναφερθεί σχέση μεταξύ δραστηριότητας της GS1 και σποροπαραγωγής (Hirel *et al.*, 2001; Gallais & Hirel, 2004). Ομοίως, στο σιτάρι η δραστηριότητα της GS (χλωροπλαστική και κυτοπλασμική) έδειξε θετική συσχέτιση με την περιεκτικότητα των σπόρων σε άζωτο (Habash *et al.*, 2007).

Κατά τη βλάστηση των σπερμάτων, ο ρυθμός αύξησης των φυταρίων εξαρτάται από την απελευθέρωση των θρεπτικών συστατικών από τις αποθηκευτικές ενώσεις. Η GS1 έχει ανιχνευτεί σε έμβρυα τόσο των σπερμάτων των σιτηρών όσο και λαχανικών. Οι Limami *et al.* (2002) υποστηρίζουν ότι υψηλή δραστηριότητα της GS1 σε βλαστάνοντα σπέρματα αραβόσιτου οδηγεί σε ταχύτερη βλάστηση.

Τέλος, οι Brugiere *et al.* (1999) συνέδεσαν την παρουσία της GS1 στον ηθμό φυτών καπνού με τη ρύθμιση της παραγωγής προλίνης που είναι ένα οργανικό μόριο

που αποθηκεύει προσωρινά άζωτο σε νεαρά αναπτυσσόμενα φύλλα ή σε συνθήκες οσμωτικής καταπόνησης.

1.3.3.2. Ο πλαστιδιακός ισότυπος (GS2).

Η GS2 έχει βρεθεί στα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια των περισσότερων φωτοσυνθετικών ιστών όπως φύλλα, βλαστός, περικάρπιο και άνθη. Στα C₃ φυτά η GS2 είναι η κυρίαρχη μορφή σε όλους τους φωτοσυνθετικούς ιστούς. Ακόμα και κατά τη γήρανση φύλλων καπνού, όπου παρατηρείται επαγωγή της κυτοπλασμικής GS1 και μερική αποδόμηση των χλωροπλαστών, η χλωροπλαστική GS2 παραμένει η κυρίαρχη μορφή GS (αναλογία 75%-25% σε ηλικιωμένα φύλλα, 95%-5% σε νεαρά φύλλα) (Masclaux *et al.*, 2000). Αντίθετα, στα C₄ φυτά παρατηρούνται και οι δύο ισότυποι GS2 και GS1 με την ίδια αναλογία (McNally *et al.*, 1983). Στα C₄ φυτά ο κολεός των δεσμίδων περιέχουν χλωροπλάστες όπου λαμβάνει χώρα φωτοαναπνοή (σε μικρότερους ρυθμούς σε σχέση με τα C₃ φυτά). Για το λόγο αυτό η GS2 στα C₄ φυτά (π.χ. αραβόσιτος) εντοπίζεται εξίσου στα κύτταρα του μεσόφυλλου και στον κολεό των δεσμίδων (Kamachi *et al.*, 1992). Επιπλέον, σε λίγα είδη φυτών, η GS2 ανιχνεύτηκε σε πλαστίδια ριζών, και σε κόνδυλους σε πολύ μικρές όμως ποσότητες (Peat & Toblin, 1996).

Οι Wallsgrave *et al.* (1987) υποστηρίζουν ότι η GS2 στα φύλλα έχει διπλό ρόλο: α) την επαναδέσμευση του φωτοαναπνευστικού NH₄⁺ στα μιτοχόνδρια και β) την αφομοίωση του πρωτογενούς NH₄⁺ (αναγωγή νιτρικών στους χλωροπλάστες) στον κύκλο GS/GOGAT.

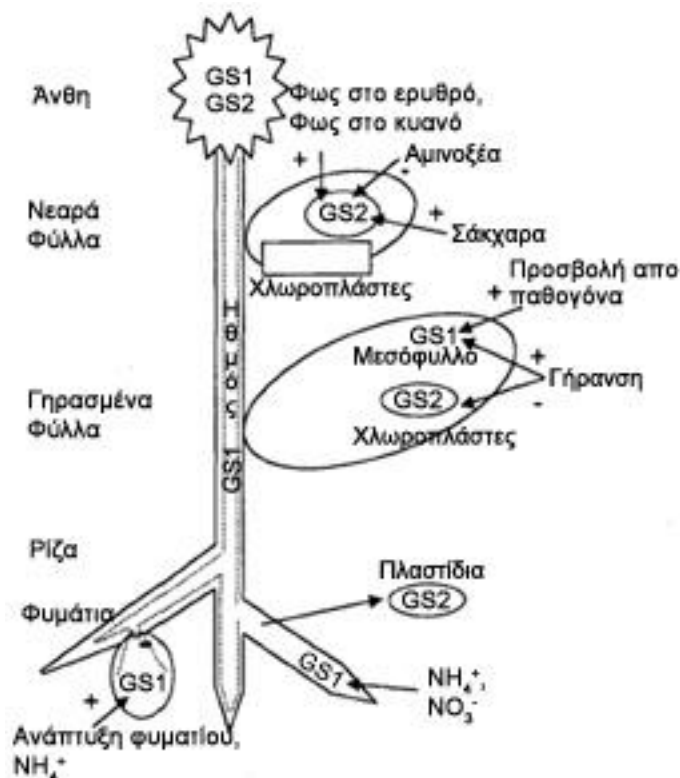
Στα ανώτερα φυτά η φωτοαναπνευστική οξείδωση της γλυκίνης στα μιτοχόνδρια των φύλλων απελευθερώνει αμμώνιο σε μεγάλες ποσότητες (Keys *et al.*, 1978). Το χλωροπλαστικό στρώμα και τα κυτοπλασμικά διαμερίσματα στα φωτοσυνθετικά κύτταρα είναι ελαφρώς αλκαλικά. Σε αυτές τις συνθήκες το 0,5-1% του ολικού αμμωνίου συναντάται με την μορφή της ελεύθερης αμμωνίας, η οποία είναι πολύ δραστηρικός κυτοτοξικός μεταβολίτης. Η GS2 καταλύει την εξαρτώμενη από το ATP μετατροπή του γλουταμινικού οξέος και της τοξικής αμμωνίας σε μη τοξική μιτοχονδριακή γλουταμίνη. Ακολούθως, η γλουταμίνη, έχει την δυνατότητα να μετακινηθεί στους χλωροπλάστες με παθητική μεταφορά και εκεί να μετατραπεί σε γλουταμινικό οξύ με τη δράση της συνθάσης του γλουταμινικού (GOGAT, EC 1.4.7.1) (Somerville and Ogren, 1980).

Το γονίδιο *GLN2*, που κωδικοποιεί για τους πρόδρομους της GS2, εντοπίστηκε στα μιτοχόνδρια και τους χλωροπλάστες των φύλλων του φυτού *Arabidopsis thaliana* (Taira *et al.*, 2004).

Σύμφωνα με γενετικά δεδομένα, η GS2 αποτελείται από όμοιες υπομονάδες. Συνεπάγεται ότι η ρύθμιση της δραστηριότητας του ενζύμου μέσω μεταβολών στην σύνθεση των υπομονάδων, δεν είναι πιθανή. Ωστόσο, σε διάφορες μελέτες απομονώθηκαν περισσότερες από μια υπομονάδες GS2 (Hirel *et al.*, 1984; Hopfner *et al.*, 1988; Mack 1995, 1998). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι τα διαφορετικά ισοένζυμα της GS2 οφείλονται σε μετά-μεταγραφικές τροποποιήσεις. Οι Woodal and Forde (1996) ξεχώρισαν δυο GS2 ισοένζυμα σε όσπρια.

1.3.4. Ρύθμιση της GS.

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η δραστηριότητα της GS στα φυτά ρυθμίζεται σε επίπεδο μεταγραφής ή και σε επίπεδο σταθερότητας RNA (Teixeira *et al.*, 2005). Ερευνητικά δεδομένα (Finnemann and Schjoerring, 2000; Cren and Hirel, 1999) υποδεικνύουν ότι η GS1 ρυθμίζεται επίσης και σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο. Μερικοί παράγοντες που επηρεάζουν τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της GS παρουσιάζονται σχηματικά στο **σχήμα 1.1** και αναλύονται παρακάτω.



Σχήμα 1.1: Σχηματική παρουσίαση της ρύθμισης της GS στα ανώτερα φυτά. Το σύμβολο + αντιστοιχεί σε θετική επίδραση και το - σε αρνητική. (Cren and Hirel, 1999):

Η θρεπτική κατάσταση του φυτού

Παρά το γεγονός ότι το αμμώνιο αποτελεί υπόστρωμα της GS, μελέτες έχουν δώσει αντιφατικές πληροφορίες ως προς τη σχέση των δύο. Σε ορισμένα φυτά όπως λ.χ. ρύζι, σόγια, τομάτα, φαίνεται ότι η αμμωνιακή λίπανση επάγει την έκφραση του γονιδίου της κυτοπλασμικής GS1 ενώ σε άλλα (ηλίανθος) δεν συμβαίνει κάτι τέτοιο (Migge *et al.*, 1996; Sakakibara *et al.*, 1996; Finnemann and Schjoerring, 1999; Hirel *et al.*, 2005). Ασαφή είναι και τα συμπεράσματα για την επίδραση του NH_4^+ στη δραστηριότητα της GS, που κάποιες φορές λειτουργεί ως ανασταλτικός παράγοντας και άλλες φορές ως διεγερτικός. Στο ζαχαρότευτλο η επίδραση της αμμωνιακής λίπανσης στη δραστηριότητα των δύο ισοενζύμων είχε άμεση σχέση με το όργανο του φυτού που μελετήθηκε (Brechlin *et al.*, 2000). Πιο συγκεκριμένα, στις ρίζες πριν από τη μετατροπή τους σε αποθησαυριστικά όργανα, η αμμωνιακή λίπανση οδήγησε σε 2-7πλάσια αύξηση στη δραστηριότητα της GS1 συγκρινόμενη με τη νιτρική λίπανση. Αντίθετα στα φύλλα η δραστηριότητα της GS1 ήταν δυο φορές μικρότερη σε καθεστώς αμμωνιακής θρέψης, ενώ στους μίσχους δεν υπήρχε διαφορά. Η δραστηριότητα της GS2 ήταν μέγιστη στα ώριμα και ηλικιωμένα φύλλα και μάλιστα διπλάσια στην περίπτωση της αμμωνιακής λίπανσης.

Η παρουσία αμμωνίου, και γενικότερα τα επίπεδα και οι μορφές του αζώτου στο φυτό, ρυθμίζουν τα γονίδια GS σε μεταγραφικό επίπεδο (Kozaki *et al.*, 1992; Sukanya *et al.*, 1994; Sonoda *et al.*, 2003; Ishiyama *et al.*, 2004b). Η σταθερότητα των μεταγραφημάτων αποτελεί άλλον ένα τρόπο ρύθμισης της GS1 σε σχέση με την αζωτούχα θρέψη (Ortega *et al.*, 2006).

Αυξημένα επίπεδα GS1 πολυπεπτιδίων παρατηρήθηκαν στα φύλλα φυτών *Arabidopsis thaliana* Wassileskija σε συνθήκες ανεπάρκειας αζώτου, πιθανόν επειδή το ένζυμο συμμετέχει στη δέσμευση αμμωνίου από τον καταβολισμό πρωτεϊνών (Lemaitre *et al.*, 2008).

Οι Zozaya-Hinchliffe *et al.* (2005) αναφέρουν την εμφάνιση του ενζύμου GS2 σε ρίζες τριφυλλιού, αμέσως μετά από προσθήκη νιτρικών.

Ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι η ρύθμιση της αζωτούχου δέσμευσης εξαρτάται από τη θρεπτική κατάσταση του φυτού. Έτσι έχει αναφερθεί ότι αζωτούχοι N και ανθρακούχοι C μεταβολίτες ρυθμίζουν την έκφραση της GS σε φυτά *Arabidopsis* (Oliveira and Coruzzi, 1999) και καπνού (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2005).

Ανθρακούχες ενώσεις που επάγουν τη σύνθεση και των δυο ισομορφών GS είναι η σακχαρόζη και το 2-οξογλουταρικό οξύ (Miflin and Habash, 2002).

Φυσιολογική γήρανση

Η ολική GS δραστηριότητα μειώθηκε στο ένα τέταρτο της αρχικής κατά τη γήρανση των φύλλων του φυτού *Oryza sativa* (Kamachi *et al.*, 1991). Λαμβάνοντας υπόψη το φυσιολογικό ρόλο της GS2 στην επαναδέσμευση του NH_4^+ κατά την φωτοαναπνοή και επειδή ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης και της φωτοαναπνοής είναι παρόμοιος κατά την διάρκεια της ζωής των φύλλων του ρυζιού, η ολική πτώση της GS αποδόθηκε κυρίως στη μείωση της συγκέντρωσης της GS2. Σε αντίθεση με την GS2 και άλλα χλωροπλαστικά ένζυμα (όπως η Fd-GOGAT), η GS1 παρέμεινε σταθερή κατά τη διάρκεια της γήρανσης. Στην ίδια περίοδο παρατηρήθηκε τετραπλάσια αύξηση των μεταγραφημάτων της GS1, ελάττωση κατά 6 φορές της περιεκτικότητας σε γλουταμινικό οξύ, και τριπλάσια αύξηση της συγκέντρωσης της γλουταμίνης. Φαίνεται ότι κατά τη γήρανση των φύλλων η GS1 οδηγεί σε σύνθεση γλουταμίνης η οποία κατόπιν μεταφέρεται στους αναπτυσσόμενους ιστούς του φυτού (Ochs *et al.*, 1999).

Στο σιτάρι δυο γονίδια κυτοπλασμικής GS ρυθμίζονται με διαφορετικό τρόπο κατά τη γήρανση των φύλλων (Bernard *et al.*, 2008). Πιο συγκεκριμένα, το πλήθος των μεταγραφημάτων του γονιδίου *GS1* στα φύλλα, σημείωσε αύξηση από το στάδιο της άνθησης και μετά, ενώ τα μεταγραφήματα του γονιδίου *GSr* διατηρήθηκαν σε σταθερό επίπεδο μέχρι σχεδόν το τέλος της ανάπτυξης των φυτών.

Οι Finnemann and Schjoerring (2000) υποστηρίζουν ότι η ρύθμιση της κυτοπλασμικής GS κατά τη γήρανση πραγματοποιείται επιπλέον μέσω φωσφορυλίωσης και προσκόλλησης σε 14-3-3 πρωτεΐνες, κυρίως λόγω της αύξησης της σταθερότητας του ενζύμου.

Περιβαλλοντικές συνθήκες – Συνθήκες καταπόνησης

Η δραστηριότητα της GS σε φύλλα τομάτας παρουσίασε ημερήσια διακύμανση με μεγαλύτερες τιμές την ημέρα και μικρότερες τη νύχτα (Canovas *et al.*, 1986). Σε μια ημερήσια διάρκεια 24 ωρών η δραστηριότητα της GS κορυφώθηκε κατά την φωτεινή περίοδο και είχε την μικρότερη τιμή στο σκοτάδι.

Φως συγκεκριμένου μήκους κύματος φαίνεται ότι επάγει μετά-μεταγραφικές τροποποιήσεις των υπομονάδων της GS2 σε κοτυληδόνες τομάτας. Οι Migge *et al.*

(1996) αναφέρουν ότι η επίδραση φωτός στο ερυθρό και στο κυανό τμήμα του φάσματος οδήγησε σε αύξηση της συγκέντρωσης της GS2 και ενεργοποίησε την τροποποίηση των GS2 υπομονάδων με αποτέλεσμα την εμφάνιση δυο πρωτεϊνών GS2 με διαφορετικά μοριακά βάρη.

Δράση φωτοεπαγόμενου πλαστιδιακού GS2 έχει παρατηρηθεί επίσης σε φυτά φασολιού *Phaseolus vulgaris* (Lightfoot *et al.*, 1988) και κριθαριού *Hordeum vulgare* (Freeman *et al.*, 1990).

Το γονίδιο *gln-δ* που κωδικοποιεί το χλωροπλαστικό ισότυπο της GS2 σε φυτά φασολιού, εκφράστηκε πολύ λίγο στο σκοτάδι αλλά λειτούργησε έντονα σε συνθήκες φωτός. Ωστόσο, η συγκέντρωση του mRNA του *gln-δ* δεν είχε άμεση συσχέτιση με την ροή του αμμωνίου που προέρχεται από το φωτοαναπνευστικό μονοπάτι και η ρύθμιση του γονιδίου μέσω του φωτός δεν ελέγχεται από την φωτοαναπνοή (Cock *et al.*, 1991). Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου GS1 στην τομάτα δεν επηρεάστηκε από το φως (Migge *et al.*, 1996).

Σε συνθήκες ξηρασίας ή αλατότητας, η συγκέντρωση και η δραστηριότητα των πολυπεπτιδίων της GS2 στα φύλλα μειώνεται, ενώ ταυτόχρονα η GS1 αυξάνεται ή διατηρείται σταθερή (Bauer *et al.*, 1997; Lutts *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2004; Martinelly *et al.*, 2007). Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν το ρόλο της GS1 στην δημιουργία γλουταμίνης για την μεταφορά του αζώτου που απελευθερώνεται στα φύλλα.

Κατά την προσβολή από παθογόνα, έχει παρατηρηθεί αύξηση των μεταγραφημάτων της GS1 και παραγωγή νέων μορφών πρωτεϊνών GS (Perez-Garcia *et al.*, 1995, 1998; Pageau *et al.*, 2006; Tavernier *et al.*, 2007). Οι Pageau *et al.* (2006) αναφέρουν αυξημένη παραγωγή μεταγραφημάτων της GS μετά από προσβολή των φυτών από ιούς ή βακτήρια και υποστηρίζουν ότι η επαγωγή της δράσης της GS δεν σχετίζεται με αντίδραση υπερευαισθησίας αλλά ότι ακολουθεί το μοντέλο έκφρασης γονιδίων αρχικής άμυνας. Ομοίως σε φυτά φασολιού που εκτέθηκαν σε παθογόνα και μη στελέχη μυκήτων, οι Tavernier *et al.* (2007) κατέγραψαν αυξημένα μεταγραφήματα του γονιδίου *Gln-a*. Μάλιστα παρατήρησαν ότι η έκφραση του *Gln-a* ακολούθησε την έκφραση του γονιδίου *PAL3*, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η κυτοπλασμική GS συνέβαλε στην αφομοίωση του αμμωνίου που ελευθερώθηκε από τη δράση της PAL.

Αύξηση της δραστηριότητας της κυτοπλασμικής GS1 παρατηρήθηκε σε φυμάτια ριζών των ψυχανθών (Forde and Cullimore, 1989). Η αύξηση αυτή αποδόθηκε σε μια

νέα μορφή ετερομερούς GS, της οποίας το ένα πολυπεπίδιο κωδικοποιείται από γονίδιο που εκφράζεται μόνο στα μολυσμένα κύτταρα.

Οι Gomez-Maldonado *et al.* (2004) υποστηρίζουν ότι η ρύθμιση της κυτοπλασμικής GS, σε αρχικά στάδια ανάπτυξης πεύκης, ελέγχεται και από ορμόνες, κυρίως από γιββεριλλικό οξύ. Τα αποτελέσματα της επίδρασης φυτοορμονών (αιθυλένιο) ή ουσιών που προκαλούν καταπονήσεις (σαλικυλικό οξύ, ιασμονικό οξύ) σε φυτά καπνού (Pageau *et al.*, 2006) θύμιζαν τις επιδράσεις της φυσιολογικής γήρανσης και πιο συγκεκριμένα οδήγησαν σε (1) μείωση της έκφρασης των γονιδίων της χλωροπλαστικής GS2, (2) μείωση της ολικής δραστηριότητας της GS, (3) αύξηση της έκφρασης της κυτοπλασμικής GS1.

Ρύθμιση σε μετα-μεταγραφικό επίπεδο

Οι Finnemann and Schjoerring (2000) υποστηρίζουν ότι σε συνθήκες σκότους η GS1 φωσφορυλιώνεται και δεσμεύει 14-3-3 πρωτεΐνες, σχηματίζοντας σταθερό σύμπλοκο. Αντίστροφα, σε συνθήκες φωτισμού, η GS1 αποφωσφορυλιώνεται και είναι ευπαθής στην αποδόμηση.

Οι Riedel *et al.* (2001) έδειξαν ότι υπάρχει μετα-μεταγραφική ρύθμιση της δραστηριότητας της χλωροπλαστικής GS2 σε φυτά καπνού μέσω της ένωσης της με πρωτεΐνες 14-3-3. Πιο συγκεκριμένα η πρόσδεση των πρωτεϊνών 14-3-3 διατηρεί το οκταμερές GS2 σταθερό και ενεργό.

Φωσφορυλίωση και ακολούθως αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες 14-3-3 παρατηρήθηκαν και από τους Moorhead *et al.* (1999).

Σε φυτά σόγιας οι Ortega *et al.* (1999) υποστηρίζουν ότι η GS είναι δυνατόν να υποστεί οξειδωση από ελεύθερες ρίζες οξυγόνου, και ότι η οξειδωμένη μορφή είναι αδρανής και επιρρεπής σε αποδόμηση. Σημειώνοντας ότι η δημιουργία ριζών οξυγόνου είναι ιδιαίτερα αυξημένη σε φυσιολογικές δυσλειτουργίες (π.χ. γήρανση, καταπονήσεις, παθογόνα) και ότι τα υποστρώματα της GS (γλουταμινικό οξύ και ATP) προστατεύουν το ένζυμο από την οξειδωση και την αδρανοποίηση, καταλήγουν ότι η οξειδωτική μετατροπή της GS αποτελεί ένα τρόπο μετα-μεταγραφικού ελέγχου του ενζύμου.

1.3.5. Η GS κατά την ωρίμανση καρπών τομάτας.

Η ωρίμανση των καρπών της τομάτας συνοδεύεται με αποδόμηση των χλωροπλαστικών πρωτεϊνών και σύνθεση νέων. Συνήθως κατά την περίοδο από την

έναρξη της καρποφορίας έως το τέλος της ζωής του φυτού, απαιτείται συμπληρωματική θρέψη. Η δέσμευση του αμμωνίου είναι κρίσιμη στις διεργασίες ωρίμανσης των καρπών. Κατά το στάδιο της αύξησης του καρπού επικρατούν αναβολικές διεργασίες, δηλαδή οι καρποί αφομοιώνουν θρεπτικά συστατικά για να σχηματίσουν χλωροπλάστες ώστε ο πράσινος καρπός να φωτοσυνθέτει (Smillie *et al.*, 1999). Όταν σταματήσει η αύξηση των καρπών και ξεκινήσει η διαδικασία της ωρίμανσης, το οργανικό άζωτο μεταφέρεται μεταξύ των μεταβολιτών, απελευθερώνεται με τη μορφή της αμμωνίας και επαναδεσμεύεται πολλές φορές.

Σε εργασία των Scarpeci *et al.* (2007) μελετήθηκε η επίδραση της θρεπτικής κατάστασης των φυτών στη δέσμευση του αμμωνίου σε ώριμους καρπούς τομάτας της ποικιλίας Micro-Tom. Σε καθεστώς κανονικής θρέψης παρατηρήθηκε δραστηριότητα του ενζύμου στους χλωροπλάστες (GS2) καρπών στο στάδιο του πράσινου ώριμου καρπού, αλλά δεν εντοπίστηκε καθόλου στους χρωμοπλάστες ή στο κυτόπλασμα κόκκινων καρπών. Τα αποτελέσματα συμφωνούν και με προηγούμενες μελέτες (Boggio *et al.*, 2000; Pratta *et al.*, 2004).

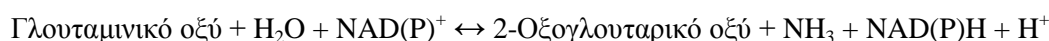
Αντίθετα σε καθεστώς συμπληρωματικής λίπανσης η GS παρατηρήθηκε και σε ώριμους κόκκινους καρπούς. Επιπλέον, σημειώθηκε μεγάλη συγκέντρωση μεταγραφημάτων της GS1 σε κόκκινους καρπούς υπό αυξημένη θρέψη. Το γονίδιο GS1 εκφράζεται επίσης και στα γηρασμένα φύλλα τομάτας (Perez-Rodriguez and Valpuesta, 1996). Μάλιστα βρέθηκε ότι τα μεταγραφήματα της GS1 ήταν πιο άφθονα στους κόκκινους καρπούς παρά στα φύλλα. Η πλούσια σε άζωτο συμπληρωματική λίπανση μπορεί να προσομοιάζει με την θρεπτική κατάσταση κατά την γήρανση των φύλλων, προάγοντας το σχηματισμό GS1. Αυτό υποδηλώνει ότι η έκφραση της GS1 στους ώριμους καρπούς τομάτας ρυθμίζεται από τη θρεπτική κατάσταση του φυτού, και πιο συγκεκριμένα από τις πηγές αζώτου.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι σε καρπούς σε στάδιο ώριμου πράσινου καρπού και υπό κανονική θρέψη πραγματοποιήθηκε δέσμευση αμμωνίου μέσω της GS2, ενώ στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού παρατηρείται συγκέντρωση της GS1, πιθανόν για να δεσμευτούν τα επιπλέον αζωτούχα συστατικά της συμπληρωματικής λίπανσης.

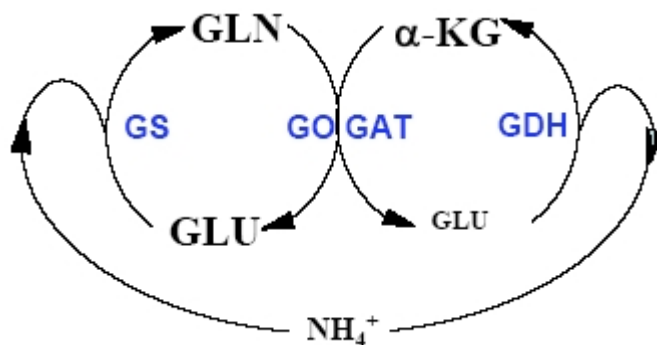
1.4 Αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος.

1.4.1. Εισαγωγή.

Η αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος (GDH, EC 1.4.1.2-4) αποτελεί μια ομάδα ενζύμων που καταλύουν την αντιστρεπτή αντίδραση της οξειδωσης του γλουταμινικού οξέος προς το σχηματισμό 2-οξογλουταρικού οξέος και αμμωνίας (Qiu *et al.*, 2009), το οποίο συνδέεται άμεσα με τον κύκλο του Krebs (Fisher, 1985) και κατέχει σημαντικό ρόλο συνδέσμου του μεταβολισμού του άνθρακα και του αζώτου.



Το αμμώνιο που ελευθερώνεται, σε κανονικές συνθήκες, από το γλουταμινικό οξύ με τη δράση της GDH, επαναδεσμεύεται από την GS και εισέρχεται στο μονοπάτι GS/GOGAT, αποκαλύπτοντας την ύπαρξη ενός συνεχούς κύκλου όπου ανακυκλώνονται το γλουταμινικό οξύ και το αμμώνιο (Labboun *et al.*, 2009). Η GDH, δηλαδή, αποτελεί μέρος μιας ομάδας ενζύμων που ελέγχουν τα επίπεδα των δύο μορίων στα φυτά, διατηρώντας την ομοιόσταση του γλουταμινικού οξέος και εμποδίζοντας την συσσώρευση του αμμωνίου (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Η συνδυασμένη δράση του ενζύμου GDH και του μονοπατιού GS/GOGAT σχηματίζει ένα κλειστό κύκλο που ανακυκλώνει το αμμώνιο και το γλουταμινικό οξύ, κρατώντας σταθερά τα επίπεδα των δυο μορίων (Labboun *et al.*, 2009):

1.4.2. Τύποι, Δομή και Εντοπισμός της GDH.

Τα ένζυμα GDHs είναι οικουμενικά και εντοπίζονται τόσο σε προκαρυωτικούς οργανισμούς όσο και σε διάφορα υποκυτταρικά διαμερίσματα των ευκαρυωτικών κυττάρων. Οι Syntichaki *et al.* (1996) συνέκριναν φυλογενετικά τα ένζυμα GDH διαφόρων οργανισμών και βρήκαν ότι οι ισότυποι των φυτών έχουν μεγαλύτερη

εξελικτική σχέση με τους ισότυπους των αρχαιοβακτηρίων παρά με αυτούς των σπονδυλωτών.

Έχουν αναφερθεί δυο τύποι GDH (Britton *et al.*, 1992) με βάση τη δομή τους: (α) τετραμερή NAD-εξαρτώμενα ένζυμα, τα οποία αποτελούνται από όμοιες υπομονάδες και (β) εξαμερή ένζυμα, τα οποία αποτελούνται από το συνδυασμό τουλάχιστον δυο πολυπεπτιδίων-υπομονάδων. Τα εξαμερή GDH χρησιμοποιούν γενικά ως συνένζυμο το NADP(H) (EC 1.4.1.4), το NAD(H) (EC 1.4.1.2), ή και τα δύο (EC 1.4.1.3).

Η φυλογενετική ανάλυση έχει κατηγοριοποιήσει τα γονίδια GDH των φυτών σε δυο τύπους (Qiu *et al.*, 2009), που αντιστοιχούν και στην ομαδοποίηση με βάση το συνένζυμο (NADPH ή NADH) που χρησιμοποιεί το ένζυμο. Η πλειοψηφία των GDH γονιδίων τύπου I θεωρείται ότι αντιστοιχούν στο ένζυμο NADP(H)-GDH (EC 1.4.1.3 και EC 1.4.1.4), ενώ τα γονίδια τύπου II αντιστοιχούν στο ένζυμο NAD(H)-GDH (EC 1.4.1.2). Η ύπαρξη GDH γονιδίων και των δυο τύπων τόσο στα μονοκότυλα όσο και στα δικότυλα φυτά υποδεικνύει ότι ο διαχωρισμός των δυο τύπων γονιδίων προηγήθηκε του διαχωρισμού μονοκότυλων – δικότυλων (Pavesi *et al.*, 2000; Vandepoele *et al.*, 2003; Purnell *et al.*, 2005).

Στα ανώτερα φυτά η πιο διαδεδομένη μορφή είναι το μιτοχονδριακό NAD(H)-εξαρτώμενο ένζυμο (Dubois *et al.*, 2003). Ωστόσο, σε μικρό αριθμό ειδών, έχει παρατηρηθεί και NADP(H)-εξαρτώμενη δραστηριότητα σε πλαστίδια και μιτοχόνδρια (Lea and Thurman, 1972; Leech and Kirk, 1968; Yakovleva *et al.*, 1964).

Ο μιτοχονδριακός εντοπισμός της NAD(H)-GDH είναι γνωστός από αρκετά ωρίς (Bone, 1959) και έχει επιβεβαιωθεί από πολλές μεταγενέστερες μελέτες σε διάφορους ιστούς και σε διάφορα είδη φυτών (Paczek *et al.*, 2002; Maki *et al.*, 2002; Becker *et al.*, 1993). Παράλληλα με το μιτοχονδριακό κλάσμα, δραστηριότητα της GDH έχει παρατηρηθεί και στο κυτόπλασμα γηρασμένων οργάνων και ιστών. Πιο συγκεκριμένα, η κυτοπλασμική GDH έχει εντοπιστεί σε άνθη αμπέλου στο τελευταίο στάδιο ανάπτυξής τους (Paczek *et al.*, 2002), στις κοτυληδόνες αρτιβλάστων κολοκυθιάς (όπου παρατηρείται επανακινητοποίηση αποθηκευτικών πρωτεϊνών παρόμοια με αυτή της γήρανσης φύλλων, Chou and Splittstoesser, 1972) και σε γηρασμένα φύλλα καπνού (Lancien *et al.*, 2000).

Ιδιαίτερα έντονη είναι η δραστηριότητα του ενζύμου NAD(H)-GDH τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο κυτόπλασμα των συνοδών κυττάρων του ηθμού (Terce-Laforgue *et al.*, 2004; Kichey *et al.*, 2005).

1.4.3. Οι ισότυποι της GDH.

Η πιο διαδεδομένη φυτική μορφή του ενζύμου, η NAD(H)-GDH, είναι εξαμερής πρωτεΐνη που σχηματίζεται από δυο πολυπεπίδια-υπομονάδες, α (43 KDa) και β (42,5 KDa), με παρόμοιες αντιγονικές ιδιότητες αλλά διαφορετική μοριακή μάζα και ηλεκτρικό φορτίο (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990a; 1991). Οι δυο υπομονάδες ενώνονται σε διάφορες αναλογίες σχηματίζοντας δυο ομοεξαμερή και πέντε ετεροεξαμερή ισοένζυμα: β_6 , $\beta_5\alpha_1$ έως $\beta_1\alpha_5$, και α_6 (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991; Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Purnell *et al.*, 2005; Miyashita and Good, 2008).

Αν και τα δυο ομοεξαμερή ισοένζυμα εμφανίζουν σχεδόν όμοιες κινητικές ιδιότητες *in vitro* (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1996), είναι πιθανό να καταλύουν αντίθετες αντιδράσεις και να έχουν διαφορετικούς φυσιολογικούς ρόλους. Έτσι, το ομοεξαμερές ισοένζυμο β_6 , *in vivo* και υπό κανονικές συνθήκες, λειτουργεί μονάχα στην κατεύθυνση της απαμίνωσης του γλουταμινικού οξέος (Purnell and Botella, 2007), ενώ το ομοεξαμερές ισοένζυμο α_6 εκτός από τον κυρίως ρόλο της προς την κατεύθυνση της απαμίνωσης, παρουσιάζει και μικρή δραστηριότητα στην κατεύθυνση της αμίνωσης (Skopelitis *et al.*, 2007).

Γενικότερα, το β -πολυπεπίδιο σχετίζεται με την καταβολική αντίδραση, ενώ το α -πολυπεπίδιο παρουσιάζει και μικρή αναβολική δράση. Φαίνεται ότι κάθε GDH ισοένζυμο παρουσιάζει, ανάλογα με την σύνθεση του από α και β πολυπεπίδια, καταβολικές ή αναβολικές ιδιότητες διαφορετικής έντασης (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991).

Πολλές εργασίες συμφωνούν στην ύπαρξη τουλάχιστον δύο γονιδίων που κωδικοποιούν το κάθε ένα από μια από τις υπομονάδες α και β του ενζύμου NAD(H)-GDH (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991; Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Pavesi *et al.*, 2000; Purnell *et al.*, 2005; Skopelitis *et al.*, 2007; Miyashita and Good, 2008).

Σε φυτά *Arabidopsis thaliana* έχουν χαρακτηριστεί δυο γονίδια NAD(H)-GDH των οποίων η έκφραση διέφερε σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης, το είδος του ιστού και τις συνθήκες θρέψης (Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Turano *et al.*, 1997; Miyashita and Good, 2008). Ομοίως σε φυτά καπνού βρέθηκαν δύο γονίδια GDH των οποίων η έκφραση ήταν διαφορετική σε συνθήκες καταπόνησης όπως αλατότητα, μεταβολές θερμοκρασίας και βαριά μέταλλα (Restivo, 2004).

Εκτός από τα γονίδια που κωδικοποιούν τη NAD(H)-GDH υπάρχει διαφορετικό γονίδιο που κωδικοποιεί την NADP(H)-GDH, με αποτέλεσμα να υπάρχουν τουλάχιστον 3 γονίδια στα φυτά που κωδικοποιούν τους διάφορους ισότυπους της GDH (Turano *et al.*, 1997).

Τα μέλη μιας *GDH* ομάδας 4 γονιδίων στο γονιδίωμα φυτών ρυζιού (*OsGDH1-4*) δεν παρουσιάζουν διαφορές μόνο στην αλληλουχία, αλλά και στην έκφρασή τους σε κανονικές συνθήκες ή σε συνθήκες καταπόνησης, υποδεικνύοντας διαφορετικούς λειτουργικούς ρόλους (Qiu *et al.*, 2009).

Η σύνθεση και σχετική συγκέντρωση των ισοενζύμων της GDH στα φυτά εξαρτάται από το είδος του φυτού, το στάδιο ανάπτυξης και από τις θρεπτικές και περιβαλλοντικές συνθήκες. (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991; Loulakakis *et al.*, 1994; Purnell and Botella, 2007). Έχει αναφερθεί ότι δύο ή και τρεις ακόμα ισότυποι της GDH είναι δυνατόν να συνυπάρχουν σε ένα κύτταρο (Jaspard, 2006).

Η έκφραση του κάθε γονιδίου της GDH σε ένα φυτικό είδος ρυθμίζεται με διαφορετικό τρόπο σε σχέση με το είδος του ιστού. Στις ρίζες του *Arabidopsis thaliana*, λ.χ., παρατηρήθηκε ότι η έκφραση των δύο γονιδίων που μελετήθηκαν ήταν αντιστρόφως ανάλογη (Miyashita and Good, 2008). Οι Melo-Oliveira *et al.* (1996) αναφέρουν ότι τα επίπεδα mRNA της *GDH1*, στο ίδιο φυτό, ήταν υψηλά στα φύλλα αλλά όχι στις ρίζες. Ομοίως, τα ισοένζυμα της GDH 5 έως 7 ήταν άφθονα σε ρίζες, ενώ τα ισοένζυμα 1 έως 3 ήταν η κυρίαρχη μορφή σε φύλλα (Turano *et al.*, 1997; Fontaine *et al.*, 2006).

1.4.4. Ο φυσιολογικός ρόλος της GDH

Το ένζυμο GDH αναφερόταν για πολύ καιρό ως το βασικό ένζυμο δέσμευσης αζώτου, μέχρι την αποκάλυψη από τους Lea και Mifflin (1974) του μονοπατιού GS/GOGAT (glutamine synthetase/ glutamate synthase) το οποίο θεωρείται σήμερα ως ο κύριος τρόπος αφομοίωσης ανόργανου αζώτου στα φυτά.

Πράγματι, η αδυναμία να επιβιώσουν μεταλλαγμένα φυτά χωρίς τον πλαστιδιακό ισότυπο του ενζύμου GS (Leegood *et al.*, 1995), και η σχετικά μικρότερη συγγένεια της GDH για το αμμώνιο συγκρινόμενη την αντίστοιχη της GS (η K_m της GDH για την αφομοίωση αμμωνίου κυμαίνεται στα 7-100 mM είναι, δηλαδή, πάνω από 100 φορές μεγαλύτερη από την αντίστοιχη της GS) (Stewart *et al.*, 1980), οδήγησε στην γενική διαπίστωση ότι η GDH, υπό κανονικές συνθήκες, παίζει

ασήμαντο ρόλο στην δέσμευση του αμμωνίου όταν εξετάζεται συνολικά το φυτό (Labboun *et al.*, 2009).

Η επικρατέστερη άποψη όσον αφορά το ρόλο της GDH σε ζωντανά κύτταρα είναι η απαμίνωση του γλουταμινικού οξέος και ο σχηματισμός 2-οξογλουταρικού οξέος, για αναπλήρωση υδατανθράκων (Dubois *et al.*, 2003). Διάφορα πειράματα με σήμανση με ^{15}N - ή ^{13}C - έχουν αποδείξει την δράση του ενζύμου στην κατεύθυνση αυτή, ιδιαίτερα όταν τα επίπεδα άνθρακα στο φυτό είναι περιορισμένα (Aubert *et al.*, 2001; Fox *et al.*, 1995; Robinson *et al.*, 1992; Stewart *et al.*, 1995; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). Το 2-οξογλουταρικό οξύ που σχηματίζεται από τη καταβολική δράση της GDH εξέρχεται από το μιτοχόνδριο, πιθανόν με την βοήθεια του μεταφορέα δικαρβοξυλικών-τρικαρβοξυλικών οξέων (Picault *et al.*, 2004). Το κετο-οξύ κατόπιν μπορεί να δεχτεί την αμινομάδα από αμινοξέα, καθώς οι αμινοτρανσφεράσες στα φυτά προτιμούν ως υπόστρωμα τρανσαμίνωσης το 2-οξογλουταρικό οξύ (Glevarec *et al.*, 2004). Με τον τρόπο αυτό οι ανθρακικοί σκελετοί των αμινοξέων ελευθερώνονται για να χρησιμοποιηθούν στην αναπνοή. Το γεγονός ότι το ένζυμο GDH και διάφορες αμινοτρανσφεράσες συνεντοπίζονται στα μιτοχόνδρια (Lierman and Olsen, 2004), υποστηρίζει το μοντέλο αυτό. Ιδιαίτερα όταν οι πηγές άνθρακα είναι περιορισμένες (έλλειψη υδατανθράκων, γήρανση, σκότος κ.α.), συνθήκες που ευνοούν την αποδόμηση των πρωτεϊνών μέσω της αυτοφαγικής διαδικασίας και επομένως την αύξηση των ελεύθερων αμινοξέων, η δράση του ενζύμου εξασφαλίζει επαρκή επίπεδα ανθρακικών σκελετών για τη λειτουργία του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος (Maestri *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 1991; Yu, 1999).

Κάποιες μελέτες υποστηρίζουν και την αναβολική λειτουργία της GDH (στην κατεύθυνση της βιοσύνθεσης του γλουταμινικού οξέος) σε φυτικούς ιστούς, είτε σε συγκεκριμένες συνθήκες ανάπτυξης (βλάστηση σπερμάτων, γήρανση) είτε σε συνθήκες καταπόνησης (θερμοκρασία, σκότος, αλατότητα κ.α.) (Srivastava and Singh, 1987; Ferrario-Mery *et al.*, 2002; Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Osuji and Madu, 1996; Frechilla *et al.*, 2002; Terce-Laforgue *et al.*, 2004). Σύμφωνα με αυτές τις εργασίες, η GDH λειτουργεί συμπληρωματικά του μονοπατιού GS/GOGAT στην δέσμευση NH_4^+ , κυρίως σε συνθήκες που οδηγούν σε υψηλές συγκεντρώσεις αμμωνίου. Παρατηρήθηκε, λ.χ., αφομοίωση σημασμένου $^{15}\text{NH}_4^+$ προς σχηματισμό γλουταμινικού οξέος μέσω της GDH, σε συνθήκες καταπόνησης άλατος, παρουσία αναστολέα της δράσης της GS (Skopelitis *et al.*, 2006).

Ωστόσο, οι Glevarec *et al.* (2004) σε πείραμα με χρήση $^{15}\text{NH}_4^+$ στη μηδική, και οι Robinson *et al.* (1991) σε *in vivo* και *in vitro* φασματοσκοπικές παρατηρήσεις σε φυτά καρότου, επιβεβαιώνουν ότι η GDH δεν εμπλέκεται στην αφομοίωση του αμμωνίου.

Εξαιτίας της σύνδεσης του ενζύμου τόσο με το μεταβολισμό του άνθρακα όσο και με του αζώτου, έχει προταθεί ο ρόλος της GDH ως ένα ευέλικτο ένζυμο το οποίο δρα ανάλογα με τις ανάγκες του κυττάρου σε ανθρακικούς σκελετούς ή γλουταμινικό οξύ, και διατηρεί την ισορροπία αζώτου και άνθρακα (Ireland and Lea, 1999; Stitt *et al.*, 2002; Mifflin and Habash, 2002). Ομοίως, οι Terce-Laforgue *et al.* (2004) αναφέρουν αύξηση της δραστηριότητας της GDH και στα μιτοχόνδρια και στο κυτόπλασμα των συνοδών κυττάρων του ηθμού, όταν η συγκέντρωση του αμμωνίου ξεπέρασε κάποιο όριο. Βασισμένοι σε αυτό προτείνουν ότι το ένζυμο δρα ως μόριο ικανό να ανιχνεύσει το C/N καθεστώς του φυτού εκτιμώντας τα επίπεδα αμμωνίου και σακχάρων στην ροή του χυμού στον ηθμό.

Η εμπλοκή της GDH στο μονοπάτι GS/GOGAT προσφέρει ένα μηχανισμό που ανταποκρίνεται στις διαφορετικές ανάγκες των κυττάρων σε υποστρώματα άνθρακα και αζώτου (Mifflin and Habash, 2002). Αποτελεί, επίσης, ένα μέσο ρύθμισης της συγκέντρωσης του γλουταμινικού οξέος, η οποία παραμένει αξιόλογα σταθερή στα φύλλα (Stitt *et al.*, 2002). Σε αυτό το πλαίσιο, η λειτουργία της GDH φαίνεται να δημιουργεί ένα φαινομενικά μάταιο κύκλο (**Εικόνα 1.3**). Ωστόσο, οι διάφορες αντιδράσεις λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, ακόμα και σε διαφορετικά κύτταρα, και διαφέρουν χρονικά μέσα στον ημερήσιο κύκλο. Αυτό δίνει πολλές δυνατότητες για τη ρύθμιση του συστήματος ώστε να αποφεύγεται μια μάταια ανακύκλωση της αμμωνίας.

Μια εναλλακτική θεωρία για τη λειτουργία της GDH υποστηρίζει ότι το ένζυμο δεν έχει σημαντική συμμετοχή στο μεταβολισμό N και C, αλλά λειτουργεί ως πρωτεΐνη παρακολούθησης και προειδοποίησης καταστάσεων καταπόνησης καθώς εμπλέκεται στην εποπτεία της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του φυτού (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 2001). Η υπόθεση αυτή στηρίζεται στις ευμετάβλητες βιοχημικές και καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου μέσω της σύνθεσης των υπομονάδων του όσο και στον εντοπισμό του σε αγγειακούς ιστούς.

Επιπλέον, κάποιοι ερευνητές προτείνουν το ρόλο της φυτικής GDH ως ένζυμο αντίδρασης σε συνθήκες καταπόνησης, καθώς χαρακτηρίζεται από σημαντική σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και έχει παρατηρηθεί η σύνθεσή της σε

διάφορες καταστάσεις καταπόνησης (Syntichaki *et al.*, 1996; Restivo, 2004). Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι τα φυτικά κύτταρα αντιμετωπίζουν τις συνθήκες καταπόνησης με το σχηματισμό μορφών ενεργού οξυγόνου (ROS, κυρίως O₂⁻ και H₂O₂). Αυτά φαίνεται ότι δρουν ως σήματα που επάγουν την έκφραση της α-υπομονάδας της GDH, την σύνθεση ισοτύπων όπου επικρατεί η α-υπομονάδα, και αυξάνουν τελικά τη δραστικότητα του ενζύμου στην κατεύθυνση της αμίνωσης. (Skopelitis *et al.* 2006).

Τέλος, η αντίδραση που καταλύεται από την GDH στην κατεύθυνση της απαμίνωσης, εκτός των άλλων, έχει σημασία και στην παραγωγή ενέργειας, καθώς παράγεται NADH το οποίο μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης σχηματίζει ATP (Miyashita and Good, 2008).

1.4.5. Ρύθμιση της GDH.

Η ρύθμιση των ισοτύπων της GDH γίνεται με διαφορετικό τρόπο, και το γεγονός αυτό οδηγεί σε διαφορές ως προς τον αριθμό και το είδος των ισοενζύμων GDH που συνυπάρχουν σε συγκεκριμένο ιστό και χρόνο και που επιτελούν διαφορετικές, μη επικαλυπτόμενες λειτουργίες (Miyashita and Good, 2008; Qiu *et al.*, 2009).

Όπως είδαμε πιο πάνω, σε ένα φυτικό είδος υπό την επίδραση κάποιου παράγοντα ρύθμισης της έκφρασης, το είδος του ιστού επηρεάζει, πρωταρχικά, τον τρόπο που επάγεται η λειτουργία των γονιδίων της *GDH* (Miyashita and Good, 2008). Σε συγκεκριμένο ιστό, λοιπόν, η δραστικότητα του ενζύμου, η κατεύθυνση της αντίδρασης που καταλύεται, και ο αριθμός των ισοενζύμων που συνυπάρχουν, ρυθμίζεται από το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, τη θρεπτική του κατάσταση και από τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Srivastava and Singh, 1987). Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων της GDH αναλύονται παρακάτω.

Η θρεπτική κατάσταση του φυτού

Υψηλά επίπεδα αμμωνίου, είτε από εξωτερικές πηγές (Cammaerts and Jacobs, 1985; Lea and Ireland, 1999) είτε ως αποτέλεσμα πρωτεϊνικής υδρόλυσης (Limami *et al.*, 2002; Masclaux *et al.*, 2000), οδήγησε σε αύξηση της δραστικότητας της GDH. Επιπλέον συνδυάστηκε με αλλαγές στην παρουσία και στις αναλογίες των ισοενζύμων. Η συγκέντρωση των α και β υπομονάδων αλλά και των σχηματιζόμενων ισοενζύμων μεταβάλλεται σε σχέση με την εξωτερική πηγή αζώτου (Loulakakis and

Roubelakis-Angelakis, 1991). Όταν κάλλος αμπέλου μεταφέρθηκε από νιτρικό σε αμμωνιακό υπόστρωμα, η δραστηριότητα της GDH αυξήθηκε 3 φορές και η συγκέντρωση της α-υπομονάδας αυξήθηκε 4 φορές με παράλληλη μείωση της συγκέντρωσης της β-υπομονάδας (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1992). Οι Turano *et al.* (1997) αναφέρουν ότι η προσθήκη αμμωνίου σε φυτά *Arabidopsis* επάγει την έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την α-υπομονάδα του ενζύμου GDH. Σε φύλλα αραβοσίτου η δραστηριότητα της GDH στην κατεύθυνση της αμίνωσης διπλασιάστηκε όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν με περίσσεια αζωτούχας λίπανσης, ενώ αυξήθηκε 4 φορές στην κατεύθυνση της απαμίνωσης σε φυτά που καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες έλλειψης αζώτου (Hirel *et al.*, 2001). Σε υποκυτταρικό επίπεδο, οι Terce-Laforgue *et al.* (2004) παρατήρησαν διπλή δράση του ενζύμου στα συνοδά κύτταρα του ηθμού: στα μιτοχόνδρια σε συνθήκες χαμηλής αμμωνιακής συγκέντρωσης και στο κυτόπλασμα σε συνθήκες υψηλής αμμωνιακής συγκέντρωσης. Τέλος παρατηρήθηκε υψηλή δραστηριότητα της NADH-GDH μετά από προσθήκη αζωτούχας λίπανσης, ενώ αντίθετα, η δραστηριότητα της NADPH-GDH στα πλαστίδια δεν επηρεάστηκε από την παροχή αζώτου (Joy, 1969).

Σε συνθήκες έλλειψης υδατανθράκων έχει παρατηρηθεί αύξηση τα επίπεδα των GDH μεταγραφημάτων και στη δραστηριότητα του ενζύμου (Miyashita and Good, 2008). Η αύξηση αυτή είναι αντιστρεπτή με την προσθήκη διαλυτών σακχάρων (Athwal *et al.*, 1997; Robinson *et al.*, 1992; Sahulka and Lisa, 1980). Σε πείραμα με ¹⁵N-σήμανση οι Aubert *et al.* (2001) έδειξαν ότι η GDH παρέχει 2-οξογλουταρικό οξύ στους ιστούς όταν οι ποσότητες άνθρακα είναι περιορισμένες. Σε κύτταρα καρότου, υπό συνθήκες έλλειψης άνθρακα, η δραστηριότητα της GDH αυξήθηκε 10 φορές (Robinson *et al.*, 1991). Ο αριθμός και η δραστηριότητα των ισομορφών GDH αυξήθηκε, όταν εμβρυακοί άξονες λούπινου και φασολιού καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες έλλειψης σακχάρων (Morkunas *et al.*, 2000; Lehmann *et al.*, 2003). Προσθήκη σακχαρόζης στο θρεπτικό μέσο ανέστρεψε τα αποτελέσματα. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν τον καταβολικό ρόλο της GDH στην παροχή εναλλακτικής πηγής άνθρακα στην αναπνευστική οδό, μέσω της αποδόμησης των αμινοξέων, σε συνθήκες αστίας σακχάρων (Dubois *et al.*, 2003; Melo-Oliveira *et al.*, 1996).

Η κατεύθυνση της αντίδρασης που καταλύει η GDH, εξαρτάται από πηγές αζώτου και άνθρακα. Το αμμώνιο, η γλουταμίνη και τα σάκχαρα ευνοούν την βιοσυνθετική κατεύθυνση της αμίνωσης, ενώ νιτρικά, γλουταμινικό οξύ και έλλειψη άνθρακα ευνοούν την καταβολική αντίδραση της απαμίνωσης (Lancien *et al.*, 2000).

Σε καλλιέργεια κάλλων αμπέλου, το β-πολυπεπτιδίο ήταν πιο άφθονο σε περιβάλλον με νιτρικά ή γλουταμινικό οξύ, ενώ το α-πολυπεπτιδίο κυριάρχησε παρουσία αμμωνίου ή γλουταμίνης (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1991). Επίσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση του αριθμού των ισότυπων του ενζύμου μετά από προσθήκη αμμωνίου ή αμινοξέων, και μείωση μετά από προσθήκη σακχαρόζης (Srivastava and Singh, 1987).

Το στάδιο ανάπτυξης του φυτού

Τα επίπεδα της GDH στο φυτό μεταβάλλονται σε σχέση με την ηλικία και το στάδιο ανάπτυξής του. Γενικά, αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου έχει παρατηρηθεί κατά τα πρώτα στάδια της βλάστησης και της αρχικής ανάπτυξης του φυτού, σε ρίζα (Masurowa *et al.*, 1980; Sairam *et al.*, 1975; Quetz *et al.*, 1982), υποκοτύλιο (Masurowa *et al.*, 1980), κοτυληδόνες (Fawole, 1977), βλαστό (Quetz *et al.*, 1982) και φύλλα (Sairam *et al.*, 1975; Cammaerts and Jacobs, 1985). Οι Lehmann και Ratajczak (2007) υποστηρίζουν ότι η λειτουργία των ισοενζύμων στο στάδιο της βλάστησης είναι η καταβολική δράση στις τρανσαμινώσεις των αμινοξέων που προέρχονται από την αποδόμηση των αποθηκευτικών πρωτεϊνών.

Αύξηση των επιπέδων GDH συνδέεται, επίσης, με την περίοδο άνθησης και καρποφορίας σε δένδρα *Citrus* (Ramamurthy and Ludders, 1982), και αύξηση της δραστηριότητας και προς τις δυο κατευθύνσεις παρατηρείται σε ρίζες και φύλλα φυτών *Arabidopsis* μετά τον σχηματισμό των ανθοφόρων οφθαλμών (Cammaerts and Jacobs, 1985).

Κατά την ωρίμανση των καρπών της τομάτας έχει αναφερθεί αύξηση στα επίπεδα της NADH-GDH (με ταυτόχρονη μείωση των επιπέδων της ολικής GS), με αποτέλεσμα την συσσώρευση του γλουταμινικού οξέος στους ώριμους καρπούς (Boggio *et al.*, 2000). Κατά την ωρίμανση καρπών αβοκάντο παρατηρήθηκε 4-πλάσια αύξηση της δραστηριότητας της GDH, συνοδευόμενη από παρόμοια αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και των μεταγραφημάτων m-RNA. Σε επίπεδο ισοενζυμικών μορφών παρατηρήθηκαν, επίσης, μεταβολές. Σε μη ώριμους καρπούς επικρατούν τα ισοένζυμα που στην σύνθεσή τους συμμετέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό η β-υπομονάδα. Αντίθετα, σε ώριμους καρπούς επικρατούν τα ισοένζυμα που στη σύνθεσή τους συμμετέχει σε μεγαλύτερο ποσοστό η α-υπομονάδα (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1994).

Διάφορες μελέτες αναφέρουν αύξηση της δραστηριότητας της GDH σε γηρασμένα φύλλα, συνοδευόμενη με μεταβολές των εμφανιζόμενων ισοενζύμων (Lauriere and Daussant, 1983; Kar and Feierabend, 1984a, 1984b; Ireland and Lea, 1999; Masclaux *et al.*, 2000; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006). Κατά τη γήρανση φυτικών ιστών αμπέλου και αβοκάντο *in vitro*, επάγεται η έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την α -υπομονάδα του ενζύμου, και η δραστηριότητα στην κατεύθυνση της αμίνωσης (Loulakakis *et al.*, 1994; 2002). Σε φύλλα καπνού κατά την περίοδο της γήρανσης, όταν δηλαδή χαρακτηρίζονται από αυξημένα επίπεδα αμμωνίου, η GDH ανιχνεύτηκε, εκτός από τα μιτοχόνδρια, επιπλέον και στο κυτόπλασμα των συνοδών κυττάρων του ηθμού (Paczek *et al.*, 2002; Dubois *et al.*, 2003; Terce-Laforgue *et al.*, 2004; Kichey *et al.*, 2005; Fontaine *et al.*, 2006). Η σχετιζόμενη με την ηλικία επαγωγή της GDH σε διάφορους φυτικούς ιστούς, μπορεί να εξηγηθεί από την αύξησης της αμμωνίας μέσω της πρωτεόλυσης (επαγωγή της NADH-GDH, αφομοίωση αμμωνίου) ή από την έλλειψη υδατανθράκων (επαγωγή της NAD-GDH, παραγωγή ενέργειας), φαινόμενα που παρατηρούνται κατά την γήρανση (Givan, 1979; Srivastava and Singh, 1987).

Περιβαλλοντικές συνθήκες – Συνθήκες καταπόνησης

Σε συνθήκες σκότους επάγεται η δραστηριότητα της GDH (Peeters and Van Laere, 1992; Melo-Oliveira *et al.*, 1996; Turano *et al.*, 1997), ωστόσο αυτό φαίνεται να οφείλεται στη μείωση των επιπέδων των υδατανθράκων, και μπορεί να ανασταλεί με εξωγενή προσθήκη σακχάρων ή έκθεση στο φως (Purnell *et al.*, 2005; Melo-Oliveira *et al.*, 1996). Σε φύλλα *Arabidopsis*, μετά από εφαρμογή σκότους, παρατηρήθηκε ότι τα β -πολυπεπίδια ήταν άφθονα και τα α -πολυπεπίδια μη ανιχνεύσιμα. Παράλληλα, τα μεταγραφήματα του γονιδίου *GDH2* αυξήθηκαν 25 φορές, ενώ τα αντίστοιχα του γονιδίου *GDH1* αυξήθηκαν 2 φορές (Turano *et al.*, 1997).

Σε φύλλα *Arabidopsis* τα επίπεδα *GDH1* mRNA παρουσίασαν ημερήσιες διακυμάνσεις με ελάχιστη τιμή στο τέλος της φωτεινής περιόδου. Η τιμή τριπλασιάζεται μετά από δυο ώρες σκότους και παραμένει σε υψηλά επίπεδα καθ' όλη τη νυκτερινή περίοδο. Έκθεση στο φως για 2 ώρες προκαλούν μείωση της συγκέντρωσης των μεταγραφημάτων στα αρχικά επίπεδα (Melo-Oliveira *et al.*, 1996).

Η δραστηριότητα των GDH ισοενζύμων επηρεάζεται από δισθενή κατιόντα, και είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην παρουσία Ca^{2+} (Chou and Splittstoesser, 1972; Joy, 1973; Yamaya *et al.*, 1984; Itagaki *et al.*, 1988; Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990b). Στις μελέτες αυτές φαίνεται ότι ιόντα Ca^{2+} επάγουν τη δράση του ενζύμου στην κατεύθυνση της αμίνωσης ενώ δεν επηρεάζουν την αντίδραση στην κατεύθυνση της απαμίνωσης, σε φυτά μοσχομπίζελου (Joy, 1973), αραβόσιτου (Yamaya *et al.*, 1984) και αμπέλου (Loulakakis and Roubelakis-Angelakis, 1990b).

Οι Skorpelitis *et al.* (2006) σε φυτά καπνού και αμπέλου προτείνουν ότι συνθήκες αλατότητας (χειρισμός με NaCl) προκαλούν την εμφάνιση μορφών ενεργού οξυγόνου (ROS), οι οποίες με την σειρά τους επάγουν την έκφραση της υπομονάδας της GDH, και ότι οι ισότυποι του ενζύμου που συνθέτονται λειτουργούν στην κατεύθυνση της αποτοξικοποίησης της αμμωνίας και του σχηματισμού γλουταμινικού οξέος.

Χαμηλές θερμοκρασίες επηρεάζουν αρνητικά την δραστηριότητα του ενζύμου σε ρίζες φυτών *Triticum* (Srivastava and Fowden, 1972), *Glycine* (Duke *et al.*, 1977), *Pisum* (Sahulka and Lisa, 1979) και *Zea* (Alekhina and Sokolva, 1975). Η μείωση της δραστηριότητας συνοδεύτηκε με μείωση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης και μεταβολή στην αναλογία των ισότυπων (Alekhina *et al.*, 1984). Αντίθετα, έκθεση φυτών *Triticum* (Alekhina *et al.*, 1984) και σόγιας (Duke *et al.*, 1977) σε υψηλές θερμοκρασίες δεν φάνηκε να επηρέασε τη δραστηριότητα του ενζύμου. Οι Alekhina *et al.* (1984) υποστηρίζουν ότι η πρωτεΐνη GDH είναι πιο σταθερή από την GS σε υψηλές θερμοκρασίες.

Η προσθήκη καδμίου στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας κάλων καπνού, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου της αναβολικής προς την καταβολική δραστηριότητα του ενζύμου. Η αύξηση ήταν ανάλογη της δοσολογίας του καδμίου και οφειλόταν κυρίως στη μείωση της δραστηριότητας της NAD-GDH (Restivo, 2004).

Οι Pageau *et al.* (2006) μελέτησαν την επίδραση της προσβολής από παθογόνα, ουσιών που μιμούνται την προσβολή (elicitors), και ορισμένων φυτοορμονών σε φυτά καπνού και παρατήρησαν αύξηση της δραστηριότητας της GDH στην κατεύθυνση της αμίνωσης με τρόπο που θύμιζε την επιδράση της φυσιολογικής γήρανσης.

1.4.6. Η GDH κατά την ωρίμανση καρπών τομάτας.

Κατά την ωρίμανση των καρπών ενισχύεται η γεύση και το άρωμά τους με τη συμμετοχή ορισμένων ελεύθερων αμινοξέων. Ειδικότερα στην τομάτα, το γλουταμινικό και το ασπαραγγινικό οξύ συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην γεύση και το άρωμά της (Fuke and Konosu, 1991).

Η συσσώρευση γλουταμινικού οξέος σε καρπούς τομάτας φαίνεται ότι είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας ωρίμανσης. Οι Nagata και Saijo (1992) έδειξαν ότι καρποί τομάτας με παρεμποδιστές ωρίμανσης περιείχαν λιγότερη από τη μισή συγκέντρωση σε γλουταμινικό οξύ σε σχέση με τους μάρτυρες.

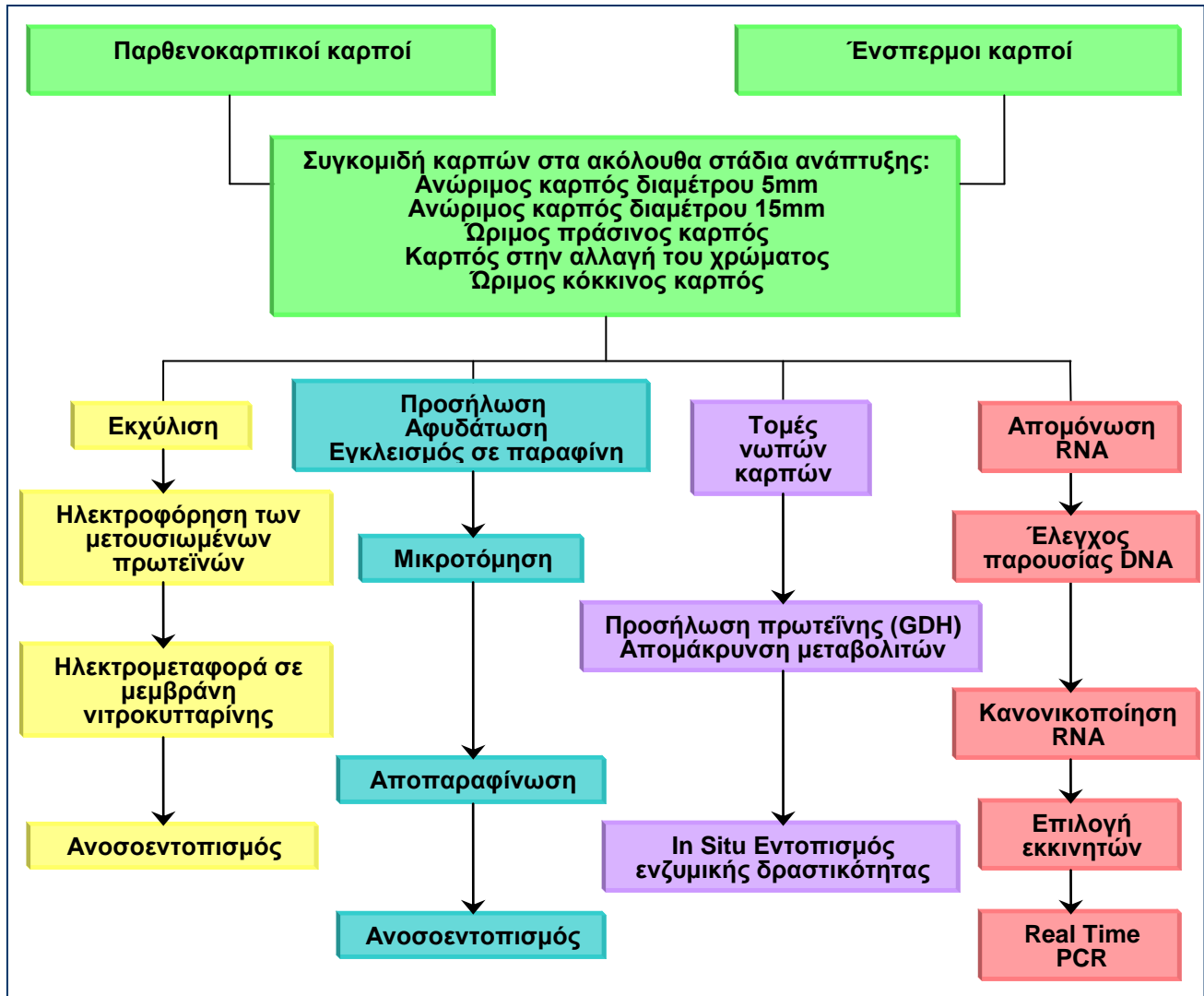
Οι Boggio *et al.* (2000) σε εργασία τους σε καρπούς τομάτας ποικιλίας Cherry αναφέρουν ότι η αναβολική λειτουργία της NADH-GDH εντοπίστηκε σχεδόν αποκλειστικά σε εκχυλίσματα κόκκινων καρπών, ενώ η GS κυρίως σε εκχυλίσματα πράσινων καρπών. Έτσι, η υψηλή συγκέντρωση του γλουταμινικού οξέος που παρατηρήθηκε στους ώριμους καρπούς ερμηνεύεται μέσω της αυξημένης δραστηριότητας της NADH-GDH και των μειωμένων επιπέδων της GS. Στην ίδια εργασία, παρατηρήθηκε ότι η συγκέντρωση της GDH είχε ανοδική τάση όσο προχωρούσε η ωρίμανση του καρπού.

Αύξηση των επιπέδων της GDH κατά την ωρίμανση καρπών τομάτας, αναφέρεται επίσης και σε επόμενες εργασίες (Pratta *et al.*, 2004; Scarpeci *et al.*, 2007).

Διαγονιδιακά φυτά τομάτας, τα οποία υπερεκφράζουν το γονίδιο *legdh1* που κωδικοποιεί τη β-υπομονάδα της NADH-GDH, χαρακτηρίζονταν από διπλάσια επίπεδα γλουταμινικού οξέος στους καρπούς (Kisaka *et al.*, 2007). Επίσης, διαγονιδιακοί καρποί τομάτας που περιείχαν ένα γονίδιο NADPH-GDH από το μύκητα *Aspergillus nidulans* παρουσίασαν διπλάσια περιεκτικότητα σε γλουταμινικό οξύ (Kisaka and Kida, 2003).

Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Η διαδικασία του πειράματος.

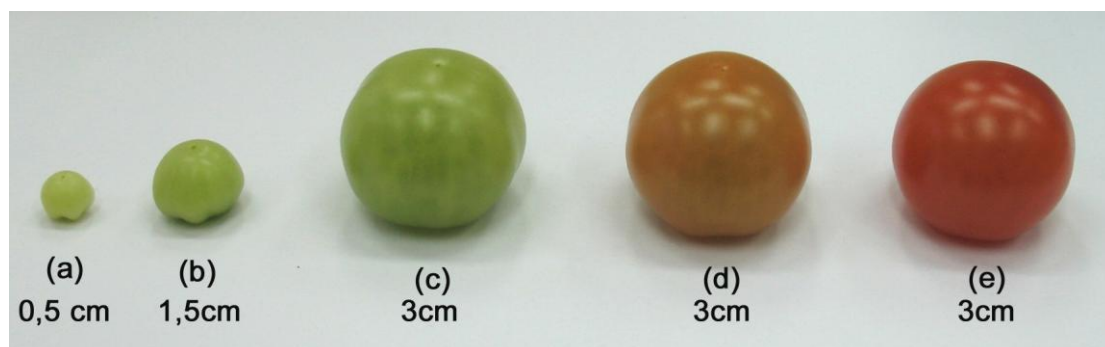


Σχήμα 2.1: Σχηματική παράσταση των διαδικασιών του πειράματος.

2.2 Το φυτικό υλικό.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης 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. Οι καρποί της Conchita είναι λαμπεροί κόκκινοι με μέσο βάρος 16-18gr. Η ανάπτυξη και η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε στο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. 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 που είχαν διαμορφωθεί σε διστέλεχο σύστημα. Για την παραλαβή των παρθενοκαρπικών καρπών έγιναν οι ακόλουθες ενέργειες. Όταν ακόμη τα άνθη ήταν κλειστά και πριν αυτά καταστούν επιδεικτικά επικονίασης, με μία λαβίδα ανοίχτηκαν τα πέταλα και αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι ανθήρες αφήνοντας άθικτο τον ύπερο (ευνουχισμός). Ακολούθησε ψεκασμός του άνθους με κατάλληλη ορμόνη και το άνθος σημάνθηκε με ταμπελάκι όπου αναγραφότανε η ημερομηνία επέμβασης. Όταν οι καρποί έφτασαν στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης συγκομίστηκαν. Η ορμόνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Ortomone με δραστική ουσία το β-ναφθοξυοξικό οξύ σε συγκέντρωση 50ppm. Οι ένσπερμοι καρποί προήλθαν από φυσιολογική καρπόδεση χωρίς καμμία επέμβαση υποβοήθησης της καρπόδεσης. Οι άσπερμοι και ένσπερμοι καρποί συγκομίστηκαν σε 5 διαφορετικά στάδια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη τους: ανώριμοι καρποί διαμέτρου 0,5cm και 1,5cm, ώριμοι πράσινοι, καρποί στην αλλαγή του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι (**Εικόνα 2.1**). Η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε από τις 11.00- 13.00 και οι καρποί τοποθετήθηκαν αμέσως μετά την κοπή τους από τα φυτά σε ψύξη για σταμάτημα των μεταβολικών διεργασιών έως τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Αμέσως μετά τη συγκομιδή τους, ένα μέρος των καρπών χρησιμοποιήθηκε για τομές με σκοπό τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου, οι δε υπόλοιποι αποθηκεύτηκαν στους -80°C .



Εικόνα 2.1: Τα 5 στάδια ανάπτυξης του καρπού τομάτας τύπου cherry βάση των οποίων έγινε η συγκομιδή. (a) Ανώριμος καρπός διαμέτρου 0,5cm και (b) 1,5cm, (c) ώριμος πράσινος καρπός, (d) καρπός στην αλλαγή χρώματος και (e) κόκκινος ώριμος καρπός.

2.3 Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.

2.3.1. Εκχύλιση των ενζύμων.

Μετά την παραλαβή των δειγμάτων για τα 5 στάδια των ένσπερων και τα αντίστοιχα 5 των άσπερων 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. Τελικά, τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν 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 και στη συνέχεια προστέθηκαν στο εκχύλισμα μερικοί κόκκοι κυανού της βρωμοφαινόλης για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

Το διάλυμα εκχύλισης των πρωτεϊνών ήταν αυτό που προτείνεται από τους Stenzel *et al.* (2003).

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών

100mM Tris - HCl pH 7.5
15% glycerol
0,02% BSA
2mM Ανοιγμένη γλουταθειόνη
4% PVP
0,1% Triton X

2.3.2. Μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.

Για τη κανονικοποίηση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην ηλεκτροφόρηση κρίθηκε απαραίτητος ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με τη μέθοδο Bearden (1978).

Διάλυμα Bearden

1. Ζύγιση 10mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva 17524).
2. Το παραπάνω αραιώνεται σε 40ml 85% φωσφορικού οξέος.
3. Προσθήκη 200ml αποσταγμένο νερό (dH₂O).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται την επόμενη ημέρα. Η πρότυπη καμπύλη εξάρτησης της απορρόφησης του δείγματος από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών (BSA) σχεδιάστηκε για ποσότητες BSA μεταξύ 5 και 50μg. Μετά την εκχύλιση των πρωτεϊνών και τη φυγοκέντρωση ετοιμάστηκαν 10 σωλήνες για κάθε δείγμα (5mm και 15mm ανώριμου, ώριμου πράσινου, αλλαγή χρώματος, ώριμου κόκκινου για ένσπερμους και άσπερμους καρπούς) που περιείχαν 1,5ml dH₂O, 100μl εκχυλίσματος και 1,5ml διαλύματος Bearden. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένας σωλήνας που περιείχε 1,5ml dH₂O και 1,5ml διαλύματος Bearden. Ακολούθως έγινε φωτομέτρηση στα 595nm. Μετά τις επαναληπτικές μετρήσεις για κάθε δείγμα υπολογίζεται η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης βάσει της πρότυπης καμπύλης.

2.3.3. Ηλεκτροφορήσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

Πριν από την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα υπέστησαν χειρισμό με SDS για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα στα δείγματα προστέθηκε 10% SDS και θερμάνθηκαν στους 95-97°C για 15min. Τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρωση τους στα 10000g επί 10min.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 10% ολικής συγκέντρωσης ακρυλαμιδίου με 2,7% bis-ακρυλαμίδιο, σε ασυνεχές σύστημα του οποίου τα συστατικά αναφέρονται παρακάτω. Ακολούθως φορτώθηκε με εκχύλισμα πρωτεϊνών που αντιστοιχούσε περίπου σε 40μg πρωτεΐνης από κάθε ιστό.

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

A. Πηκτή ανάλυσης 10% T, 2.7% C

3,60ml Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμιδίου, Bis- Ακρυλαμιδίου (30%, 2.7%)

2,50ml Ρυθμιστικό Διάλυμα Ανάλυσης

3,80ml Αποσταγμένο Νερό

50μl Υπερθειϊκό Αμμώνιο (10%)

10μl TEMED

100μl SDS (10%)

Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης

378mM Tris-HCl pH 8.9

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

1,0ml Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμιδίου, Bis- Ακρυλαμιδίου (30%, 2.7%)
 5,0ml Ρυθμιστικό Διάλυμα συσσώρευσης
 3.76ml Αποσταγμένο Νερό
 100μl Υπερθεϊκό Αμμώνιο (10%)
 10μl TEMED
 100μl SDS (10%)

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης

63mM Tris-HCl pH 6.8

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

25mM Tris
 192mM γλυκίνη

2.3.4. Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

Η πηκτή ανάλυσης από την προηγούμενη ηλεκτροφόρηση τοποθετήθηκε σε δοχείο με το διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών για 20 λεπτά, ενώ παράλληλα, στο ίδιο δοχείο ενυδατώθηκαν η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης και τα φύλλα χαρτιού 3MM. Με τη χρήση πιπέτας αφαιρέθηκαν τυχόν φυσαλίδες αέρα.

Σχηματίστηκε διάταξη ως εξής: 5 φύλλα χαρτιού 3MM - πηκτή - μεμβράνη νιτροκυτταρίνης - 5 φύλλα χαρτιού 3MM. Η διάταξη τοποθετήθηκε για ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών στα 200mA για μία ώρα, υπό ψύξη.

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

2.3.5. Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.

Αφού ενυδατώθηκε για 3 λεπτά, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης κόπηκε στη μέση. Η κάθε ταινία αφέθηκε να επιπλεύσει σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST 1% ζελατίνης (BDH) για 5min, με σκοπό την δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της νιτροκυτταρίνης, και με τέτοιο τρόπο ώστε να μην παγιδευτεί αέρας..

Ακολούθησε επώαση μιας ταινίας νιτροκυτταρίνης με πολυκλωνικά αντισώματα παρασκευασθέντα εναντίον συντηρημένων περιοχών της GS (Agrisera AS08 295, rabbit anti GS) και σε αραιώση 1:750 σε TBST-1% BSA για 12h στους

25°C. Ομοίως, άλλη μια ταινία νιτροκυτταρίνης επωάστηκε με αντισώματα εναντίον συντηρημένων περιοχών της GDH (Agrisera AS05 068, rabbit anti GDH).

Την επόμενη ημέρα, οι ταινίες νιτροκυτταρίνης ξεπλύθηκαν 3 φορές επί 5 min με TBST 1% ζελατίνης, με σκοπό την απομάκρυνση της περίσσειας του πρωτογενούς αντισώματος. Στην συνέχεια εφαρμόστηκε το δευτερογενές αντίσωμα που προερχόταν από ποντίκι εναντίον της βαριάς αλυσίδας του αντισώματος του κουνελιού, το οποίο ήταν συνδεδεμένο με αλκαλική φωσφατάση (mouse anti-rabbit IgG (Fc) AP conjugated) σε αραιώση 1:5000 σε TBST-1% BSA για 2h.

Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος απομακρύνθηκε με 3 ξέπλυματα επί 5 min με TBST 1% ζελατίνης.

Κατόπιν, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης με την επώαση των ταινιών σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης για 3 min, παρουσία χρωμοφόρου NBT/BCIP.

Οι ταινίες νιτροκυτταρίνης αφυδατώθηκαν και φυλάχτηκαν μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών

24mM Tris
192mM γλυκίνη
20% μεθανόλη

Ρυθμιστικό διάλυμα TBST

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

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης-Buffer3

10mM Tris-HCl pH 9.5
100mM NaCl
50mM MgCl₂

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης

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

2.4 Ανοσοεντοπισμός.

2.4.1. Προσήλωση.

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

2.4.2. Αφυδάτωση.

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

2.4.3. Διαφανοποίηση.

Στη συνέχεια, ακολούθησε απομάκρυνση της αλκοόλης από τα δείγματα με εμβάπτιση τους σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης ξυλένιου, διαδοχικά ως εξής: 25% ξυλένιο-75% αιθανόλη, 50%, ξυλένιο-50% αιθανόλη, 75% ξυλένιο-25% αιθανόλη, 100% ξυλένιο. Τα τρία πρώτα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν για χρονικό διάστημα μίας ώρας το καθένα, ενώ εκείνο του καθαρού ξυλένιου χρησιμοποιήθηκε για τρεις εμβαπτίσεις της μίας ώρας.

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

2.4.5. Προετοιμασία αντικειμενοφόρων.

Οι αντικειμενοφόροι που χρησιμοποιήθηκαν, εμβαπτίστηκαν αρχικά σε διάλυμα 1% SDS, για να απομακρυνθούν από αυτές οι τυχόν λιποδιαλυτές ουσίες. Μετά από περίπου 2h απομακρύνθηκαν από το SDS και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό σε συνεχή ροή. Κατόπιν, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα υδροχλωρίου 5% για 2h και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό σε συνεχή ροή. Τέλος, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 1% w/v πολυλυσίνης και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μέρες. Μέχρι να χρησιμοποιηθούν παρέμειναν στο ψυγείο.

2.4.6. Μικροτόμηση.

Κάθε ένα δείγμα τοποθετήθηκε σε χειροκίνητο μικροτόμο (LEIKA) και πραγματοποιήθηκαν τομές πάχους 10μm (για τα στάδια των ανώριμων καρπών διαμέτρου 5mm και 15mm), και 20μm (για τα στάδια του ώριμου πράσινου καρπού, του καρπού στην αλλαγή του χρώματος και του ώριμου κόκκινου καρπού). Ακολούθησε επιλογή των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι επιλεγμένες τομές τοποθετήθηκαν στις επεξεργασμένες με πολυλυσίνη αντικειμενοφόρους. Σε αυτές προστέθηκε μικρή ποσότητα αποσταγμένου-αποστειρωμένου 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.

2.4.7. Αποπαραφίνωση.

Η αποπαραφίνωση έγινε με διαδοχική εμβάπτιση των ιστών σε διαλύματα που περιείχαν: 100% ξυλένιο, 75% ξυλένιο-25% αιθανόλη, 50% ξυλένιο-50% αιθανόλη, 25% ξυλένιο-75% αιθανόλη και 100% αιθανόλη για 10min το καθένα.

2.4.8. Ανοσοεντοπισμός.

Αρχικά οι τομές καλύφθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα TBST με 1% BSA (διάλυμα δεσμεύσεως μη ειδικών θέσεων) και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Ακολούθησε επώαση των τομών, που προορίζονταν για τον ανοσοεντοπισμό της GS, σε 1:750 αραιώση του αντισώματος (Agrisera AS08 295, rabbit anti GS) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST με 1% BSA (πρωτεΐνη του ορού του βοδιού), και οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν για τουλάχιστον 12h σε θερμοκρασία 4°C. Ομοίως, οι τομές που προορίζονταν για τον ανοσοεντοπισμό της GDH, επώαστηκαν σε αραιώση 1:1000 του αντισώματος (Agrisera AS05 068, rabbit anti GDH) στο ρυθμιστικό διάλυμα TBST - 1% BSA. Στις τομές που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρας δεν εφαρμόστηκε πρωτογενές αντίσωμα.

Την επόμενη ημέρα, απομακρύνθηκε η περίσσεια του πρωτογενούς αντισώματος με 2 πλύσεις με διάλυμα TBST για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.

Κατόπιν, οι τομές επώαστηκαν σε διάλυμα TBST με 1% BSA, που περιείχε κατάλληλη αραιώση (1:5000) δευτερογενούς αντισώματος (AP-Anti-Rabbit, Promega), για 2h περίπου σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα προέρχεται από ποντίκι έναντι των αντισωμάτων κουνελιών (IgG και φέρει συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση).

Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος ξεπλένεται με διάλυμα TBST για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης με την επώαση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης, παρουσία χρωμοφόρου NBT/BCIP. 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. Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, χρωματίστηκαν με σαφρανίνη.

Ακολουθεί αφυδάτωση με διαδοχικές εμβαπτίσεις, σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης 50%, 70%, 90%, 95% και δύο φορές σε 100% με αλλαγές ανά 2 λεπτά. Τέλος, αφού στεγνώσουν καλά οι τομές, καλύπτονται με DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας, ώστε να μονιμοποιηθούν.

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα TBST

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

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης-Buffer3

10mM Tris-HCl pH 9.5
100mM NaCl
50mM MgCl₂

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης

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

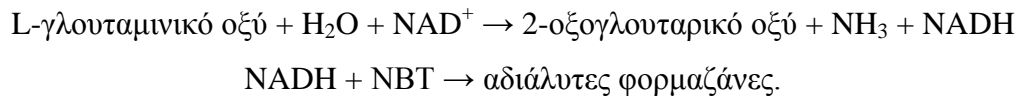
2.5 In situ εντοπισμός ενζυμικής δραστηριότητας (GDH).

Με τη μέθοδο αυτή εντοπίστηκε η ενζυμική δραστηριότητα της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού οξέος. Επειδή το υπό μελέτη ένζυμο δεν είναι δεσμευμένο εντός των κυττάρων, ακολουθήθηκε η διαδικασία ήπιας προσήλωσής του. Κατά τη διαδικασία αυτή, ένα μεγάλο μέρος της ενεργότητας των ενζύμων καταστρέφεται, το ένζυμο όμως προσηλώνεται και έτσι είναι δυνατός ο εντοπισμός του στους διάφορους ιστούς.

Αρχικά, έγιναν τομές των καρπών μέσα σε τρυβλία με το προσηλωτικό διάλυμα, το οποίο περιέχει PVP (για δέσμευση των ταννινών οι οποίες απενεργοποιούν τα ένζυμα), παραφορμαλδεΐδη (προσηλώνει τα ένζυμα), BSA (για προστασία από πρωτεάσες), και DTT (διατηρεί την αναγωγική κατάσταση των θειολικών ομάδων του ενζύμου). Οι τομές παρέμειναν στο προσηλωτικό για περίπου 15-20min, στη συνέχεια το προσηλωτικό αφαιρέθηκε, προστέθηκε αποστειρωμένο νερό και τέλος οι τομές καταψύχθηκαν.

Την επόμενη ημέρα οι τομές αποψύχθηκαν και ξεπλύθηκαν με κρύο αποστειρωμένο νερό, με σκοπό την διάρρηξη των κυττάρων και την απομάκρυνση των μεταβολιτών που πιθανόν παρεμβαίνουν στις αντιδράσεις εντοπισμού του ενζύμου.

Στην συνέχεια, για τον εντοπισμό της GDH, χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα που αναφέρουν οι Brown *et al.* (1978), το οποίο μεταξύ άλλων περιέχει το υπόστρωμα του ενζύμου (γλουταμινικό οξύ) και μπλε του τετραζολίου. Το τελευταίο αντιδρά με το παραγόμενο NADH και σχηματίζει αδιάλυτο έγχρωμο προϊόν (φορμαζάνες). Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε το παραπάνω διάλυμα χωρίς την προσθήκη γλουταμινικού οξέος. Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Canon Powershot A620. Η πορεία των αντιδράσεων του εντοπισμού της δραστηριότητας του ενζύμου είναι η εξής:



Διαλύματα

Προσηλωτικό διάλυμα

2% PVP
2% Παραφορμαλδεΐδη (40%)
1,0mM DTT
0,025% BSA

Διάλυμα ανίχνευσης της δραστηριότητας του ενζύμου

50mM Tris - HCl pH 8.0
0,3mM CaCl₂ 2H₂O
2,0mM NAD
1,0mM EDTA
0,025% BSA
0,03% NTB
5,0mM γλουταμινικό οξύ ρυθμισθέν σε pH 7.0 με KOH.

2.6. Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν GDH & GS στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού.

2.6.1. Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.

Κατά την απομόνωση του ολικού RNA από τους καρπούς της τομάτας ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από την εταιρία Qiagen για την απομόνωση φυτικού RNA (RNeasy Plant Mini Kit).

Η ποσότητα του αρχικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε, ζύγιζε 200mg. Ο ζυγισμένος ιστός τοποθετήθηκε άμεσα σε υγρό άζωτο όπου και λειοτριβήθηκε. Η σκόνη που προέκυψε, αποθηκεύτηκε σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης χωρητικότητας 2ml στον οποίο απουσιάζει RNάση. Το υγρό άζωτο αφήνεται να εξατμιστεί αλλά δεν επιτρέπεται να ξεπαγώσει ο ιστός. Το RNA σε φυτικούς ιστούς δεν προστατεύεται έως ότου επιτευχθεί άμεση ψύξη του ιστού σε υγρό άζωτο.

Στην συνέχεια προστέθηκαν 450μl ρυθμιστικού διαλύματος RLT μέχρι το μέγιστο των 200mg λειοτριβημένου ιστού, και ακολούθησε έντονη ανακίνηση (vortex). Επώαση διάρκειας 1-3min βοηθά τη λύση των ιστών. Η β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME) προστίθεται πριν την χρήση στο ρυθμιστικό διάλυμα RLT. Πιο συγκεκριμένα, προσθέτουμε 100μl β-ME ανά 1ml ρυθμιστικού διαλύματος RLT. Τα αντιδραστήρια με την β-ME μπορούν να αποθηκευθούν σε θερμοκρασία δωματίου για ένα μήνα.

Οι λειοτριβημένοι ιστοί μεταφέρθηκαν σε στήλη QIAshredder spin (μωβ) που είναι τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής των 2ml και φυγοκεντρήθηκε για 2min σε μεγάλη ταχύτητα. Το υπερκείμενο της στήλης μεταφέρθηκε προσεκτικά σε ένα μικρό σωλήνα μικροφυγοκέντρησης χωρίς να διαταραχθούν τα κυτταρικά υπολείμματα στο σωλήνα συλλογής. Η φυγοκέντρηση μέσω της QIAshredder στήλης αφαιρεί τα κυτταρικά υπολείμματα και ομογενοποιεί το προϊόν της λύσης των κυττάρων. Καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των κυτταρικών υπολειμμάτων παραμένει στη στήλη QIAshredder spin, ένα πολύ μικρό μέρος τους περνά στο σωλήνα συλλογής και σχηματίζει ίζημα.

Στην συνέχεια προστέθηκαν 0,5 όγκου αιθανόλης (96-100%) στο καθαρισμένο προϊόν της λύσης των κυττάρων και αναμίχθηκαν άμεσα με τη χρήση πιπέτας. Το δείγμα μεταφέρθηκε μαζί με το ίζημα που έχει σχηματιστεί σε μια στήλη RNeasy spin

τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής των 2ml. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 15s σε ταχύτητα 8000g (10000rpm). Το διήθημα αφαιρέθηκε.

Προστέθηκαν 700μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1 στη στήλη RNeasy spin και ακολούθησε φυγοκέντρωση για 15s σε ταχύτητα 8000g (10000rpm) για να ξεπλυθεί η μεμβράνη της στήλης. Το διήθημα απορρίφθηκε. Η στήλη RNeasy spin αφαιρέθηκε προσεκτικά από το σωλήνα συλλογής ώστε να μην επικοινωνεί η στήλη με το διήθημα.

Κατόπιν, προστέθηκαν 500μl ρυθμιστικού διαλύματος RPE στην στήλη RNeasy spin. Το ρυθμιστικό διάλυμα RPE παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν την πρώτη χρήση του προσθέτουμε 4 όγκους αιθανόλης (96-100%) για να πάρουμε το τελικό διάλυμα που θα χρησιμοποιήσουμε. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 15s σε ταχύτητα 8000g (10000rpm) για να ξεπλυθεί η μεμβράνη της spin στήλης.

Προσθέτουμε 500μl ρυθμιστικό διάλυμα RPE στην στήλη RNeasy spin. Φυγοκεντρούμε για 2min σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000g (10000rpm) για να ξεπλυθεί η μεμβράνη της στήλης spin (το τελευταίο γίνεται για να ξηραθεί η μεμβράνη ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη που πιθανόν δεν αφαιρέθηκε).

Η στήλη RNeasy spin τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα συλλογής 2ml και ακολούθησε φυγοκέντρωση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min. Η στήλη RNeasy spin τοποθετήθηκε σε νέο σωλήνα συλλογής 1,5ml και προστέθηκαν 30-50μl νερό που δεν περιέχει RNάση κατευθείαν στη μεμβράνη της στήλης spin. Φυγοκεντρήθηκαν για 1min σε ταχύτητα 8000g (10000rpm) ώστε να εξαχθεί το RNA.

2.6.2. Έλεγχος της ποιότητας του παραλαμβανόμενου RNA.

Μετά την παραλαβή του RNA ελέγχθηκε η ποιότητά του μέσω ηλεκτροφόρησης TAE σε πηκτή αгарόζης 1,5% με φορμαμίδιο. Για την προετοιμασία 30ml πηκτής χρησιμοποιήθηκαν 30ml 1X Tank ρυθμιστικού διαλύματος στο οποίο προστέθηκαν 300mg αгарόζης και τοποθετήθηκαν σε φούρνο μικροκυμάτων για 1min. Ακολούθησε προσθήκη 0,75 μl βρωμιούχου αιθιδίου και η πηκτή αφέθηκε να κρυώσει πριν τοποθετηθεί στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το μίγμα της ηλεκτροφόρησης συνίστατο από 5μl δείγματος RNA και 15μl διαλύματος αποδιάταξης RNA, το οποίο θερμάνθηκε στους 65 °C για 5 λεπτά και ψύχθηκε σε πάγο για άλλα 5 λεπτά, πριν φορτωθεί στην πηκτή. Η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 70V για 20min.

50X Tank ρυθμιστικό διάλυμα

2M Tris-Οξικό
 50mM EDTA
 Ρύθμιση του pH στο 7,0

10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης του Δείγματος

50 mM Tris-HCl pH 7,6
 60% Γλυκερόλη
 0,25% κυανούν της βρωμοφαινόλης
 1μl Βρωμιούχο αιθίδιο

Διάλυμα αποδιάταξης RNA

Σε αποστειρωμένο eppendorf τοποθετούνται:
 600μl φορμαμίδιο
 2400μl dd H₂O
 100μl 10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης του Δείγματος

2.6.3. Υδρόλυση DNA των δειγμάτων.

Κατά την απομόνωση του RNA με το RNeasy Plant Mini Kit παρατηρήθηκε, μετά την ηλεκτροφόρηση TAE του μετουσιωμένου δείγματος, ύπαρξη γενωματικού DNA. Για τον λόγο αυτό ακολούθησε μια επιπλέον μέθοδος υδρόλυσης του DNA, και χρησιμοποιήθηκε το kit των αντιδραστηρίων της DNάσης (Promega).

Αρχικά, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 2μl DNάσης και 2μl 1X ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης (Promega). Ακολούθησε Vortex των δειγμάτων και προσθήκη 0,5μl RNase out (παρεμποδιστής της RNάσης). 15,5μl του δείγματος RNA συμπληρώθηκε με μητρικό μείγμα μέχρι τελικό όγκο 20μl και τοποθετήθηκε στους 37°C για 45min. Τέλος, προστέθηκε 1μl DNASE Stop Solution.

Κατόπιν, προστέθηκαν 180μl dd αποστειρωμένου H₂O και 200μl φαινόλη και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5min. Σχηματίζονται δύο ευδιάκριτες φάσεις, με την υπερκείμενη φάση να περιέχει το RNA. Η υπερκείμενη φάση τοποθετήθηκε σε νέο αποστειρωμένο eppendorf. Προστέθηκαν 100 μl φαινόλη και 100μl χλωροφόρμιο και πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5min. Από το προϊόν, απομονώθηκε η υπερκείμενη φάση και τοποθετήθηκε σε νέο αποστειρωμένο eppendorf. Προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιο και πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές 5min. Η

υπερκείμενη φάση τοποθετήθηκε σε νέο αποστειρωμένο eppendorf. Προστέθηκαν 500μl αιθανόλη και 10μl όξινο ανθρακικό νάτριο (CHCOONa 3M pH=5,2), και το δείγμα ψύχθηκε στους -20°C για 12h. Κατόπιν, φυγοκεντρήθηκε στις 13000 στροφές, στους 4°C για 20min. Στο RNA, το οποίο παραμένει ως ίζημα, προστέθηκαν 200μl 70% αιθανόλη και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση πάλι στις 13000 στροφές, στους 4°C για 20min. Απορρίφθηκε το υπερκείμενο και ακολούθησε νέα φυγοκέντρηση στα 15000g για 0,5sec. Το eppendorf αφέθηκε μέσα σε πάγο με ανοικτό το καπάκι του για 5min, για να εξατμιστεί η αιθανόλη. Τέλος, επαναδιαλύουμε σε 20μl dd αποστειρωμένο H_2O . Μετά την αντίδραση PCR και την ηλεκτροφόρηση TAE, η παρουσία μόνο των εκκινητών της ομπικουτίνης δείχνει εάν έχει υδρολυθεί πλήρως το DNA.

10X Ρυθμιστικό Διάλυμα DNάσης

400mM Tris-HCl (pH 8.0)

100mM MgSO_4

10mM CaCl_2 .

2.6.4. Παρασκευή cDNA.

Μετά τον έλεγχο της ποιότητας του RNA, ακολούθησε η παρασκευή cDNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το AffinityScript Multi Temperature cDNA Synthesis Kit (Stratagene). Κατά την διαδικασία αυτή, γίνεται σύνθεση cDNA από τα τμήματα του RNA που περιέχουν ουρά πολυ-A (mRNA).

Σε σωλήνα PCR (200μl), τοποθετήθηκαν 10μl δείγματος καθαρού RNA, 5,7μl dd H_2O και 1μl εκκινητή ολιγο-(dT). Το μείγμα επωάστηκε στους 65°C για 5min και αφέθηκε για 10min ώστε να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε προσθήκη 2μl 10X ρυθμιστικό διάλυμα AffinityScript RT, 0,8μl μείγμα dNTPs, 0,5μl παρεμποδιστής RNάσης και 1μl αντίστροφης μεταγραφάσης. Τα δείγματα επωάστηκαν στους 42°C για 60min και η αντίδραση τερματίζεται στους 70°C για 15min. Το cDNA φυλάσσεται στους -20°C . Η ποσοτικοποίηση έγινε με Real Time PCR.

2.6.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενισχύσεως ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή και *in situ*. Η αντίδραση προϋποθέτει την ύπαρξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων, που έχουν την ικανότητα να υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA ή cDNA, τα οποία δρουν ως εκκινητές της σύνθεσης της αλυσίδας του DNA. Η σχεδίαση των εκκινητών είναι τέτοια, ώστε η σύνθεση της αλυσίδας του DNA να γίνεται προς την κατεύθυνση του άλλου. Η σύνθεση γίνεται με τη δράση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης, παρουσία των απαραίτητων νουκλεοτιδίων καθώς και ιόντων Mg^{+2} .

Η real time PCR αποτελεί μια παραλλαγή της βασικής διαδικασίας PCR. Η συσκευή real time PCR διαθέτει φωτόμετρο το οποίο παρέχει ενδείξεις του κύκλου κατά τον οποίο έχει σχηματιστεί ικανός αριθμός μεταγραφημάτων. Στο παρόν πείραμα η τεχνική real time PCR χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της ποσότητας των μεταγραφημάτων των υπό εξέταση γονιδίων στα διάφορα στάδια ανάπτυξης. Οι αντιδράσεις Real time PCR πραγματοποιήθηκαν με το θερμοκυκλοποιητή Stratagene MX 3005P, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια της Kapa Biosystems. Κάθε σωλήνας περιείχε 2μl cDNA, ποσοτικοποιημένο και αραιωμένο (περίπου 100ng), ενώ προστίθενται και τα αντιδραστήρια με τις αναλογίες που προτείνονται από την εταιρία Kapa Biosystems. Κάθε σωλήνας περιείχε:

Ορθόδρομος εκκινητής 1μl (10μM)
 Οπισθόδρομος εκκινητής 1μl (10μM)
 Kapa RYBR Fast qPCR Master mix (2X) 10μl
 KSF Rox Low (χρωστική) 0,4μl
 cDNA (100ng/μl) 1,5μl
 RNase free H₂O 6,1μl

Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

1. Αρχικό βήμα ενεργοποίησης: 95°C για 3min
 2. Αποδιάταξη DNA: 95°C για 3sec
 3. Υβριδισμός εκκινητών: 60°C για 30sec
 4. Επιμήκυνση: 72°C για 11sec
- Τα στάδια 2-4 επαναλαμβάνονται 45 φορές.
5. 95°C για 1min
 6. 55°C για 30sec
 7. 95°C για 30sec
 8. Τελική φάση αντίδρασης: 25°C για 3min

Τα στάδια 5-8 πραγματοποιούνται για την απομάκρυνση των μη εξειδικευμένων διμερών που σχηματίζονται όταν οι εκκινητές υβριδίζουν μεταξύ τους.

Ως γονίδιο αναφοράς, τόσο για την ημιποσοτική όσο και για την πραγματικού χρόνου αντίδραση πολυμεράσης, χρησιμοποιήθηκε η ουμπικουτίνη. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τις PCR παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Ένζυμο	Ορθόδρομος εκκινητής	Οπισθόδρομος Εκκινητής
GDH (AAB39508)	TTCCATGATGCACATCCAAT	CCAACCTGATCCAGAAGCTGA
GDH (AK325267)	CTGGAGCGATCAAGAACTCC	ATGCTGATAACGTCAAGGCC
GS1 (TC191691)	GTGCAGGTGCTCACACAAAT	GAGACACAGAGAAGGCAGGC
GS2 (AK319584)	CTTCTGAGCTCCCAAAGTGG	ACAAACGCCATAAAGCTGCT
Ubiquitin	AGGATGGAAGGACTCTGGCG	TCACAACACATCACAAGGTG

Η σχετική έκφραση του κάθε γονιδίου υπολογίστηκε από τον παρακάτω τύπο:

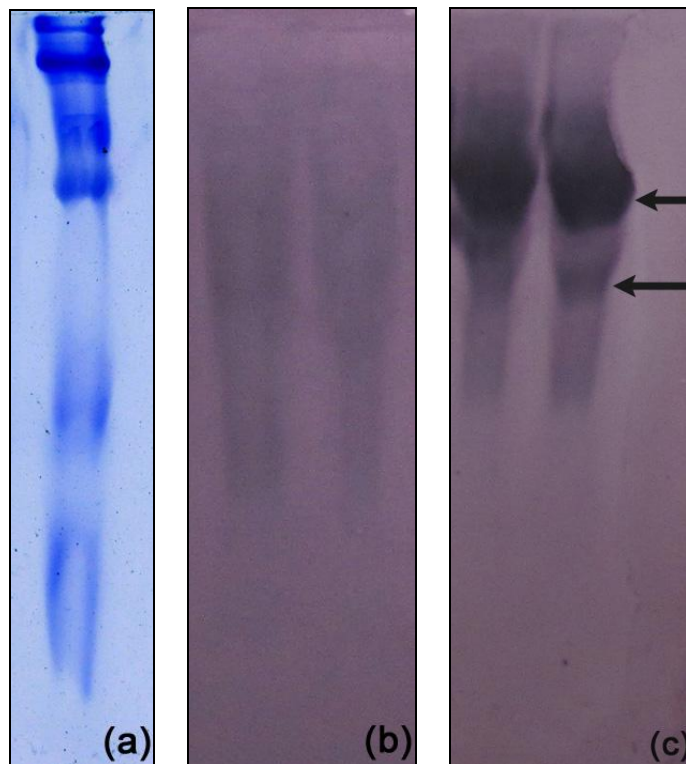
$$\frac{\text{Έκφραση γονιδίου } X}{\text{Έκφραση ουμπικουτι νης}} = \frac{\text{eff}_{\text{reac.Umbi}}^{\text{Ct.Umbi}}}{\text{eff}_{\text{reac.ΓονίδιοX}}^{\text{Ct.ΓονίδιοX}}}$$

όπου eff: η απόδοτικότητα της αντίδρασης, όπως υπολογίζεται από τα αποτελέσματα της αντίδρασης και μέσω του προγράμματος LinRegPCR (Remakers *et al.*, 2003).

Αποτελέσματα

3.1. Έλεγχος καταλληλότητας αντισωμάτων GDH & GS

Για τον ανοσοεντοπισμό της GS χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που είχαν παραχθεί εναντίον συντηρημένης περιοχής της GS του *Arabidopsis thaliana*, ενώ για την GDH χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα εναντίον της GDH του *Lupinus luteus*. Για αυτό το λόγο θεωρήσαμε σκόπιμο να εξεταστεί η καταλληλότητα των αντισωμάτων εναντίον των αντίστοιχων ενζύμων της τομάτας. Οι πρωτεΐνες των ηλεκτροφορημάτων εκχυλίσματος ώριμου πράσινου καρπού μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ο ανοσοεντοπισμός των πρωτεϊνών σε αυτό. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.1**, τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα κατά της συνθετάσης της γλουταμίνης αναγνώρισαν δύο ηλεκτροφορητικές ζώνες (βέλη), ενώ τα αντισώματα κατά της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού οξέος αναγνώρισαν διάχυτη ηλεκτροφορητική ζώνη.

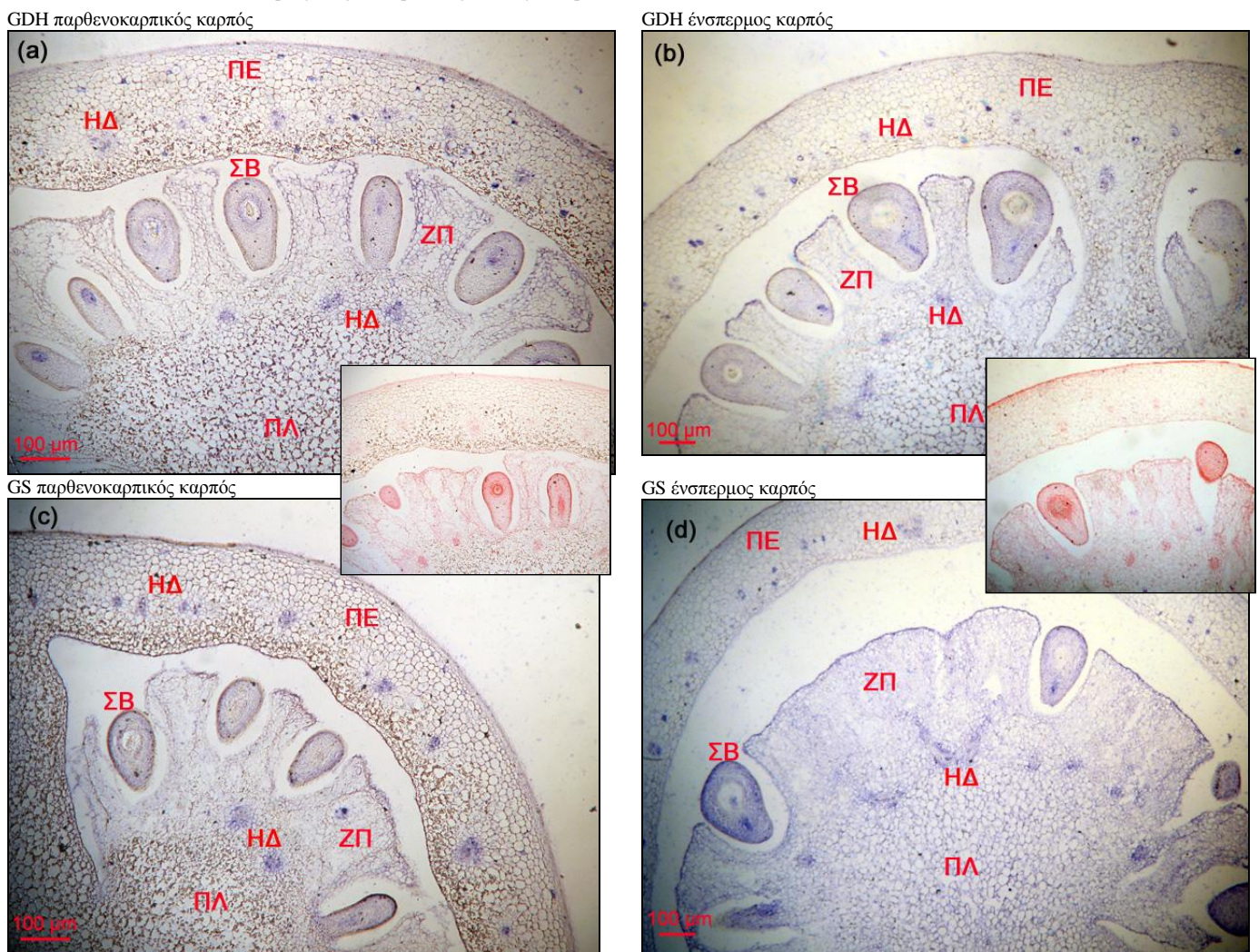


Εικόνα 3.1: Έλεγχος καταλληλότητας των αντισωμάτων. Ταινία (a) χρώση ολικών πρωτεϊνών με Coomassie Brilliant Blue R 250, ταινία (b) ανοσοεντοπισμός της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού οξέος και, ταινία (c) ανοσοεντοπισμός της συνθετάσης της γλουταμίνης μετά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

3.2. Ανοσοεντοπισμός των ενζύμων GDH & GS.

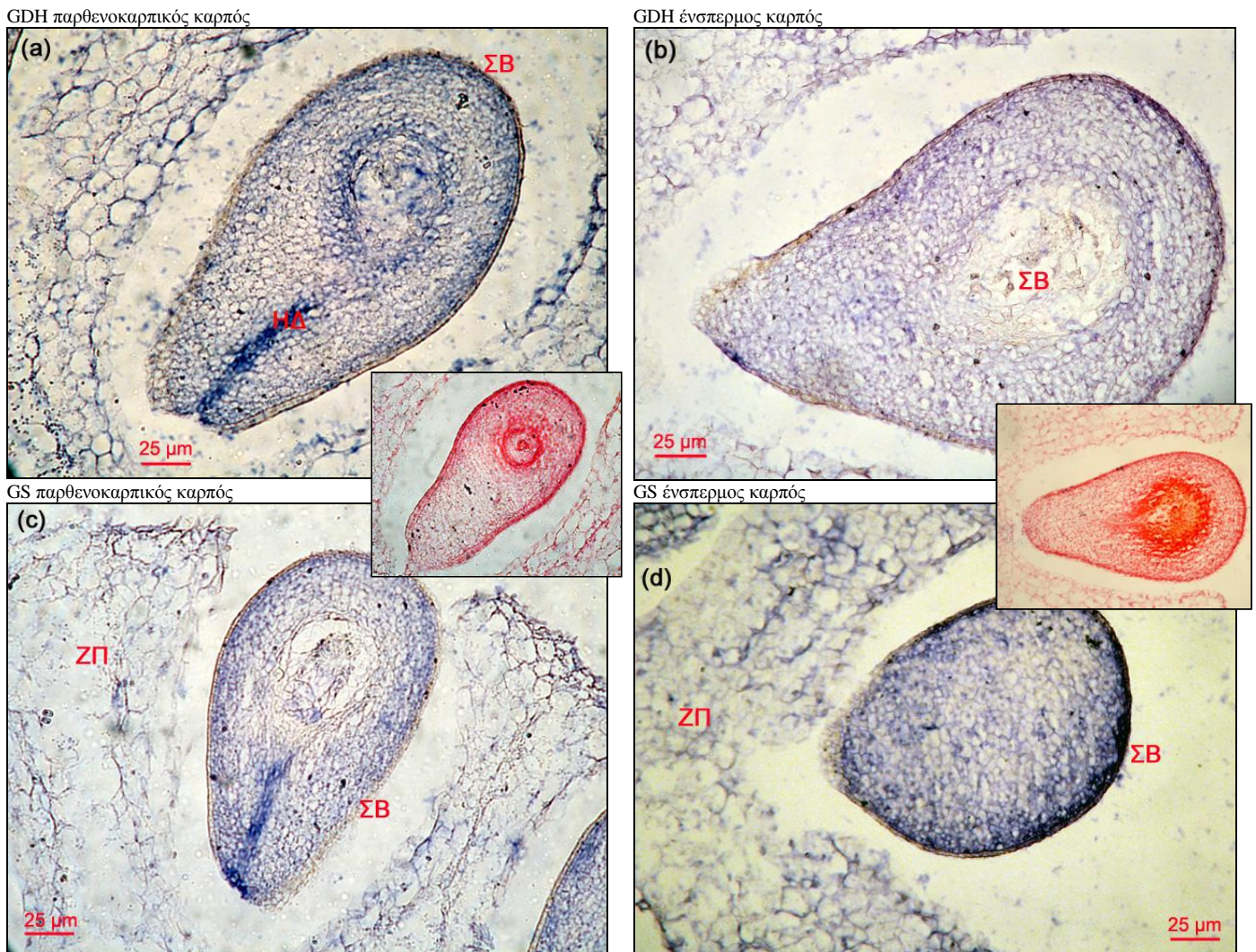
Η παρουσία των πρωτεϊνών αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος (GDH) και συνθετάση της γλουταμίνης (GS) εντοπίστηκε στους ιστούς παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας τύπου cherry, σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Ο μπλε-μοβ χρωματισμός δηλώνει την παρουσία του κάθε ενζύμου κατά τη στιγμή της προσήλωσης. Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού των ενζύμων και οι αντίστοιχοι μάρτυρες, αναλυτικά για κάθε στάδιο ανάπτυξης.

3.2.1. Ανώριμος καρπός διαμέτρου 0,5cm.



Εικόνα 3.2: Ανοσοεντοπισμός στο στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 0,5cm. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΕ, περικάρπιο, ΠΛ, πλακούντας, ΣΒ, σπερματική βλάστη.

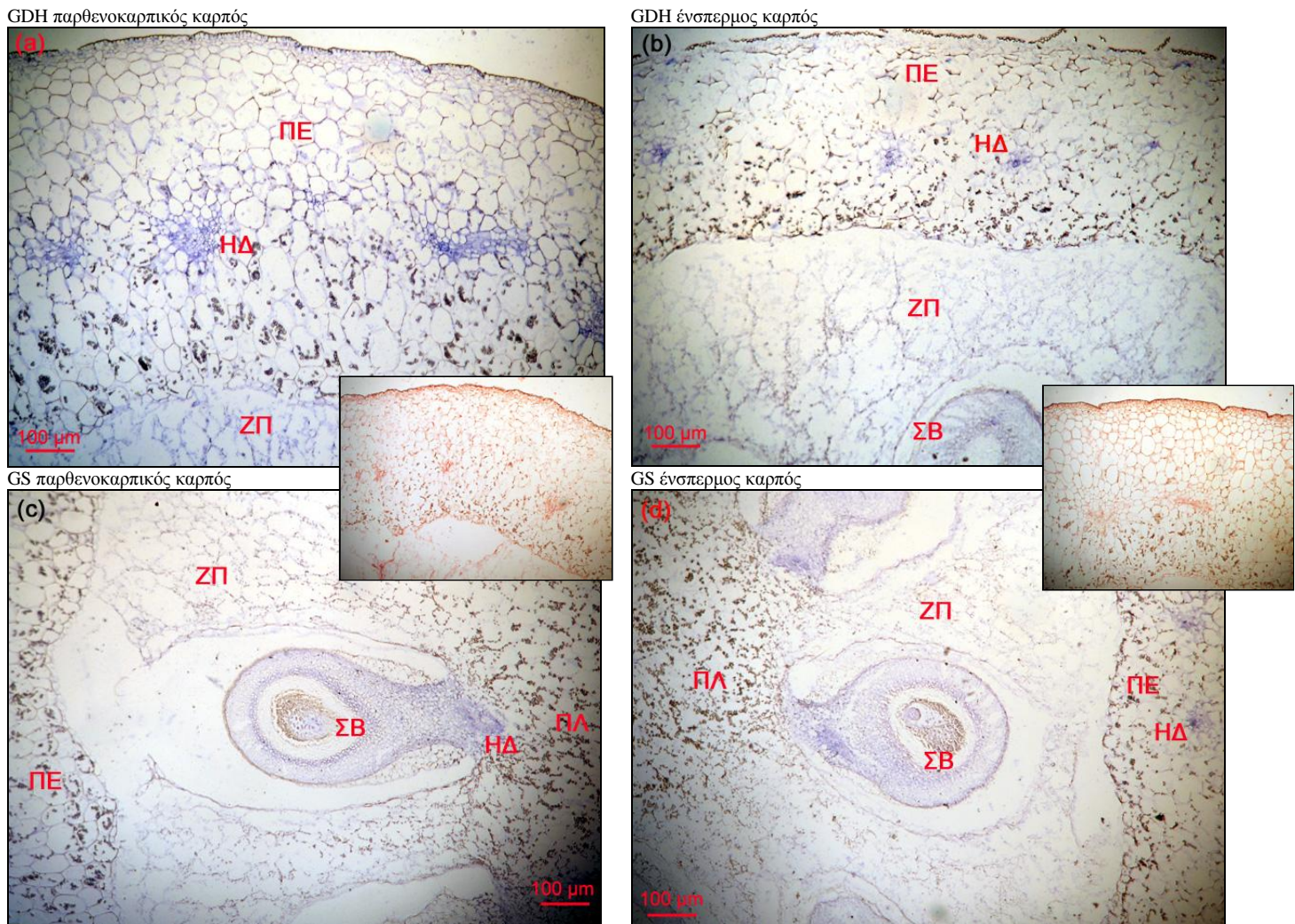
Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.2**, σε εγκάρσιες τομές παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ανώριμων καρπών διαμέτρου 0,5cm, και τα δυο ένζυμα εντοπίστηκαν κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Λιγότερο έντονο ήταν το σήμα στα κύτταρα του πλακούντα, του ζελατινώδους παρεγχύματος και του περικαρπίου. Στην **Εικόνα 3.3** παρουσιάζεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια η έντονη παρουσία και των δυο ενζύμων στις σπερματικές βλάστες παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών.



Εικόνα 3.3: Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού σε σπερματικές βλάστες ανώριμων καρπών διαμέτρου 0,5cm. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΣΒ, σπερματική βλάστη.

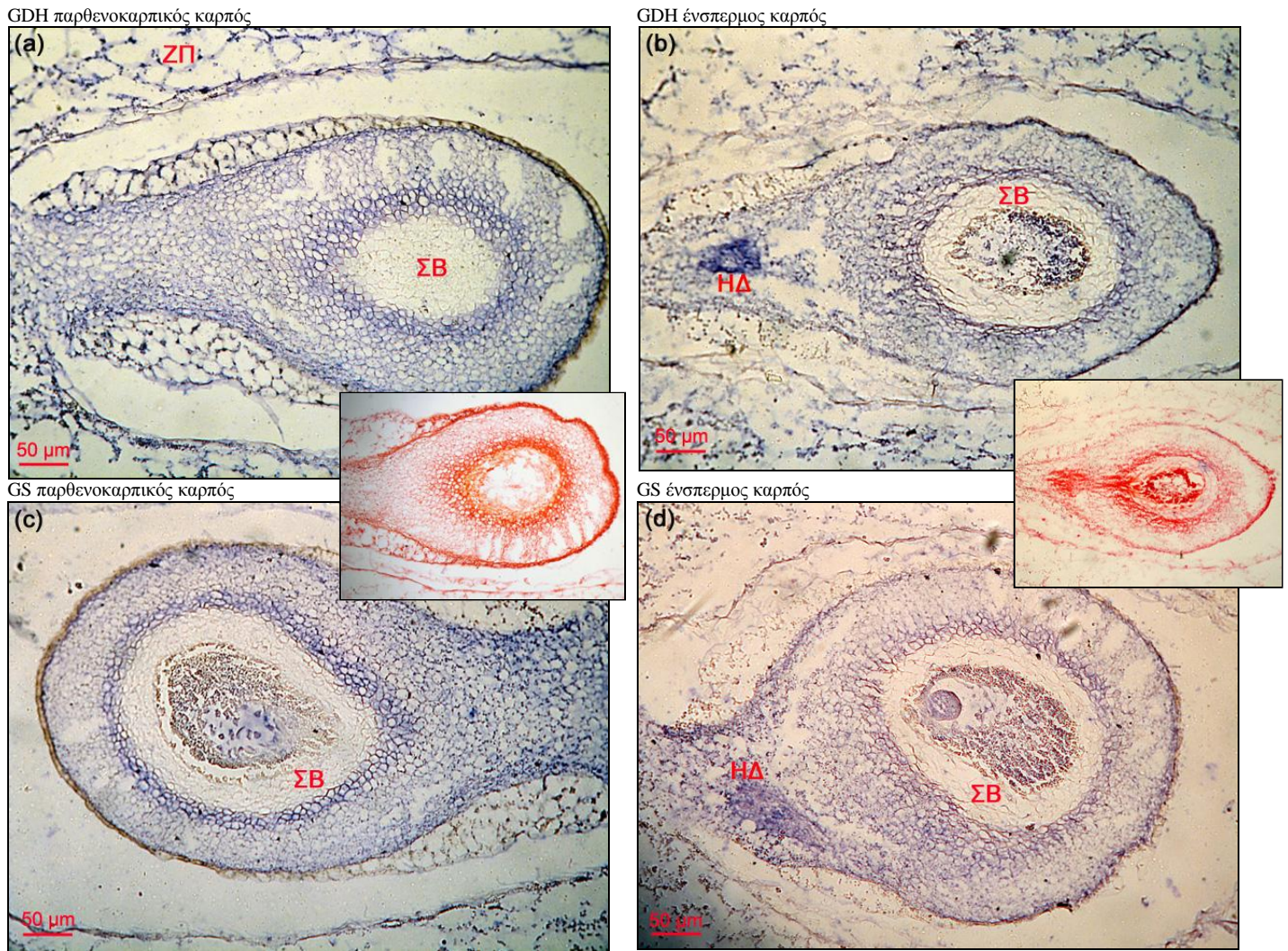
3.2.2. Ανώριμος καρπός διαμέτρου 1,5cm.

Στην **Εικόνα 3.4** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ανώριμων καρπών διαμέτρου 1,5cm, όπου διακρίνουμε ότι και τα δυο ένζυμα εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Αρκετά έντονο εμφανίζεται το σήμα στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος ενώ ασθενέστερο στα κύτταρα του πλακούντα και του περικαρπίου.



Εικόνα 3.4: Ανοσοεντοπισμός στο στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 1,5cm. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΕ, περικάρπιο, ΠΛ, πλακούντας, ΣΒ, σπερματική βλάστη.

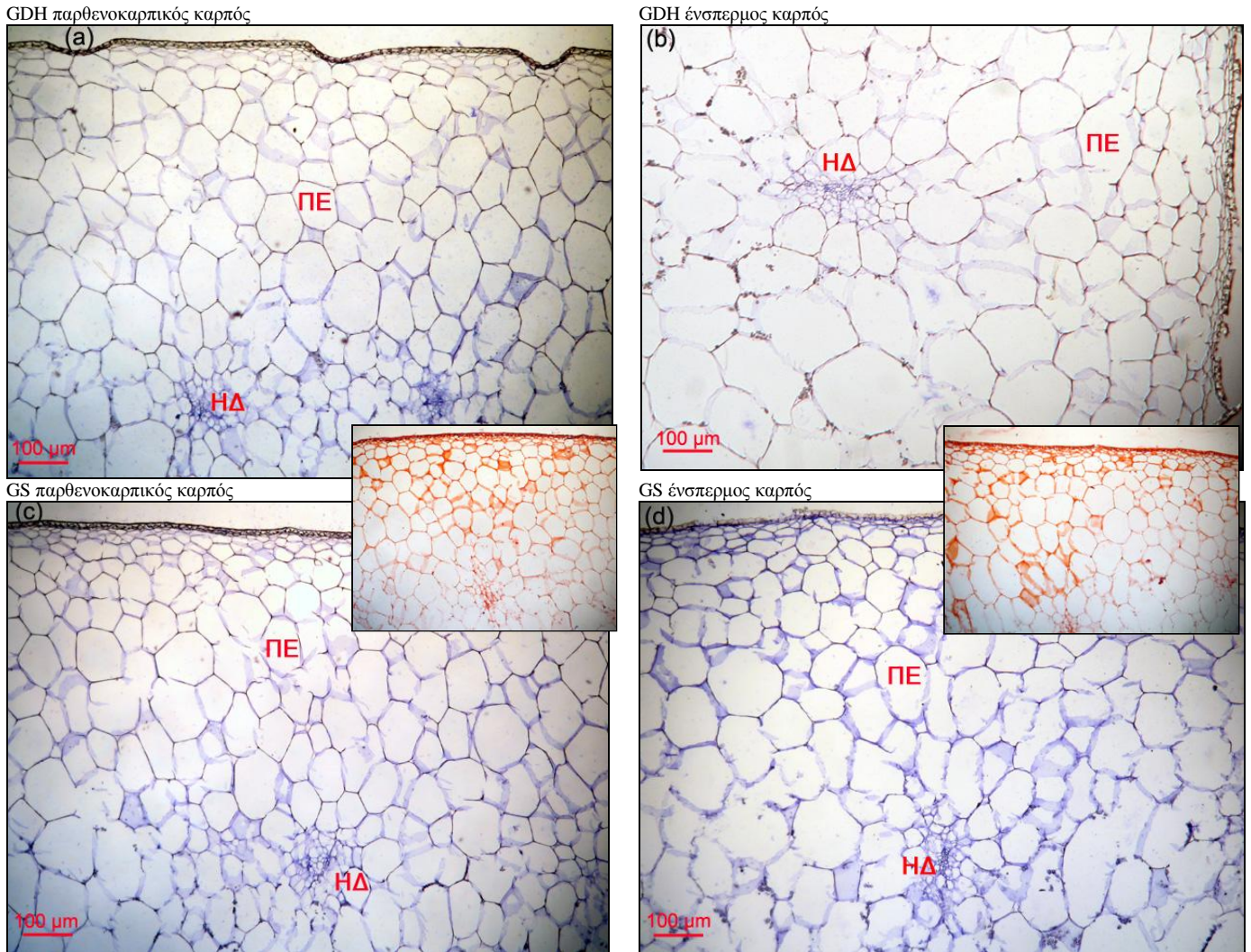
Στην **Εικόνα 3.5** παρουσιάζεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια η έντονη παρουσία και των δυο ενζύμων στις σπερματικές βλάστες παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών.



Εικόνα 3.5: Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού σε σπερματικές βλάστες ανώριμων καρπών διαμέτρου 1,5cm. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΣΒ, σπερματική βλάστη.

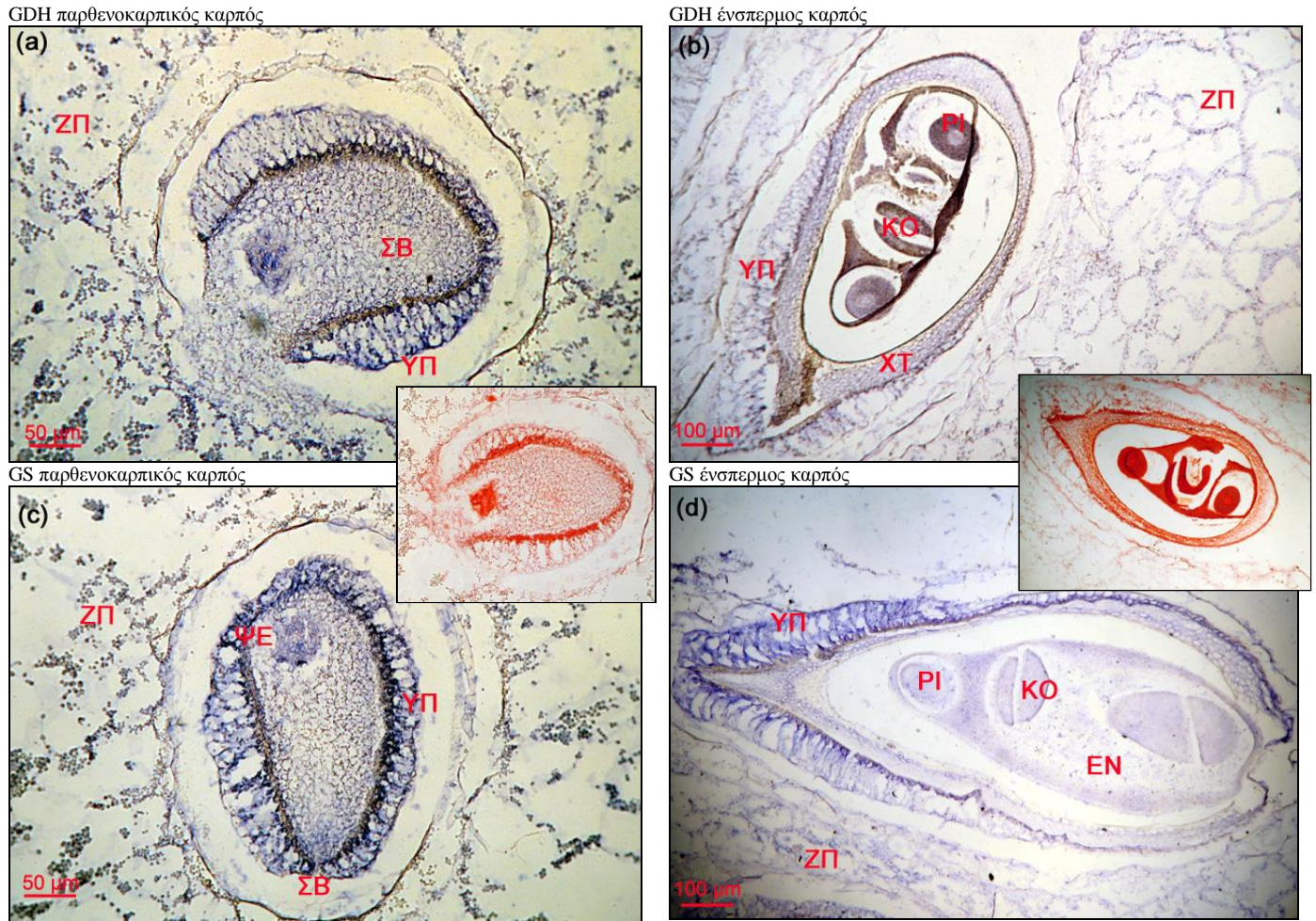
3.2.3. Ωριμος πράσινος καρπός.

Στην **Εικόνα 3.6** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές στην περιοχή του περικαρπίου παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ώριμων πράσινων καρπών, όπου διακρίνουμε ότι και τα δυο ένζυμα εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 3.6: Ανοσοεντοπισμός στο περικάρπιο ώριμων καρπών πράσινου χρώματος. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΕ, περικάρπιο.

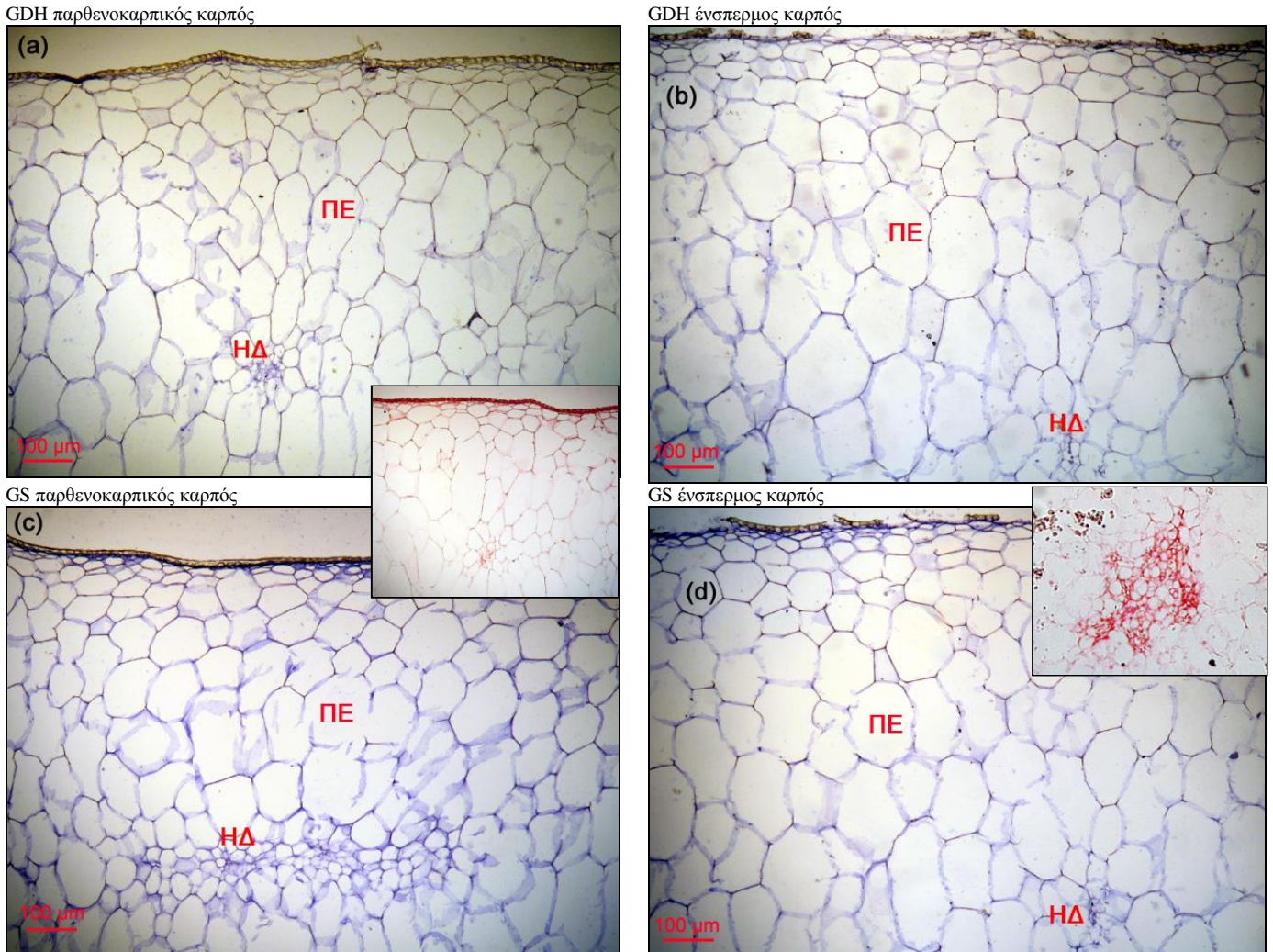
Στην **Εικόνα 3.7** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές στην περιοχή του ζελατινώδους παρεγχύματος παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ώριμων πράσινων καρπών, όπου διακρίνουμε την έντονη παρουσία και των δυο ενζύμων στις σπερματικές βλάστες και στους ιστούς των αναπτυσσόμενων σπερμάτων αντίστοιχα. Αρκετά έντονο εμφανίζεται το σήμα και στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος.



Εικόνα 3.7: Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού σε σπερματικές βλάστες και σπέρματα ώριμων καρπών πράσινου χρώματος. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΕΝ, ενδοσπέρμιο, ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΚΟ, κοτυληδόνας, ΡΙ, ριζίδιο, ΣΒ, σπερματική βλάστη, ΥΠ, υαλώδες παρέγχυμα, ΧΤ, εμβρυακός χιτώνας, ΨΕ, ψευδοέμβρυο.

3.2.4. Ωριμος καρπός στο στάδιο αλλαγής χρώματος.

Στην **Εικόνα 3.8** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές στην περιοχή του περικαρπίου παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ώριμων καρπών στην αλλαγή χρώματος, όπου διακρίνουμε ότι και τα δυο ένζυμα εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στο κυτταρόπλασμα.



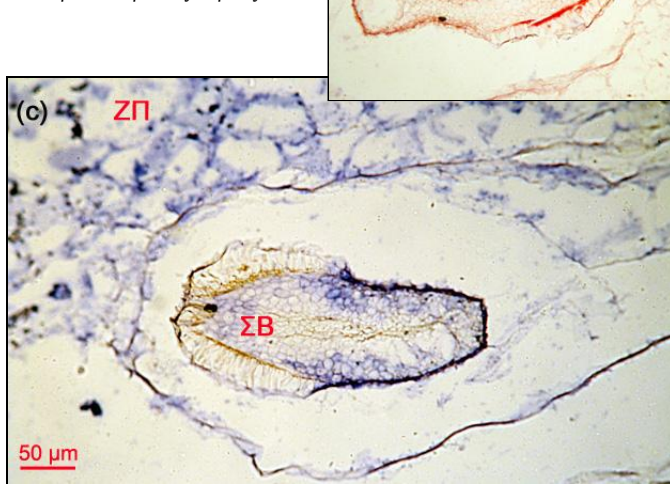
Εικόνα 3.8: Ανοσοεντοπισμός στο περικάρπιο ώριμων καρπών στην αλλαγή χρώματος. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΕ, περικάρπιο.

Στην **Εικόνα 3.9** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές στην περιοχή του ζελατινώδους παρεγχύματος παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ώριμων πράσινων καρπών, όπου διακρίνουμε την έντονη παρουσία και των δυο ενζύμων στις σπερματικές βλάστες και στους ιστούς των σχηματισμένων σπερμάτων αντίστοιχα. Αρκετά έντονο εμφανίζεται το σήμα και στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος.

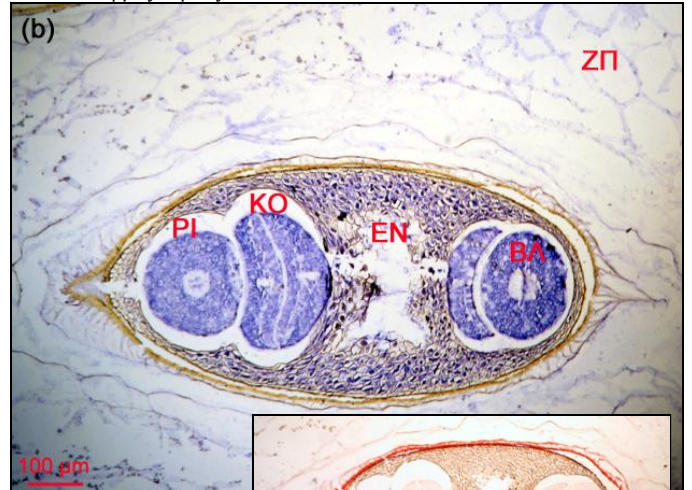
GDH παρθενοκαρπικός καρπός



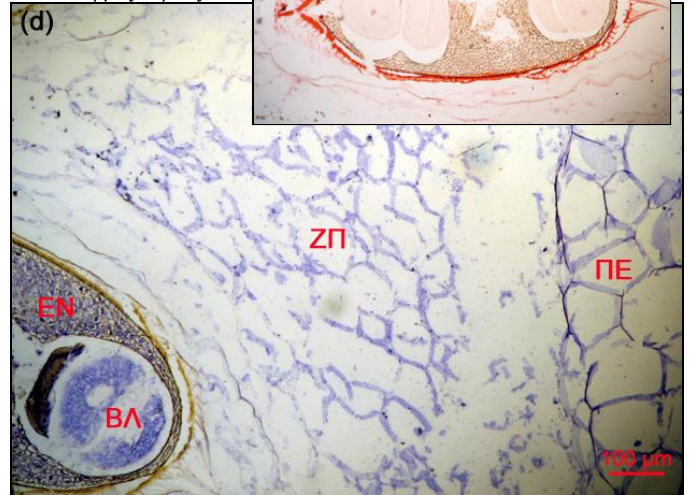
GS παρθενοκαρπικός καρπός



GDH ένσπερμος καρπός



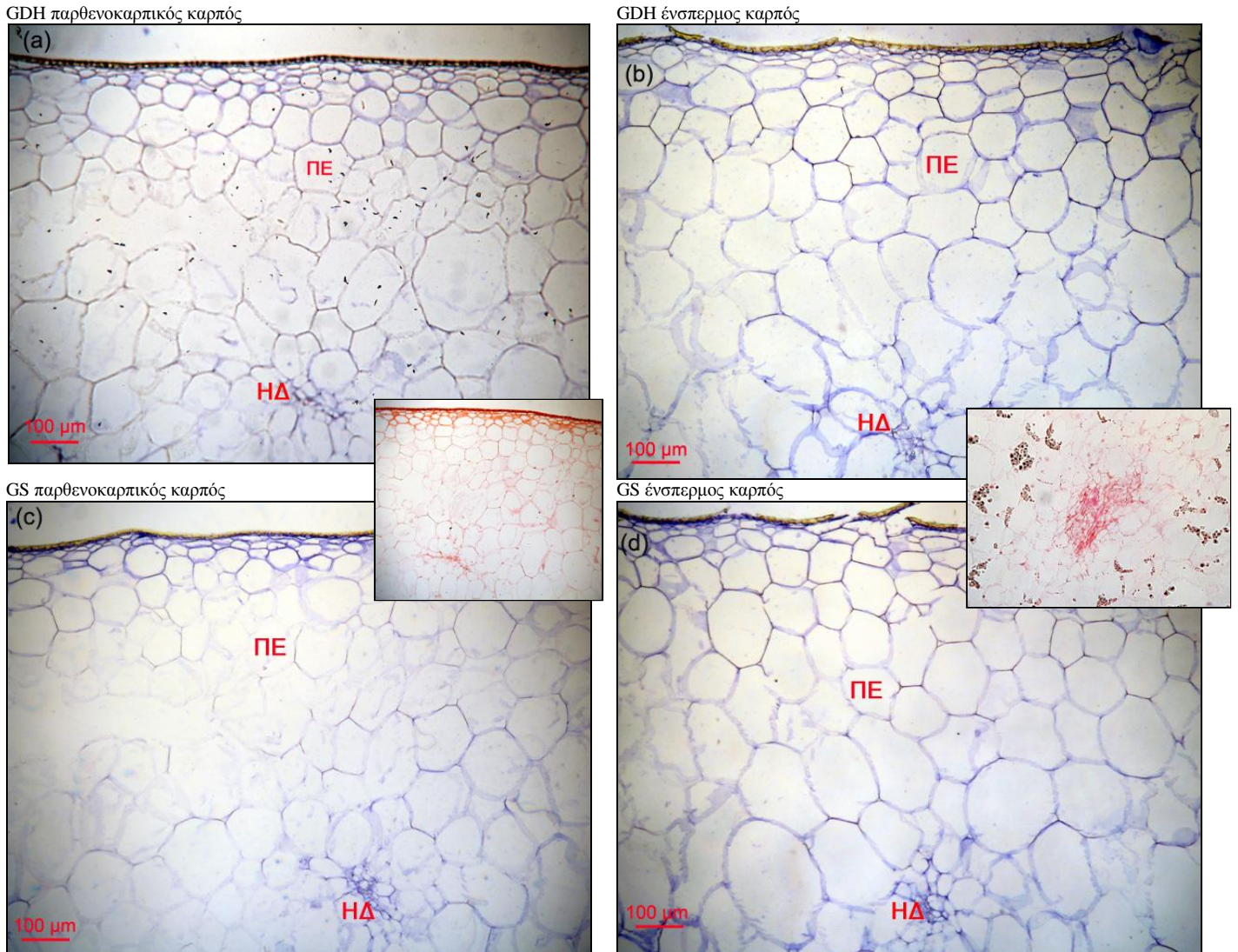
GS ένσπερμος καρπός



Εικόνα 3.9: Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού σε σπερματικές βλάστες και σπέρματα ώριμων καρπών στην αλλαγή χρώματος. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΒΛ, βλαστίδιο, ΕΝ, ενδοσπέρμιο, ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΚΟ, κοτυληδόνας, ΠΕ, περικάρπιο, ΡΙ, ριζίδιο, ΣΒ, σπερματική βλάστη.

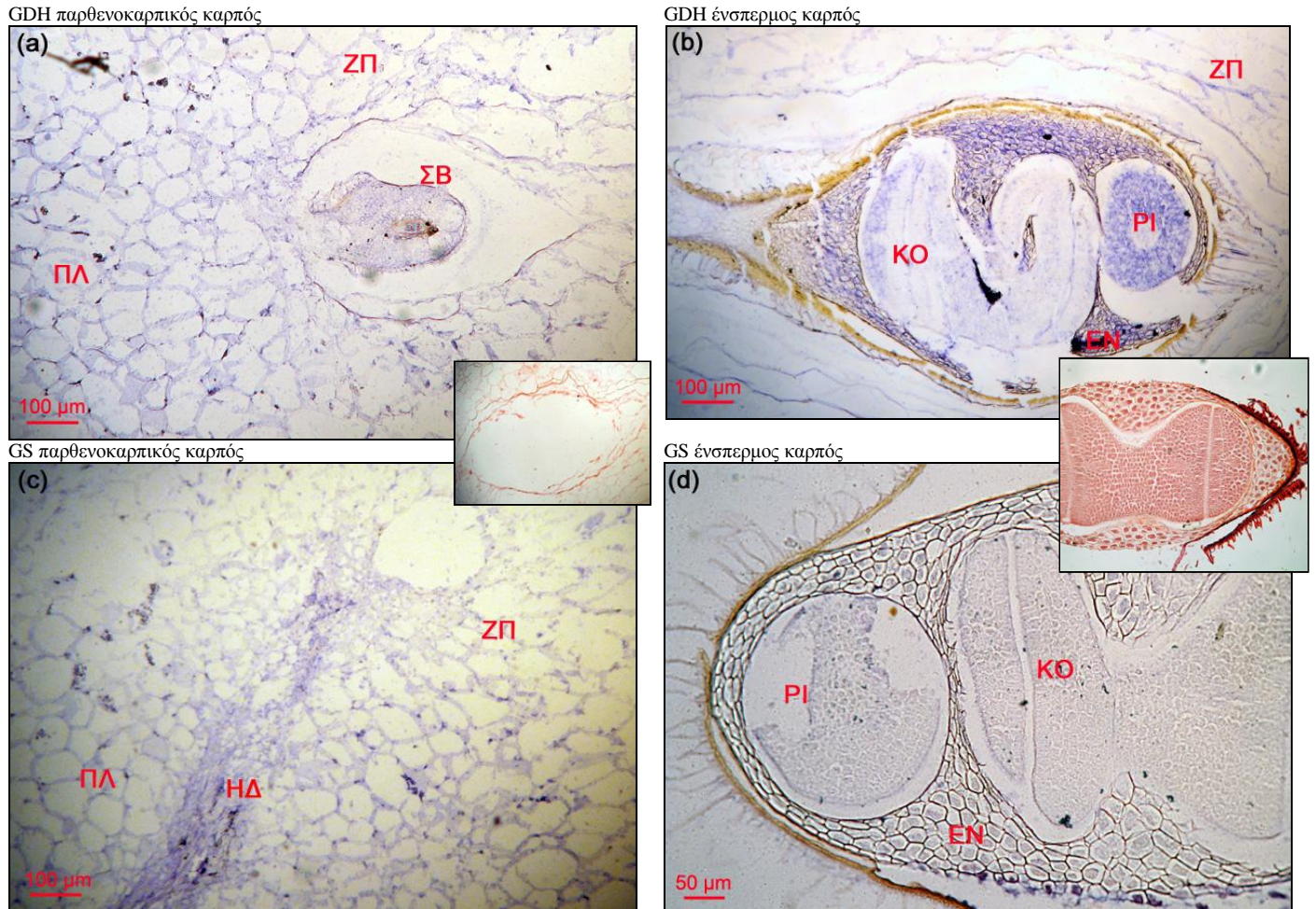
3.2.5. Ωριμος κόκκινος καρπός.

Στην **Εικόνα 3.10** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές στην περιοχή του περικαρπίου παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ώριμων κόκκινων καρπών, όπου διακρίνουμε ότι και τα δυο ένζυμα εντοπίζονται κατά κύριο λόγο στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στο κυτταρόπλασμα.



Εικόνα 3.10: Ανοσοεντοπισμός στο περικάρπιο ώριμων κόκκινων καρπών. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΕ, περικάρπιο.

Στην **Εικόνα 3.11** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές στην περιοχή του ζελατινώδους παρεγγύματος παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ώριμων πράσινων καρπών, όπου διακρίνουμε την έντονη παρουσία και των δυο ενζύμων στις σπερματικές βλάστες και στους ιστούς των σχηματισμένων σπερμάτων αντίστοιχα. Αρκετά έντονο εμφανίζεται το σήμα στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγγύματος και του πλακούντα.



Εικόνα 3.11: Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού στην περιοχή του ζελατινώδους παρεγγύματος ώριμων κόκκινων καρπών. (a) GDH σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, (b) GDH σε τομή ένσπερμου καρπού, (c) GS σε τομή παρθενοκαρπικού καρπού, και (d) GS σε τομή ένσπερμου καρπού. Η παρουσία του κάθε ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρες χρωματισμένοι με σαφρανίνη. ΕΝ, ενδοσπέρμιο, ΖΠ, ζελατινώδες παρέγγυμα, ΗΔ, ηθαγγειώδης δεσμίδα, ΚΟ, κοτυληδόνας, ΠΛ, πλακούντας, ΡΙ, ριζίδιο, ΣΒ, σπερματική βλάστη.

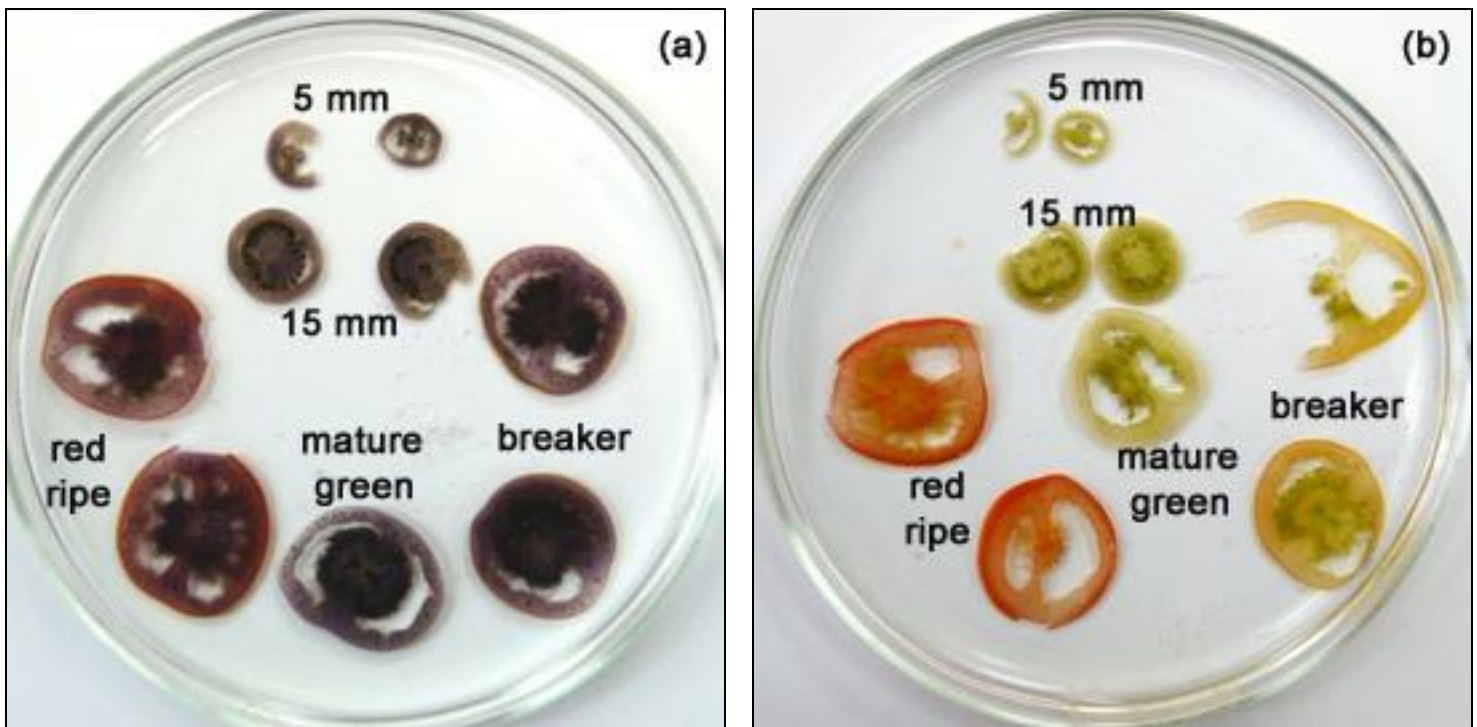
3.3. In situ εντοπισμός της δραστηριότητας της GDH.

Η δραστηριότητα της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού οξέος (GDH) εντοπίστηκε στους ιστούς παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας τύπου cherry, σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Ο μπλε-μοβ χρωματισμός δηλώνει τις θέσεις που είναι ενεργό το ένζυμο κατά τη στιγμή της προσήλωσης.

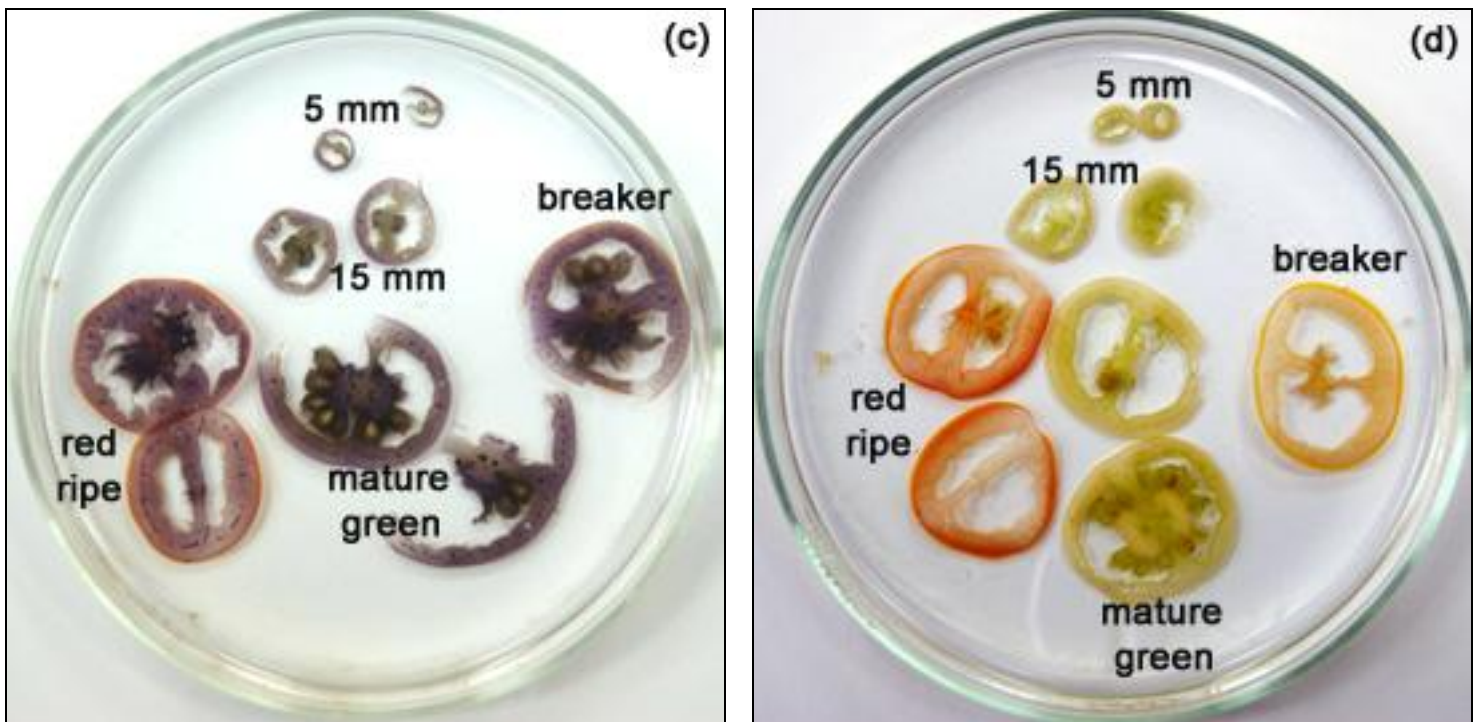
3.3.1. Συνολική παρουσίαση όλων των σταδίων ανάπτυξης του καρπού.

Το σήμα εντοπισμού είναι εμφανές στους περισσότερους ιστούς τόσο των παρθενοκαρπικών όσο και των ένσπερμων καρπών και σε όλα τα στάδια ανάπτυξης. Ιδιαίτερα έντονο παρουσιάζεται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στο ζελατινώδες παρέγχυμα που περιβάλλει τα σπέρματα ή τις σπερματικές βλάστες. Στους μάρτυρες, δηλαδή στις τομές που επώαστηκαν απουσία γλουταμινικού οξέος, δε διαπιστώθηκε η παρουσία χρώματος.

Η γενικευμένη κατανομή της δραστηριότητας της GDH σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες παρουσιάζεται συνολικά για όλα τα στάδια ανάπτυξης στην **Εικόνα 3.12**.



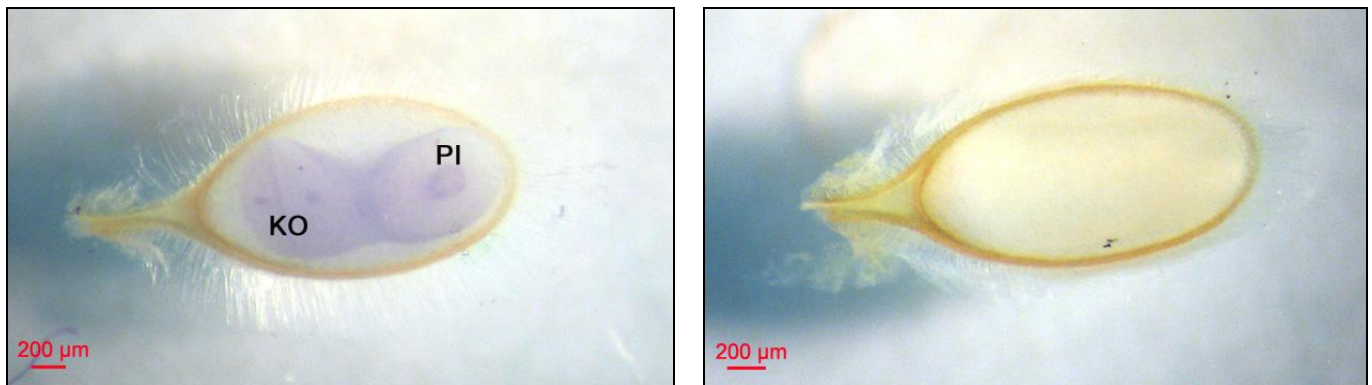
Εικόνα 3.12: Η κατανομή της δραστηριότητας της GDH στα διάφορα στάδια ανάπτυξης παρθενοκαρπικών (a) και ένσπερων καρπών (c) τομάτας, σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες (b, d). Τα στάδια ανάπτυξης που παρουσιάζονται είναι ανώριμος καρπός διαμέτρου 0,5cm (5mm) και 1,5cm (15 mm), ώριμος πράσινος (mature green), καρπός στην αλλαγή του χρώματος (breaker) και ώριμος κόκκινος (red ripe). Η δραστηριότητα του ενζύμου διακρίνεται από τον μπλε-μοβ χρωματισμό.



3.3.2. Αναλυτική παρουσίαση για κάθε στάδιο ανάπτυξης του καρπού.

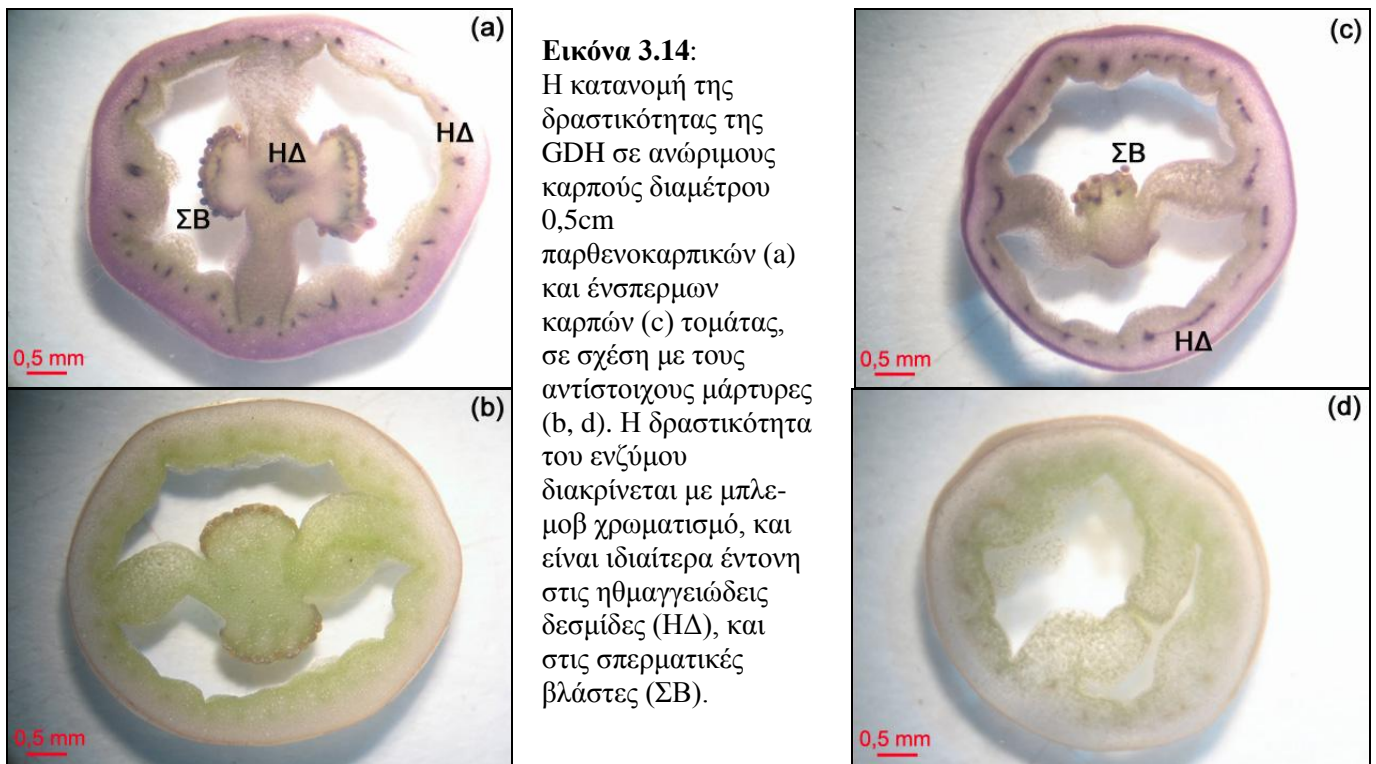
Στις Εικόνες 3.13 - 3.18 παρουσιάζεται η κατανομή της δραστικότητας της GDH σε τομή σπέρματος και σε τομές παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών, σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες, αναλυτικά για κάθε στάδιο ανάπτυξης. Ο μπλε-μοβ χρωματισμός δηλώνει τις θέσεις που είναι ενεργό το ένζυμο κατά τη στιγμή της προσήλωσης.

Σπέρματα ώριμων κόκκινων καρπών



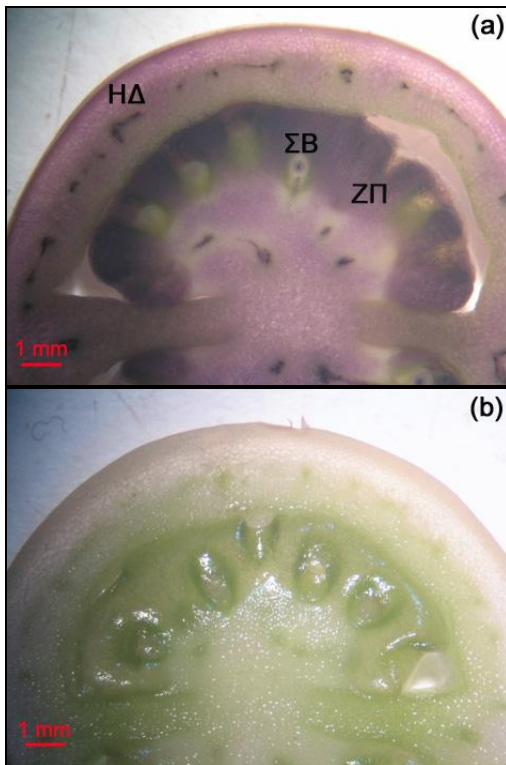
Εικόνα 3.13: Σε σπέρματα ώριμων κόκκινων καρπών η δραστικότητα της GDH εντοπίζεται στο έμβryo. Το σήμα είναι ιδιαίτερα έντονο στον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας. Δεξιά, μάρτυρας. ΚΟ, κοτυληδόνας, ΠΙ, εμβρυακή ρίζα.

Ανώριμος καρπός διαμέτρου 0,5cm

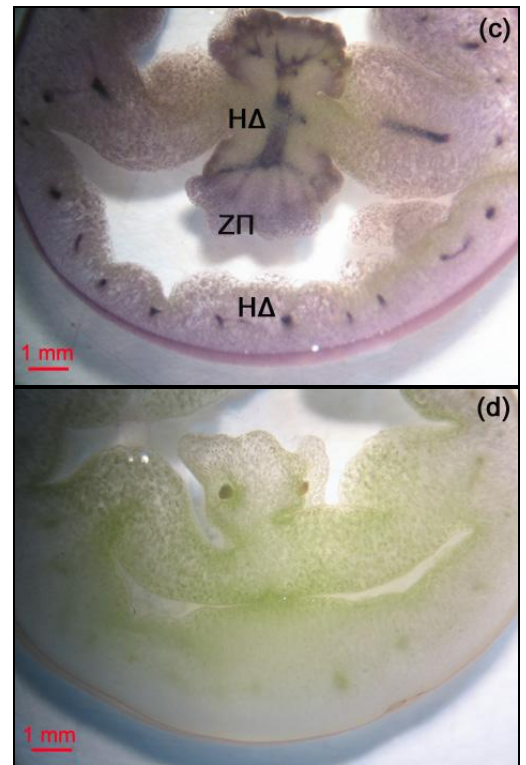


Εικόνα 3.14: Η κατανομή της δραστικότητας της GDH σε ανώριμους καρπούς διαμέτρου 0,5cm παρθενοκαρπικών (a) και ένσπερμων καρπών (c) τομάτας, σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες (b, d). Η δραστικότητα του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό, και είναι ιδιαίτερα έντονη στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), και στις σπερματικές βλάστες (ΣΒ).

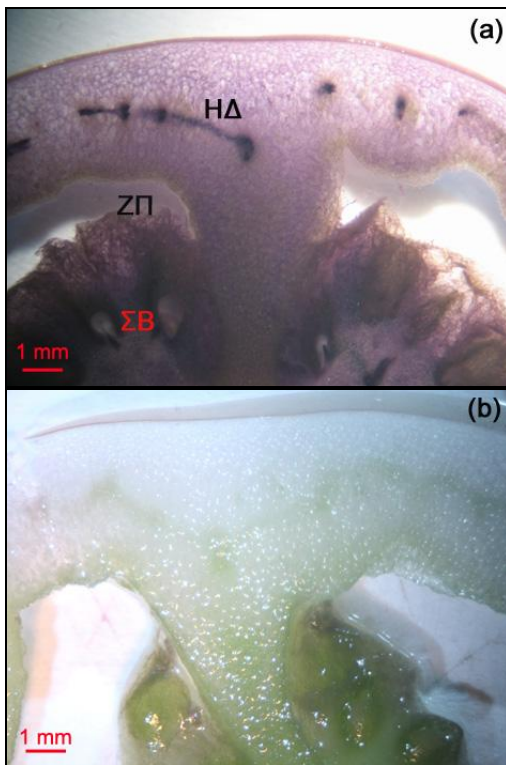
Ανώριμος καρπός διαμέτρου 1,5cm



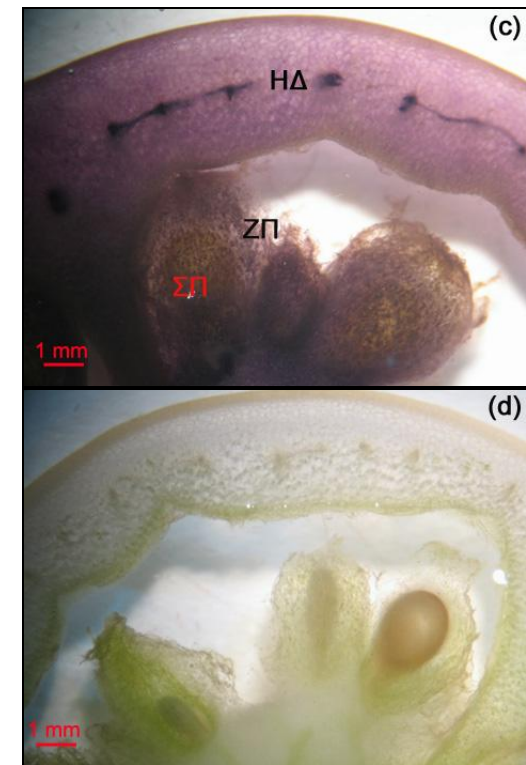
Εικόνα 3.15:
Η κατανομή της δραστηριότητας της GDH σε ανώριμους καρπούς διαμέτρου 1,5cm παρθενοκαρπικών (a) και ένσπερμων καρπών (c) τομάτας, σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες (b, d). Η δραστηριότητα του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό, και είναι ιδιαίτερα έντονη στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ) που περικλείει τις σπερματικές βλάστες (ΣΒ).



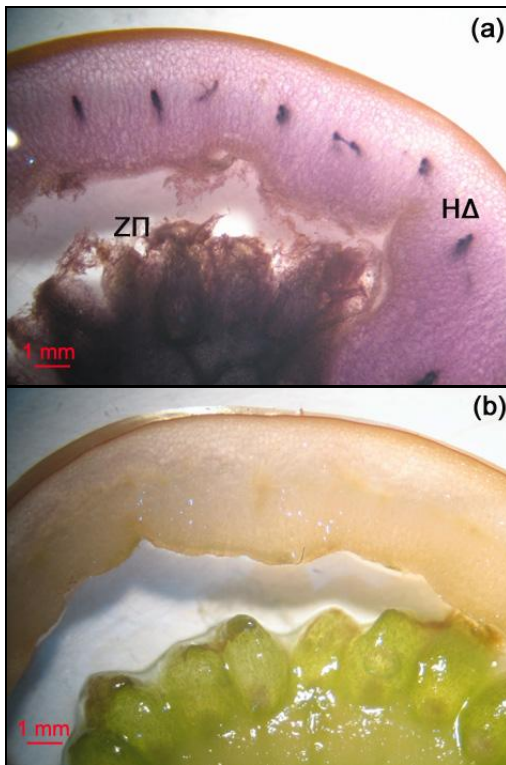
Ώριμος πράσινος καρπός



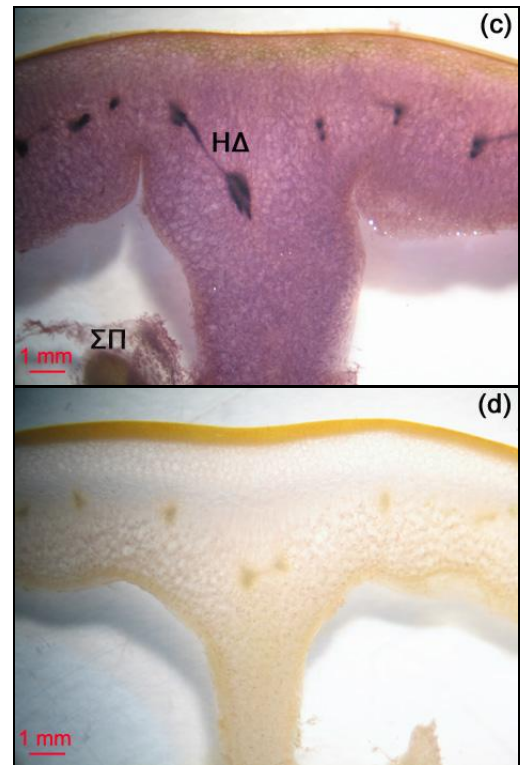
Εικόνα 3.16:
Η κατανομή της δραστηριότητας της GDH σε ώριμους πράσινους καρπούς παρθενοκαρπικών (a) και ένσπερμων καρπών (c) τομάτας, σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες (b, d). Η δραστηριότητα του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό, και είναι ιδιαίτερα έντονη στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ) που περικλείει τις σπερματικές βλάστες (ΣΒ) και τα σπέρματα (ΣΠ).



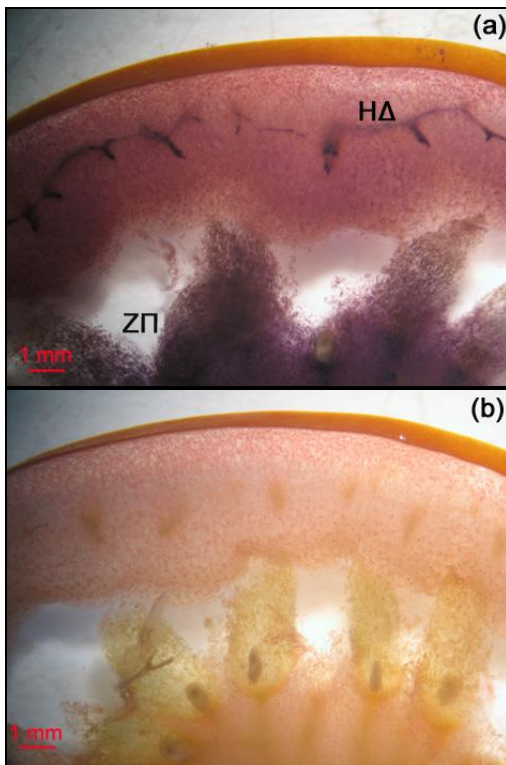
Καρπός στην αλλαγή χρώματος



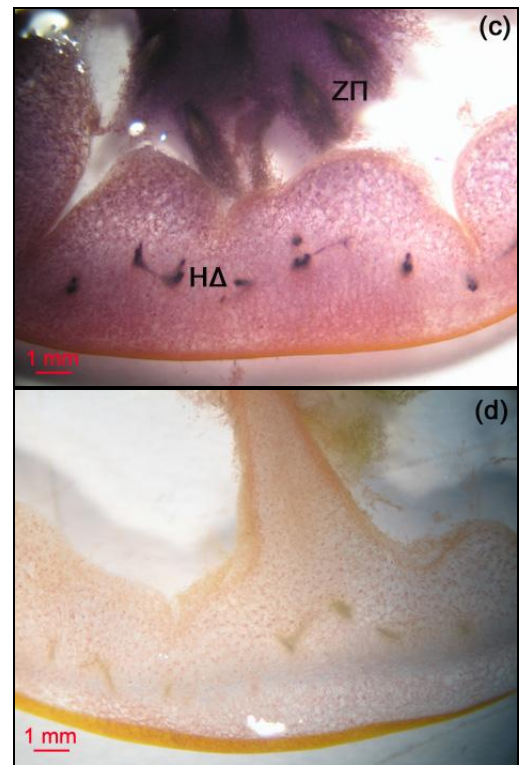
Εικόνα 3.17:
Η κατανομή της δραστηριότητας της GDH σε καρπούς στην αλλαγή χρώματος παρθενοκαρπικών (a) και ένσπερμων καρπών (c) τομάτας, σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες (b, d). Η δραστηριότητα του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό, και είναι ιδιαίτερα έντονη στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ) που περικλείει τις σπερματικές βλάστες (ΣΒ) και τα σπέρματα (ΣΠ).



Ωριμος κόκκινος καρπός



Εικόνα 3.18:
Η κατανομή της δραστηριότητας της GDH σε ώριμους κόκκινους καρπούς παρθενοκαρπικών (a) και ένσπερμων καρπών (c) τομάτας, σε σχέση με τους αντίστοιχους μάρτυρες (b, d). Η δραστηριότητα του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό, και είναι ιδιαίτερα έντονη στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ).



3.4. Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν GDH & GS στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού.

3.4.1. Έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν την GDH.

Η έρευνα με τον αλγόριθμο BLAST (Altschul *et al.*, 1997) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) στις διεθνείς γονιδιακές βάσεις δεδομένων έδειξε την παρουσία ESTs (Expressed Sequence Tags) τα οποία πιθανώς κωδικοποιούν την αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος.

Η πλήρης νουκλεοτιδική αλυσίδα (TC217332) του γονιδίου μετά την εύρεση του ανοικτού αναγνωστικού πλαισίου και τη μετάφρασή της, χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό ισότυπων GDH της τομάτας, με αποτέλεσμα την εύρεση οκτώ αμινοξικών αλληλουχιών. Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών αυτών, σε αμινοξικό επίπεδο, παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.19**. Παρατηρούμε ότι σχηματίζονται 3 ομάδες που περιέχουν πανομοιότυπες αλληλουχίες: η πρώτη ομάδα αποτελείται από τις αμινοξικές αλληλουχίες AAB39508, CAW35178 και CBC01220, η δεύτερη ομάδα από τις AAL36888, CAW35167 και CBC01209, και η τρίτη ομάδα από τις μεταφρασμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες AK325267 και BT012758 (**Πίνακας 3.1**). Επίσης, φαίνεται ότι οι δυο πρώτες ομάδες εμφανίζουν ομοιότητα σε πολύ υψηλό ποσοστό (98,5%).

		Εκατοστιαία Ομοιότητα									
		1	2	3	4	5	6	7	8		
Απόκλιση	1	■	98.5	98.5	100.0	98.5	100.0	79.8	79.8	1	AAB39508
	2	1.5	■	100.0	98.5	100.0	98.5	79.6	79.6	2	AAL36888
	3	1.5	0.0	■	98.5	100.0	98.5	79.6	79.6	3	CAW35167
	4	0.0	1.5	1.5	■	98.5	100.0	79.8	79.8	4	CAW35178
	5	1.5	0.0	0.0	1.5	■	98.5	79.6	79.6	5	CBC01209
	6	0.0	1.5	1.5	0.0	1.5	■	79.8	79.8	6	CBC01220
	7	23.6	23.9	23.9	23.6	23.9	23.6	■	100.0	7	BT012758
	8	23.6	23.9	23.9	23.6	23.9	23.6	0.0	■	8	AK325267
		1	2	3	4	5	6	7	8		

Πίνακας 3.1: Ποσοστά ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών που προκύπτουν από τη σύγκριση μεταξύ οκτώ υποτιθέμενων GDH τομάτας (AAB39508, CAW35178, CBC01220, AAL36888, CAW35167, CBC01209, και των μεταφρασμένων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών AK325267 και BT012758).

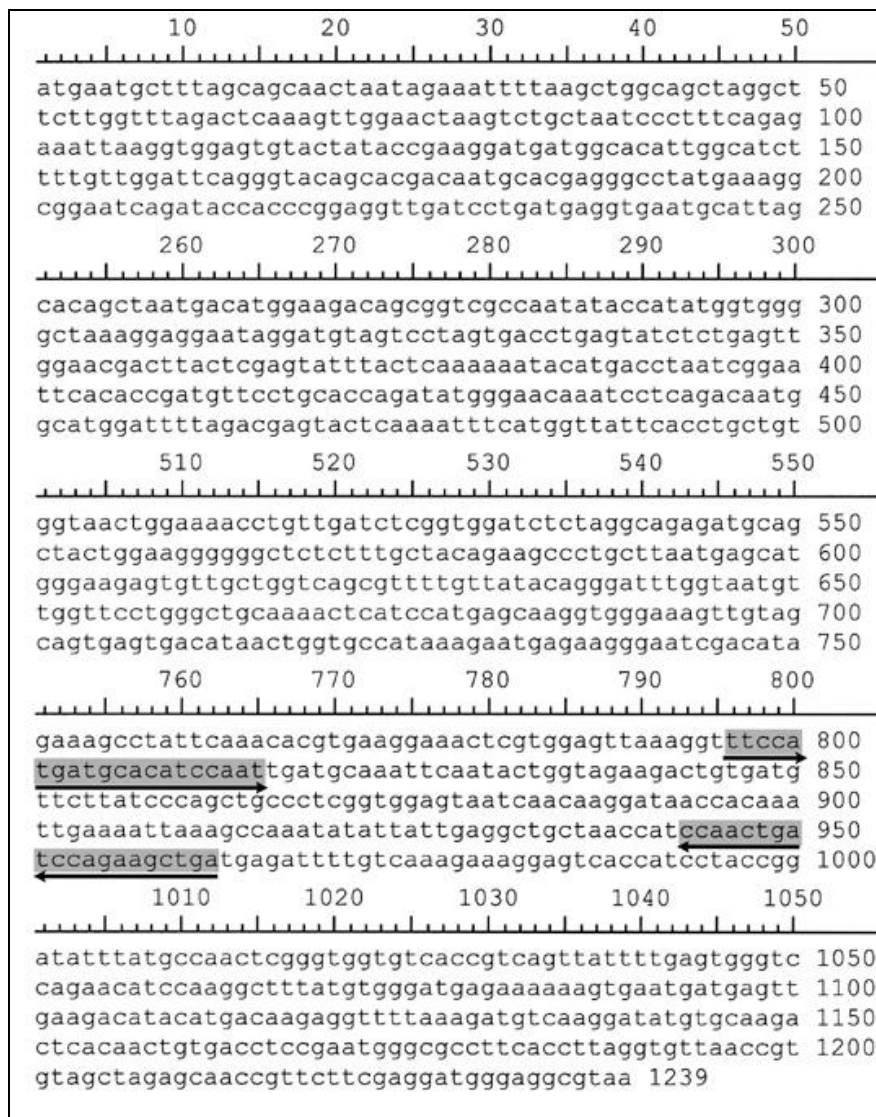
Η σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών της πρωτεΐνης που αντιστοιχεί στην AAB39508 της τομάτας (*Solanum lycopersicum*) με άλλες ήδη χαρακτηρισμένες αμινοξικές ακολουθίες φυτικών GDH (Πίνακας 3.2) έδειξε 80,3%, 79,6%, 78,8%, 78,3%, 87,6% και 80,8% ομολογία με τις αμινοξικές ακολουθίες των *Arabidopsis thaliana*, *Brassica napus*, *Zea mays*, *Nicotiana plumbaginifolia*, *Oryza sativa var. japonica* και *Ricinus communis* αντίστοιχα. Ομοίως, τα ποσοστά ομοιότητας της πρωτεϊνικής αλληλουχίας που αντιστοιχεί στη AK325267 ήταν 88,8%, 89,5%, 79,6%, 93,7%, 79,8%, 86,4% και 80,8% αντίστοιχα.

		Εκατοστιαία Ομοιότητα									
		1	2	3	4	5	6	7	8		
Απόκλιση	1		79.8	80.3	79.6	78.8	78.3	87.6	80.8	1	AAB39508
	2	23.6		88.8	89.5	79.6	93.7	79.8	86.4	2	AK325267
	3	22.9	12.2		95.4	80.3	87.1	79.8	89.5	3	<i>Arabidopsis thaliana</i>
	4	23.9	11.3	4.8		79.8	88.6	80.0	89.3	4	<i>Brassica napus</i>
	5	24.9	23.9	22.9	23.6		79.3	79.8	80.5	5	<i>Zea mays</i>
	6	25.6	6.6	14.2	12.4	24.3		80.3	86.6	6	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
	7	13.6	23.6	23.6	23.3	23.6	22.9		80.8	7	<i>Oryza sativa var. japonica</i>
	8	22.3	15.1	11.3	11.6	22.6	14.8	22.3		8	<i>Ricinus communis</i>
		1	2	3	4	5	6	7	8		

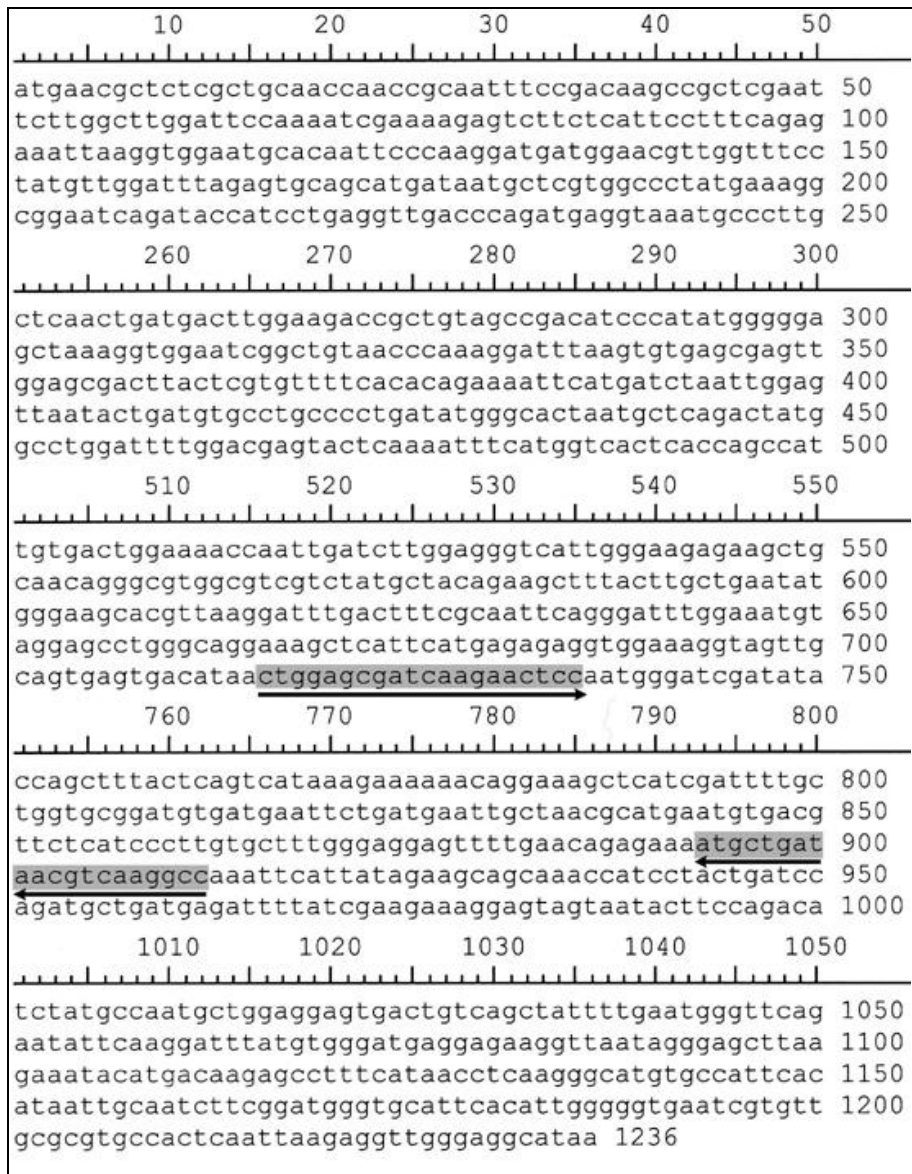
Πίνακας 3.2: Ποσοστά ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών που προκύπτουν από τη σύγκριση μεταξύ δυο υποτιθέμενων GDH τομάτας (AAB39508, AK325267) και ήδη χαρακτηρισμένων GDH σε φυτά *Arabidopsis thaliana*, ελαιοκράμβης (*Brassica napus*), αραβόσιτου (*Zea mays*), καπνού (*Nicotiana plumbaginifolia*), ρυζιού (*Oryza sativa var. japonica*) και ρίκινου (*Ricinus communis*).

Το υψηλό ποσοστό ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών που αντιστοιχούν στις δυο υπό εξέταση αμινοξικές αλληλουχίες με ήδη χαρακτηρισμένες ως GDH αμινοξικές ακολουθίες υποδεικνύει ότι τα AAB39508 και AK325267 όντως αντιστοιχούν στην GDH της τομάτας. Στην **Εικόνα 3.20** παρουσιάζεται η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών της τομάτας με άλλες ήδη χαρακτηρισμένες ως φυτικές GDH αμινοξικές ακολουθίες.

Μετά την ταυτοποίηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές για τα γονίδια που κωδικοποιούν την GDH στην τομάτα. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, εντοπίστηκαν τρεις ομάδες πανομοιότυπων αμινοξικών αλληλουχιών. Παρά το γεγονός ότι οι δυο πρώτες ομάδες (των AAB39508 και AAL36888) παρουσιάζουν μικρές διαφορές σε αμινοξικό επίπεδο, είναι σε μεγάλο ποσοστό (98,5%) όμοιες (Πίνακας 3.1). Συνέπεια αυτού ήταν να επιλεγεί ζευγάρι εκκινητών που να υβριδίζουν σε συντηρημένες περιοχές των παραπάνω αλληλουχιών (Εικόνα 3.21). Επιπλέον, σχεδιάστηκε δεύτερο ζευγάρι εκκινητών που να υβριδίζει με την τρίτη ομάδα γονιδίων (AK325267), ώστε να καταγράψουμε μετά από PCR την έκφραση όλων των αλληλουχιών (Εικόνα 3.22).



Εικόνα 3.21: Σχεδιασμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ορθόδρομου εκκινητή (5'-TTCCATGATGCACATCC AAT-3') και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας οπισθόδρομου εκκινητή (5'-CCAACTGATCCAGAAGC TGA-3'). Το ζεύγος των εκκινητών σχεδιάστηκε για να υβριδίζει με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία που αντιστοιχεί στην AAB39508.



Εικόνα 3.22: Σχεδιασμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ορθόδρομου εκκινητή (5'-CTGGAGCGATCAAGA ACTCC-3') και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας οπισθόδρομου εκκινητή (5'-ATGCTGATAACGTCA AGGCC-3'). Το ζεύγος των εκκινητών σχεδιάστηκε για να υβριδίζει με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία AK325267.

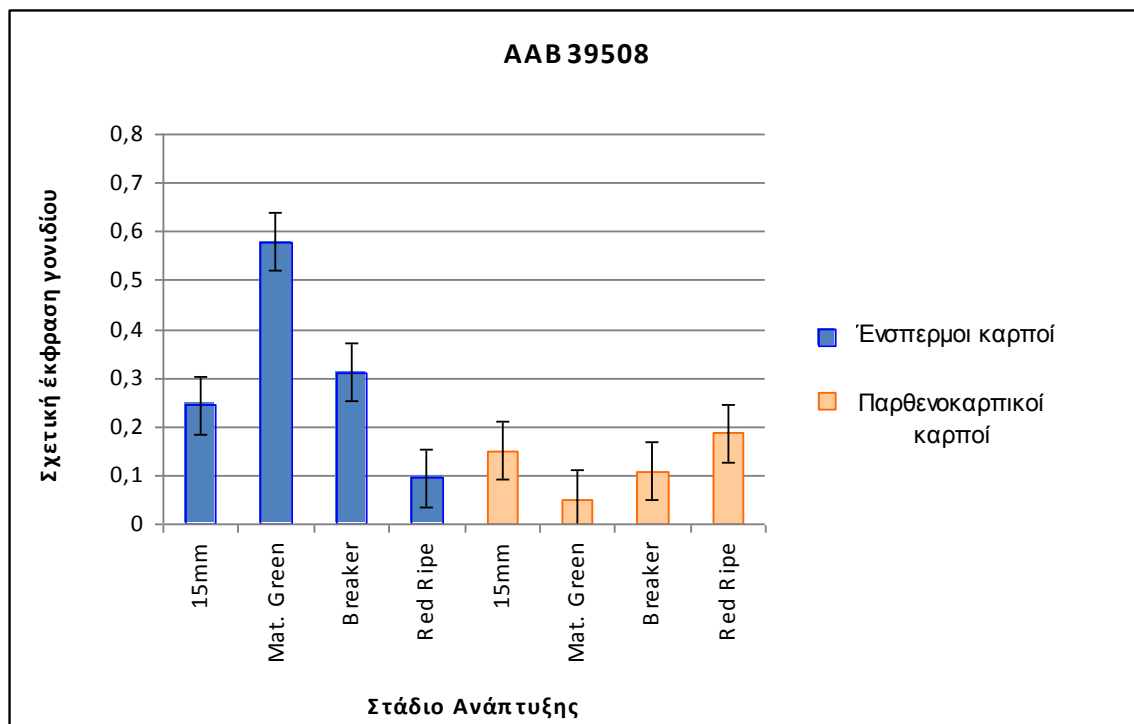
Οι επιλεγμένοι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή real time-PCR, με σκοπό τη μελέτη έκφρασης των γονιδίων της GDH και τον προσδιορισμό της συσσώρευσης των μεταγραφημάτων τους, στα διάφορα στάδια ανάπτυξης παρθενοκαρπικών και ένσπερων καρπών τομάτας τύπου cherry.

Οι ποσότητες του ολικού RNA που απομονώθηκαν από κάθε στάδιο ανάπτυξης, και χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση, κανονικοποιήθηκαν με βάση την ενίσχυση τμήματος ενός σταθερής έκφρασης γονιδίου (house keeping), της ουμπικουτίνης (Ubiquitin), το οποίο εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της τομάτας.

Πραγματοποιήθηκαν δυο PCR, η πρώτη για να μελετηθεί η έκφραση των δυο πρώτων ομάδων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (που αντιπροσωπεύονται από το AAB39508), και η δεύτερη PCR για να μελετηθεί η έκφραση της τρίτης ομάδας

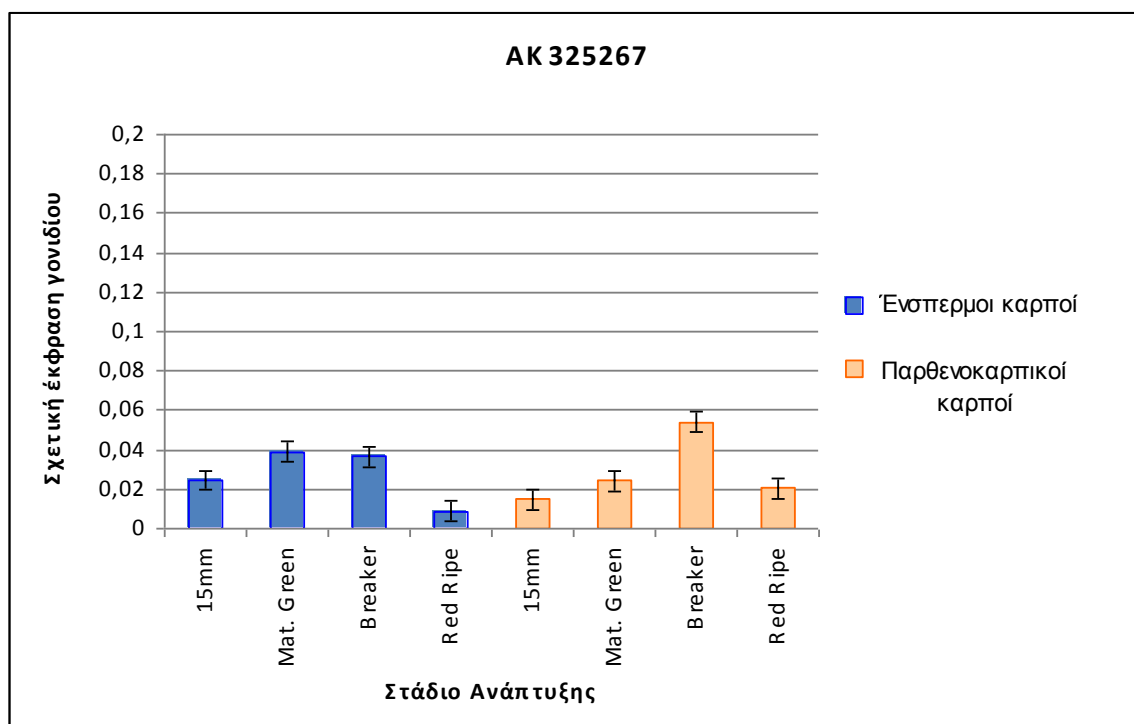
νουκλεοτιδικών αλληλουχιών (που αντιπροσωπεύεται από το AK325267). Σε κάθε PCR χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο ζευγάρι εκκινητών.

Τα αποτελέσματα της πρώτης PCR (**Σχήμα 3.1**), δείχνουν ότι η έκφραση του γονιδίου GDH (που αντιστοιχεί στο AAB39508) ήταν μεγαλύτερη στους ένσπερμους καρπούς σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς καρπούς, στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού και στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Στα άλλα δυο στάδια ανάπτυξης δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών. Ιδιαίτερα έντονη ήταν η διαφορά της σχετικής έκφρασης του γονιδίου στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, όπου στους ένσπερμους καρπούς παρατηρήθηκε μέγιστη τιμή.



Σχήμα 3.1: Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων (σχετική έκφραση) του γονιδίου GDH (που αντιστοιχεί στο AAB39508) στα στάδια του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, του πράσινου καρπού (Mature Green), αλλαγής χρώματος (Breaker) και του ώριμου κόκκινου καρπού (Red Ripe), σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.2**, στη δεύτερη PCR δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη έκφραση του γονιδίου σε κανένα από τα στάδια ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το γονίδιο *GDH* που αντιστοιχεί στο AK325267 δεν εκφράζεται ιδιαίτερα έντονα στους ιστούς του καρπού της τομάτας, είτε είναι παρθενοκαρπικός είτε είναι ένσπερμος. Το συμπέρασμα αυτό συμφωνεί με δεδομένα έκφρασης του γονιδίου από τη βάση δεδομένων DFCI (Plant Gene Indices), όπου αναφέρεται ότι η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου εντοπίζεται κυρίως στην ρίζα, και ότι είναι ελάχιστη στον καρπό.



Σχήμα 3.2: Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων (σχετική έκφραση) του γονιδίου *GDH* (που αντιστοιχεί στο AK325267) στα στάδια του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, του πράσινου καρπού (Mature Green), αλλαγής χρώματος (Breaker) και του ώριμου κόκκινου καρπού (Red Ripe), σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς.

3.4.2. Έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν την GS.

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία με το προηγούμενο κεφάλαιο, εντοπίστηκαν δυο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (TC191691, AK319584), οι οποίες πιθανώς κωδικοποιούν το ένζυμο συνθετάση της γλουταμίνης της τομάτας. Η ευθυγράμμιση των δυο αλληλουχιών, σε αμινοξικό επίπεδο, με άλλες ήδη χαρακτηρισμένες αμινοξικές ακολουθίες φυτικών GS, και το υψηλό ποσοστό ομοιότητας με αυτές, υποδεικνύουν ότι όντως κωδικοποιούν την GS στην τομάτα.

Πιο συγκεκριμένα, η νουκλεοτιδική αλληλουχία TC191691 συσχετίστηκε με τον κυτταροπλασματικό ισότυπο GS1 αφού, η αμινοξική ακολουθία που προέκυψε από τη μετάφρασή της δεν περιείχε πεπτίδιο-οδηγό. Η ευθυγράμμιση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας που προκύπτει από τη μετάφρασή της, (**Εικόνα 3.25**), έδειξε 98,3%, 90,1%, 89,3%, 87,9% και 87,6% ομολογία με τις αμινοξικές ακολουθίες GS1 των *Solanum tuberosum*, *Medicago sativa*, *Pisum sativum*, *Oryza sativa var. japonica* και *Zea mays* αντίστοιχα (**Πίνακας 3.3**).

Ομοίως, το AK319584 μετά τη μετάφρασή του χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πεπτιδίου οδηγού με τη χρήση του προγράμματος Target P. Πράγματι, βρέθηκε πλαστιδιακό πεπτίδιο οδηγός και ως εκ τούτου συσχετίστηκε με τον πλαστιδιακό ισότυπο GS2 και μετά την ευθυγράμμιση της, σε αμινοξικό επίπεδο (**Εικόνα 3.26**), έδειξε 97,0%, 88,0%, 87,6%, 86,7%, 80,7% και 80,3% ομολογία με τις αμινοξικές ακολουθίες GS2 των *Solanum tuberosum*, *Daucus carota*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Oryza sativa var. japonica* και *Zea mays* αντίστοιχα (**Πίνακας 3.4**).

		Εκατοστιαία Ομοιότητα							
		1	2	3	4	5	6		
Απόκλιση	1		98.3	90.1	89.3	87.9	87.6	1	TC191691
	2	1.7		90.1	88.4	87.3	87.0	2	<i>Solanum tuberosum</i>
	3	10.6	10.7		91.3	88.2	87.1	3	<i>Medicago sativa</i>
	4	11.6	12.7	9.3		86.2	85.4	4	<i>Pisum sativum</i>
	5	13.3	14.0	12.9	15.2		94.4	5	<i>Oryza sativa var. japonica</i>
	6	13.6	14.4	14.2	16.3	5.8		6	<i>Zea mays</i>
		1	2	3	4	5	6		

Πίνακας 3.3: Ποσοστά ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών που προκύπτουν από τη σύγκριση μεταξύ του TC191691 και ήδη χαρακτηρισμένων κυτταροπλασματικών GS1 σε φυτά πατάτας (*Solanum tuberosum*), μηδικής (*Medicago sativa*), μοσχομπίζελου (*Pisum sativa*), ρυζιού (*Oryza sativa var. japonica*) και αραβόσιτου (*Zea mays*).

		Εκατοστιαία Ομοιότητα								
		1	2	3	4	5	6	7		
Απόκλιση	1		97.0	88.0	87.6	86.7	80.7	80.3	1	AK319584
	2	3.1		87.0	86.0	85.3	80.7	79.1	2	<i>Solanum tuberosum</i>
	3	13.2	14.3		86.9	86.2	80.5	79.6	3	<i>Daucus carota</i>
	4	13.5	15.5	14.4		91.3	81.4	80.1	4	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	5	14.7	16.4	15.3	9.2		81.3	81.0	5	<i>Medicago sativa</i>
	6	22.4	22.4	22.7	21.4	21.5		90.5	6	<i>Oryza sativa var. japonica</i>
	7	22.9	24.5	23.8	23.2	22.0	10.2		7	<i>Zea mays</i>
		1	2	3	4	5	6	7		

Πίνακας 3.4: Ποσοστά ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών που προκύπτουν από τη σύγκριση μεταξύ του AK319584 και ήδη χαρακτηρισμένων πλαστιδιακών GS2 σε φυτά πατάτας (*Solanum tuberosum*), καρότου (*Daucus carota*), φασολιού (*Phaseolus vulgaris*), μηδικής (*Medicago sativa*), ρυζιού (*Oryza sativa var. japonica*) και αραβόσιτου (*Zea mays*).

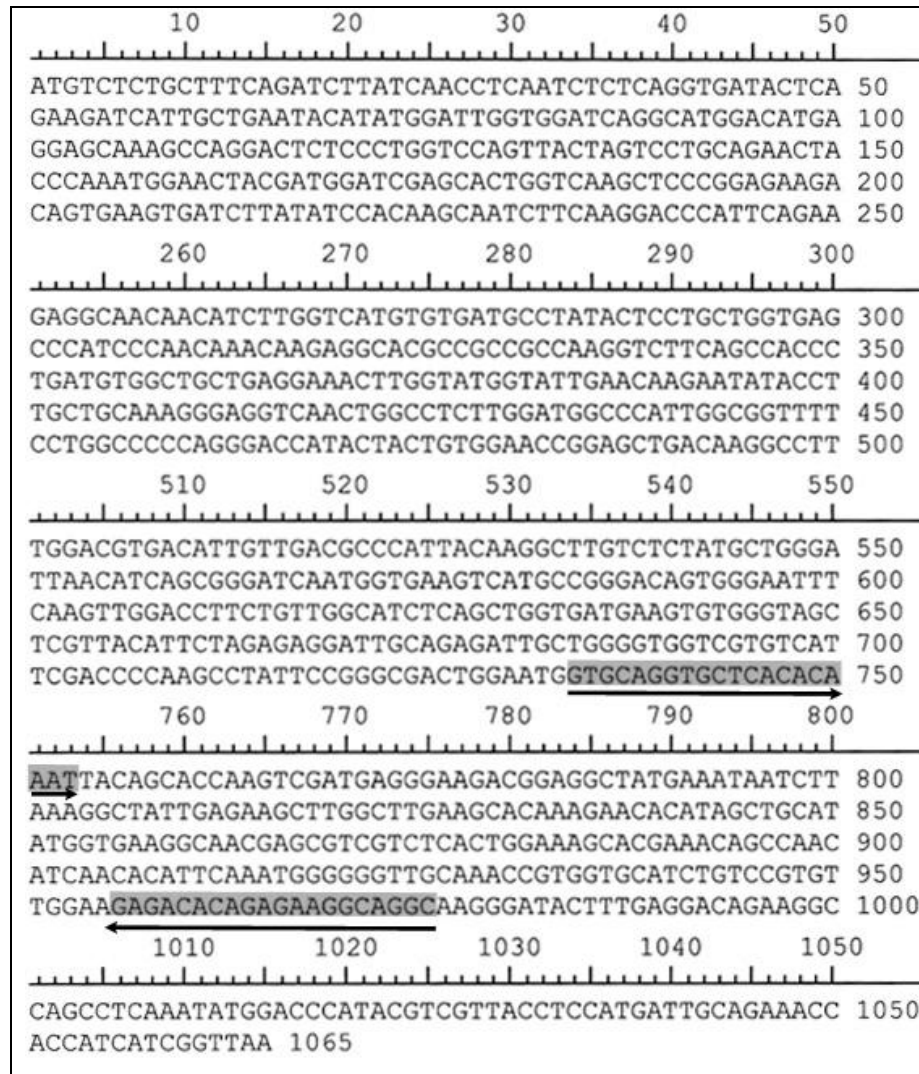
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	M S L L S D L I N L N L S G D T T Q K I I A E Y I W I G G S G G M S L L S D L I N L N L S G D T T Q K I I A E Y I W I G G S G G M S L L S D L I N L N L S G D T T Q K I I A E Y I W I G G S G G M A S L T D L V N L N L S D T T E K I I A E E Y I W I G G S G G M A C L T D L V N L N L S D T T E K I I A E E Y I W I G G S G G
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	M D M R S K A R T L P G P V T T S P A E L P K W N Y D G S S S T M D M R S K A R T L P G P V T T S P A E L P K W N Y D G S S S T L D L R S K A R T L P G P V T T D P S Q E L P K W N Y D G S S S T M D L R S K A R T L P G P V T T D P S K L P K W N Y D G S S S T M D L R S K A R T L P G P V T T D P S K L P K W N Y D G S S S T
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	G Q A P G E D S E E V I L Y P Q A I F K D D P F R R R G N N I L V G Q A P G E D S E E V I I Y P Q A I F K D D P F R R R G N N I L V G Q A P G E D S E E V I L Y P Q A I F K D D P F R R R G N N I L V G Q A P G E D S E E V I L Y P Q A I F K D D P F R R R G N N I L V G Q A P G E D S E E V I L Y P Q A I F K D D P F R R R G N N I L V
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	M C D A Y T P A G E E P I P T N K R R H A A A K V F S H P D V A M C D A Y T P A G E E P I P T N K R R H A A A K V F S H P D V A M C D A Y T P A G E E P I P T N K R R H A A A K V F S H P D V A M C D C Y T P A G E E P I P T N K R R Y S A A A K I F S S S P E V A M C D C Y T P A G E E P I P T N K R R Y S A A A K I F S S S P E V A
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	A E E T W Y G I E Q E E Y T L L Q K E V N W P L G W P I G G F F A E E T W Y G I E Q E E Y T L L Q K E V N W P L G W P I G G F F A E E T W Y G I E Q E E Y T L L Q K E V N W P L G W P I G G F F A E E T W Y G I E Q E E Y T L L Q K E V N W P L G W P I G G F F A E E T W Y G I E Q E E Y T L L Q K E V N W P L G W P I G G F F
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	P G P Q G P Y Y C G T G A D K A F G R D I V D A H Y K A C L L P G P Q G P Y Y C G T G A D K A F G R D I V D A H Y K A C L L P G P Q G P Y Y C G T G A D K A F G R D I V D A H Y K A C L L P G P Q G P Y Y C G T G A D K A F G R D I V D A H Y K A C L L P G P Q G P Y Y C G T G A D K A F G R D I V D A H Y K A C L L
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	Y A G I N I S G I N G E E V M P G Q W E F Q V V G P S V G I S A Y A G I N I S G I N G E E V M P G Q W E F Q V V G P S V G I S A Y A G I N I S G I N G E E V M P G Q W E F Q V V G P S V G I S A Y A G I N I S G I N G E E V M P G Q W E F Q V V G P S V G I S A Y A G I N I S G I N G E E V M P G Q W E F Q V V G P S V G I S A
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	G D E V W V A R Y I L E R I A E E I A G V V V S F D D P K P I P G D E V W V A R Y I L E R I A E E I A G V V V S F D D P K P I P G D E I W V A R Y I L E R I T E E E V A G V V V L L T S F D D P K P I P G D Q V W V A R Y I L E R I T E E I A G V V V T F D D P K P I P G D Q V W V A R Y I L E R I T E E I A G V V V T F D D P K P I P
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	G D W N G A G A H T N Y S T K S M R E D G G G Y E I I L K A I G D W N G A G A H T N Y S T K S M R E D G G G Y E I I L K A I G D W N G A G A H T N Y S T K S M R E D G G G Y E I I L K A I G D W N G A G A H T N Y S T K S M R E D G G G Y E I I L K A I G D W N G A G A H T N Y S T E S M R K E G G Y E V I K A A I
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	E K L G L K H K E H I A A Y G E E G N E R R L T G K H E T A N E K L G L K H K E H I A A Y G E E G N E R R L T G K H E T A N E K L G K R H A E H I S A Y G E E G N E R R L T G R H E T A D E K L K L R H K E H I S A Y G E E G N E R R L T G R H E T A D E K L K L R H K E H I S A Y G E E G N E R R L T G R H E T A D
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	I N T F K W G V A N R R G A S V R V G R D T E E K A G K G Y F E E I N T F L W G V A N R R G A S V R V G R D T E E K A G K G Y F E E I N T F S W G V A N R R G A S V R V G R D T E E K A G K G Y F E E I N T F S W G V A N R R G A S V R V G R D T E E Q N G K G Y F E E I N T F S W G V A N R R G A S V R V G R D T E E Q N G K G Y F E E
TC191691 Q9FPT9_SOLTU GLNA1_MEDSA A1IVX1_PEA GLN11_ORYSJ B9TSW5_MAIZE	D R R P A S N M D P Y V V T S M I A E T T I I G D R R P A S N M D P Y V V T S M I A E T T I I V G D R R P S S N M D P Y V V T S M I A D T T T I L W K P D R R P A S N M D P Y V V T S M I A E T T I L L K P P D R R P A S N M D P Y I V V T S M I A E T T I I W K P P D R R P A S N M D P Y V V T S M I A E T T I I W K P P

Εικόνα 3.25:
Ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών της κυτοπλασματικής GS της τομάτας (TC191691) με ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες της κυτοπλασματικής GS σε φυτά πατάτας (SOLTU), μηδικής (MEDSA), μοσχομπίζελου (PEA), ρυζιού (ORYSJ) και αραβόσιτου (MAIZE). Τα μαύρα πλαίσια υποδηλώνουν συντηρημένα αμινοξέα στην πλειοψηφία των αμινοξικών αλληλουχιών.

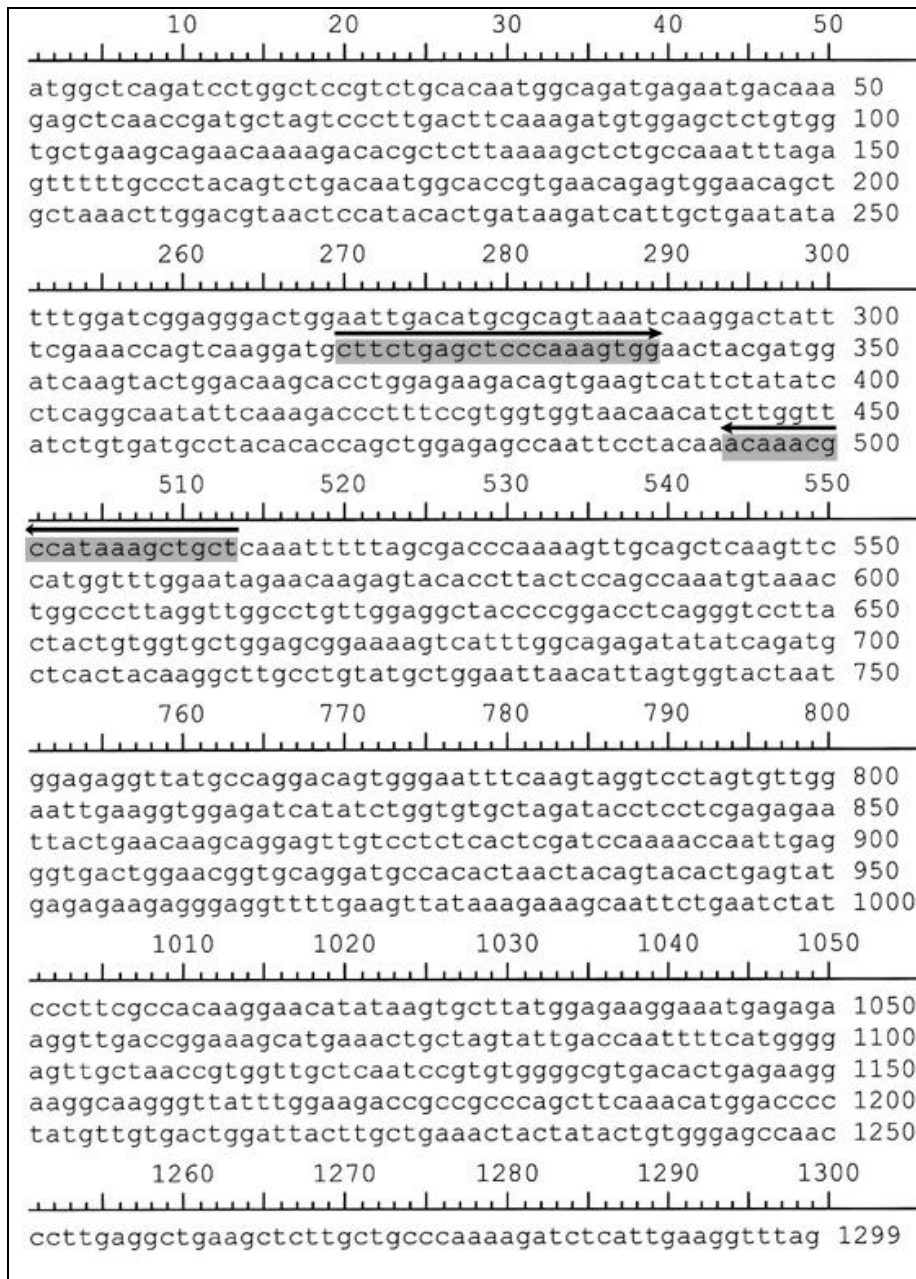
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	M A Q I L A P S S A Q O W W M R M K K S - - - T D A P S P L T T K K A A Q O I I L L A A P P P P S S S S Q Q O O W W M R R M F F K K S N - - - S T R P A - D A V A A A K S S P L M I T T T S S S K K M A A Q O I I L L A A P P P P S S S S Q Q O O W W M R R M F F K K S N - - - S T R P A - D A V A A A K S S P L M I T T T S S S K K M A A Q O I I L L A A P P P P S S S S Q Q O O W W M R R M F F K K S N - - - S T R P A - D A V A A A K S S P L M I T T T S S S K K
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	M W S S V V L L K K K R H A L K S S S A F F V V A L A Q S S N N M W S S V V L L K K K R H A L K S S S A F F V V A L A Q S S N N M W S S V V L L K K K R H A L K S S S A F F V V A L A Q S S N N M W S S V V L L K K K R H A L K S S S A F F V V A L A Q S S N N
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	- G T V N R V M E Q L L L N L L D V V P P Y Y T T K K I I A A E E Y I W I G G - G T V N R V M E Q L L L N L L D V V P P Y Y T T K K I I A A E E Y I W I G G - G T V N R V M E Q L L L N L L D V V P P Y Y T T K K I I A A E E Y I W I G G - G T V N R V M E Q L L L N L L D V V P P Y Y T T K K I I A A E E Y I W I G G
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	G T G I D M R S K K R R R T T I S K P P V K K D A E E E L P K W N Y Y D G G G G T G I D M R S K K R R R T T I S K P P V K K D A E E E L P K W N Y Y D G G G G T G I D M R S K K R R R T T I S K P P V K K D A E E E L P K W N Y Y D G G G G T G I D M R S K K R R R T T I S K P P V K K D A E E E L P K W N Y Y D G G G
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	S S S T G Q A A P P G E D D S S S E V I L L Y Y P Q O A A A F I K K D D D P P P R R R G G G N N N S S S T G Q A A P P G E D D S S S E V I L L Y Y P Q O A A A F I K K D D D P P P R R R G G G N N N S S S T G Q A A P P G E D D S S S E V I L L Y Y P Q O A A A F I K K D D D P P P R R R G G G N N N S S S T G Q A A P P G E D D S S S E V I L L Y Y P Q O A A A F I K K D D D P P P R R R G G G N N N
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	I L V I C D A Y T P P A G E E E P I P T N T K R R K A A A A Q I F F S D D P P I L V I C D A Y T P P A G E E E P I P T N T K R R K A A A A Q I F F S D D P P I L V I C D A Y T P P A G E E E P I P T N T K R R K A A A A Q I F F S D D P P I L V I C D A Y T P P A G E E E P I P T N T K R R K A A A A Q I F F S D D P P
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	K V A A Q S V P W F G G I E Q O E E Y Y T L L L Q P N V N W P L P G W P V V K V A A Q S V P W F G G I E Q O E E Y Y T L L L Q P N V N W P L P G W P V V K V A A Q S V P W F G G I E Q O E E Y Y T L L L Q P N V N W P L P G W P V V K V A A Q S V P W F G G I E Q O E E Y Y T L L L Q P N V N W P L P G W P V V
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	G G Y P P P Q Q G G P P Y Y Y G A A A V A E K K S S F F G R R D D D D A A H Y K K G G Y P P P Q Q G G P P Y Y Y G A A A V A E K K S S F F G R R D D D D A A H Y K K G G Y P P P Q Q G G P P Y Y Y G A A A V A E K K S S F F G R R D D D D A A H Y K K G G Y P P P Q Q G G P P Y Y Y G A A A V A E K K S S F F G R R D D D D A A H Y K K
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	A C L Y A A G I N I S S G G T N T N G G E V V M P P P G G W E E F F Q Q V V P P S V V G G A C L Y A A G I N I S S G G T N T N G G E V V M P P P G G W E E F F Q Q V V P P S V V G G A C L Y A A G I N I S S G G T N T N G G E V V M P P P G G W E E F F Q Q V V P P S V V G G A C L Y A A G I N I S S G G T N T N G G E V V M P P P G G W E E F F Q Q V V P P S V V G G
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	I E G G D H I W C A R Y L L L E E R I T T E E Q A G V V L S L L L P P P K K I E G G D H I W C A R Y L L L E E R I T T E E Q A G V V L S L L L P P P K K I E G G D H I W C A R Y L L L E E R I T T E E Q A G V V L S L L L P P P K K I E G G D H I W C A R Y L L L E E R I T T E E Q A G V V L S L L L P P P K K
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	P I E G D D W N G A A G C C H T N Y Y S T T L S S M R R R R R E E E G G G F F F V I I K K P I E G D D W N G A A G C C H T N Y Y S T T L S S M R R R R R E E E G G G F F F V I I K K P I E G D D W N G A A G C C H T N Y Y S T T L S S M R R R R R E E E G G G F F F V I I K K P I E G D D W N G A A G C C H T N Y Y S T T L S S M R R R R R E E E G G G F F F V I I K K
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	K A I L N L S L L R H H K K E H I S A Y G G E E G G G N N R R R R R T T T G K K H H E E K A I L N L S L L R H H K K E H I S A Y G G E E G G G N N R R R R R T T T G K K H H E E K A I L N L S L L R H H K K E H I S A Y G G E E G G G N N R R R R R T T T G K K H H E E K A I L N L S L L R H H K K E H I S A Y G G E E G G G N N R R R R R T T T G K K H H E E
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	T A S I D Q F S S W G V A N R R R G C C S I S R R R V G V G R D T T T E E K K A K G K R G T A S I D Q F S S W G V A N R R R G C C S I S R R R V G V G R D T T T E E K K A K G K R G T A S I D Q F S S W G V A N R R R G C C S I S R R R V G V G R D T T T E E K K A K G K R G T A S I D Q F S S W G V A N R R R G C C S I S R R R V G V G R D T T T E E K K A K G K R G
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	Y L E D R R R P A S N M D P Y V V T T G L L A A E E T T T I L W E P P T T Y L E D R R R P A S N M D P Y V V T T G L L A A E E T T T I L W E P P T T Y L E D R R R P A S N M D P Y V V T T G L L A A E E T T T I L W E P P T T Y L E D R R R P A S N M D P Y V V T T G L L A A E E T T T I L W E P P T T
AK319584 Q9FPU0_SOLTU GLNA2_DAUCA GLNA4_PHAVU GLNA2_MEDSA GLNA2_ORYSJ B4FMX4_MAIZE	L E A E A L A A A O K I S L K K V L E A E A L A A A O K I S L K K V L E A E A L A A A O K I S L K K V L E A E A L A A A O K I S L K K V

Εικόνα 3.26:
Ευθυγράμμιση των αμινοξικών ακολουθιών της πλαστιδιακής GS στην τομάτα (AK319584) με ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες της πλαστιδιακής GS σε φυτά πατάτας (SOLTU), καρότου (DAUCA), φασολιού (PHAVU), μηδικής (MEDSA), ρυζιού (ORYSJ) και αραβόσιτου (MAIZE). Τα μαύρα πλαίσια υποδηλώνουν συντηρημένα αμινοξέα στην πλειοψηφία των αμινοξικών αλληλουχιών.

Μετά την ταυτοποίηση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, σχεδιάστηκαν κατάλληλοι εκκινητές που να υβριδίζουν με κάθε ένα από τους δυο ισότυπους της GS στην τομάτα. Στην **Εικόνα 3.27** παρουσιάζεται το ζευγάρι των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για να υβριδίσουν με την κυτοπλασματική GS (TC191691). Αντίστοιχα, στην **Εικόνα 3.28** παρουσιάζεται το ζευγάρι των εκκινητών που σχεδιάστηκαν για να υβριδίσουν με την πλαστιδιακή GS (AK319584).



Εικόνα 3.27: Σχεδιασμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ορθόδρομου εκκινητή (5'-GTGCAGGTGCTCACACA CAAAT-3') και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας οπισθόδρομου εκκινητή (5'-GAGACACAGAGAAGG CAGGC-3'). Το ζεύγος των εκκινητών σχεδιάστηκε για να υβριδίζει με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία TC191691.



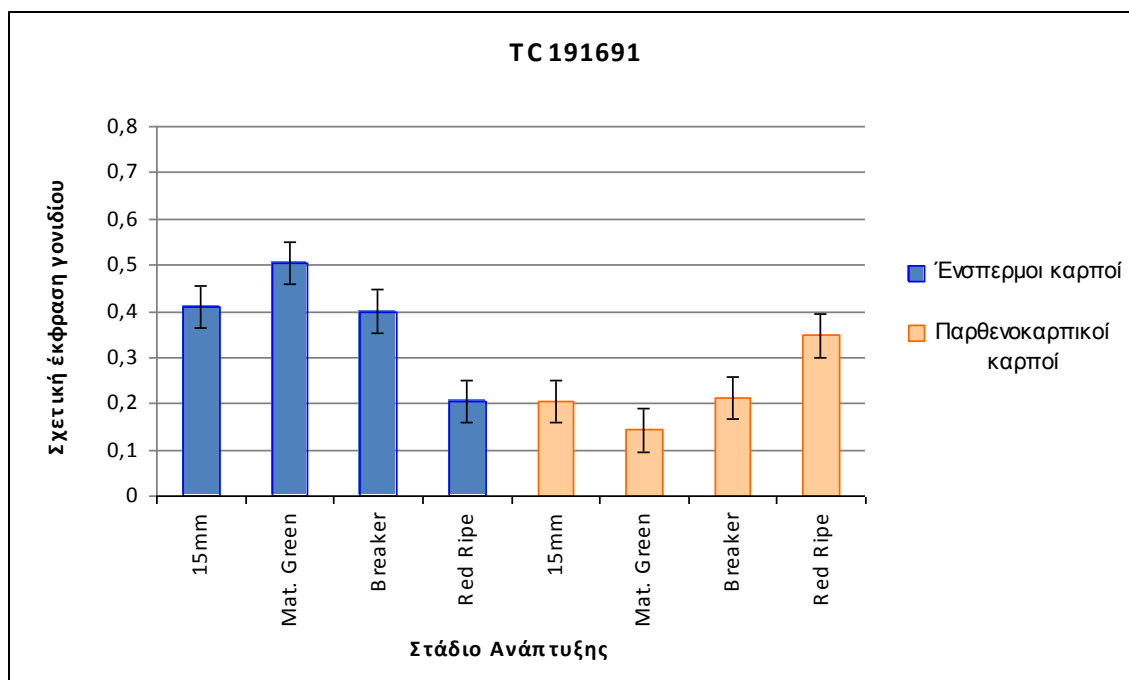
Εικόνα 3.28: Σχεδιασμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ορθόδρομου εκκινητή (5'-CTTCTGAGCTCCCAAAGTGG-3') και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας οπισθόδρομου εκκινητή (5'-ACAAACGCCATAAAGCTGCT-3'). Το ζεύγος των εκκινητών σχεδιάστηκε για να υβριδίζει με τη νουκλεοτιδική αλληλουχία AK319584.

Όπως και στο προηγούμενο κεφάλαιο, οι επιλεγμένοι εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν για την εφαρμογή RT-PCR, σε RNA που απομονώθηκαν από κάθε στάδιο ανάπτυξης. Η σχετική έκφραση των γονιδίων υπολογίστηκε, πάλι, με βάση την σταθερή έκφραση της ουβικουΐτινης (Ubiquitin).

Πραγματοποιήθηκαν δυο PCR, η πρώτη για να μελετηθεί η έκφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας TC191691 (κυτοπλασματική GS), και η δεύτερη PCR για να μελετηθεί η έκφραση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας AK319584 (πλαστιδιακή GS). Σε κάθε PCR χρησιμοποιήθηκε το αντίστοιχο ζευγάρι εκκινητών.

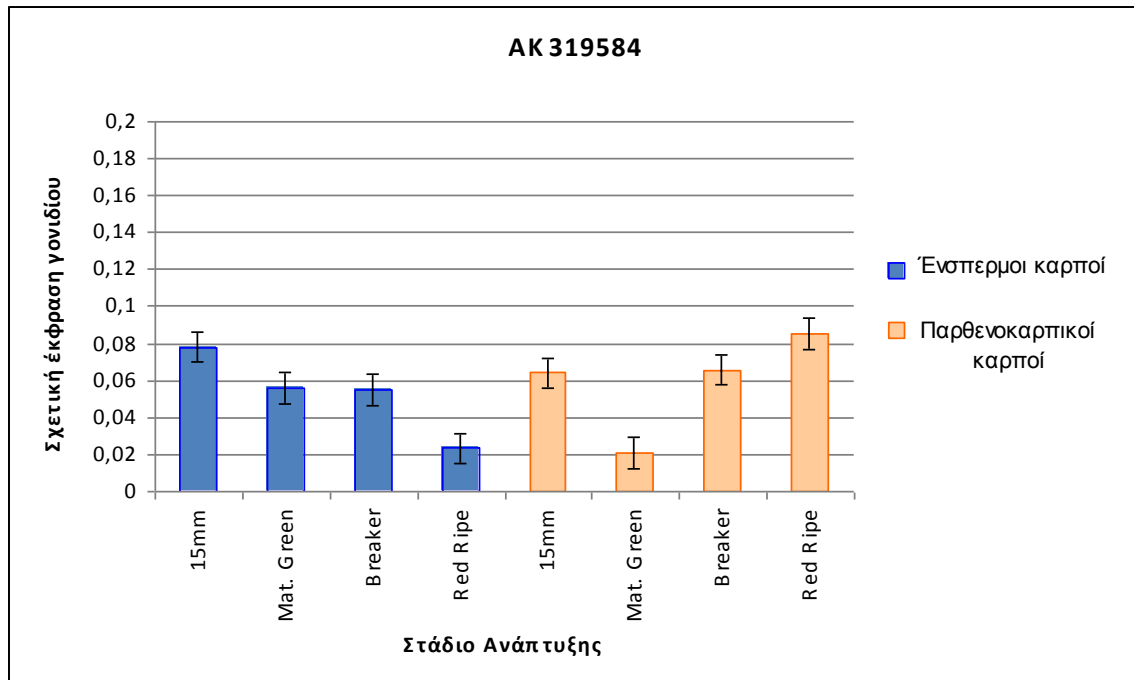
Το αποτέλεσμα της πρώτης PCR (Σχήμα 3.3) ήταν η παρατήρηση, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, μεγαλύτερης έκφρασης του γονιδίου της κυτοπλασματικής GS1

στους ένσπερμους καρπούς σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Ιδιαίτερα έντονη ήταν η διαφορά της σχετικής έκφρασης του γονιδίου στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, όπου στους ένσπερμους καρπούς παρατηρήθηκε μέγιστη τιμή, και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, ελάχιστη τιμή. Εξάιρεση στα παραπάνω, αποτελεί το στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού, όπου η έκφραση του γονιδίου είναι μεγαλύτερη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς.



Σχήμα 3.3: Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων (σχετική έκφραση) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας TC191691 (κυτοπλασματική GS1) στα στάδια του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, του πράσινου καρπού (Mature Green), αλλαγής χρώματος (Breaker) και του ώριμου κόκκινου καρπού (Red Ripe), σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.4**, στην δεύτερη PCR δεν παρατηρήθηκε αξιόλογη έκφραση του γονιδίου σε κανένα από τα στάδια ανάπτυξης. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι ο πλαστιδιακός ισότυπος GS2 εκφράζεται πολύ λίγο στους ιστούς του καρπού της τομάτας, είτε είναι παρθενοκαρπικός είτε είναι ένσπερμος. Ωστόσο, η εικόνα της αυξομείωσης της σχετικής έκφρασης σε σχέση με το στάδιο ανάπτυξης, θυμίζει αρκετά την αντίστοιχη του κυτταροπλασματικού ισότυπου GS1.



Σχήμα 3.4: Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων (σχετική έκφραση) της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας AK319584 (πλαστιδιακή GS2) στα στάδια του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, του πράσινου καρπού (Mature Green), αλλαγής χρώματος (Breaker) και του ώριμου κόκκινου καρπού (Red Ripe), σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς.

Συζήτηση

Η συνθετάση της γλουταμίνης (GS) και η αφυδρογονάση του γλουταμινικού οξέος (GDH) είναι δυο ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του αζώτου στα φυτά. Και τα δυο ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιήσουν ως υπόστρωμα το γλουταμινικό οξύ, ενώ αποτελούν τον κύριο τρόπο αφομοίωσης των αμμωνιακών στους φυτικούς ιστούς, ενσωματώνοντας την αμμωνία σε γλουταμίνη και γλουταμινικό, αντίστοιχα.

Η GS απαντάται σε δυο ισότυπους που εντοπίζονται, ο πρώτος, στο κυτταρόπλασμα (GS1), και ο δεύτερος, στα πλαστίδια και τα μιτοχόνδρια (GS2). Καταλύει την αντίδραση σύνθεσης γλουταμίνης από γλουταμινικό και αμμωνία και ο ρόλος της είναι η αφομοίωση του αμμωνίου που προέρχεται από πρωτογενή αζωτούχα πρόσληψη και από εσωτερικά μονοπάτια ανακύκλωσης του αζώτου.

Η GDH εντοπίζεται κυρίως στα μιτοχόνδρια και ο ρόλος της δεν είναι τόσο ξεκάθαρος, καθώς καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση της οξειδωσης του γλουταμινικού προς σχηματισμό 2-οξογλουταρικού οξέος και αμμωνίας. Όταν το ένζυμο λειτουργεί προς την αναβολική κατεύθυνση, το αποτέλεσμα είναι η δέσμευση αμμωνίου και η βιοσύνθεση γλουταμινικού οξέος. Στην αντίθετη κατεύθυνση, η δράση του ενζύμου εξασφαλίζει επαρκή επίπεδα ανθρακικών σκελετών για τη λειτουργία του κύκλου του τρικαρβοξυλικού οξέος.

Η συνδυασμένη δράση των δυο ενζύμων και του ενζύμου συνθάση του γλουταμινικού (GOGAT) (**Εικόνα 1.3**), σχηματίζει ένα μηχανισμό ρύθμισης της συγκέντρωσης του γλουταμινικού οξέος και αφομοίωσης του αμμωνίου (Labboun *et al.*, 2009).

Σε πολλές ποικιλίες τομάτας έχει παρατηρηθεί αύξηση της περιεκτικότητας του γλουταμινικού οξέος στο περικάρπιο του καρπού, κατά την εξέλιξη της ωρίμανσης (Sorrequieta *et al.* 2009; Bortolotti *et al.*, 2003; Nagata και Saijo, 1992). Το φαινόμενο είναι ιδιαίτερα έντονο σε ποικιλίες τομάτας cherry (Boggio *et al.*, 2000). Το γλουταμινικό οξύ είναι από τις ενώσεις που συμβάλλουν σε μεγάλο βαθμό στην γεύση της τομάτας (Fuke and Konosu, 1991).

Είναι γνωστό, επίσης, ότι οι περιορισμένες ποσότητες σε διαθέσιμο άζωτο στα φυσικά περιβάλλοντα είναι βασικός ανασταλτικός παράγοντας για την ανάπτυξη και

την παραγωγή των φυτών. Συνεπώς, η ενσωμάτωση του ανόργανου αζώτου στα αμινοξέα είναι σημαντική για την γεωργία.

Για τους παραπάνω λόγους, θεωρήθηκε σκόπιμη η μελέτη των GS και GDH, δυο ενζύμων κλειδιά στα κύρια μονοπάτια αφομοίωσης και ανακύκλωσης του αζώτου, στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού τομάτας cherry.

Εξετάστηκε, επιπλέον, η συμπεριφορά των ενζύμων και σε παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας cherry, καθώς η εφαρμογή της παρθενοκαρπίας στην καλλιέργεια της τομάτας, επιτρέπει την επιτυχή καρποφορία σε δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, σε νέες κλιματικές ζώνες και σε μεγαλύτερο χρονικό εύρος.

4.1 GS και GDH στους ένσπερμους καρπούς.

Η παρουσία της συνθετάσης της γλουταμίνης σε ανώριμους καρπούς διαμέτρου 0,5cm και 1,5cm ήταν ιδιαίτερα έντονη στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στις σπερματικές βλάστες. Αρκετά έντονα εμφανίστηκε το σήμα στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος ενώ ήταν ασθενέστερο στα κύτταρα του πλακούντα και του περικαρπίου (**Εικόνες 3.1, 3.2, 3.3, 3.4**).

Παρόμοια εικόνα έδειξε και ο εντοπισμός της GS στα στάδια του ώριμου καρπού πράσινου χρώματος, ώριμου καρπού στην αλλαγή χρώματος, και ώριμου καρπού κόκκινου χρώματος (**Εικόνες 3.5 - 3.11**). Το ένζυμο εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στους ιστούς των αναπτυσσόμενων σπερμάτων (υαλώδες παρέγχυμα, κοτυληδόνας, εμβρυακό ριζίδιο και ενδοσπέρμιο), αρκετά στο ζελατινώδες παρέγχυμα και λιγότερο σε περικάρπιο και πλακούντα.

Η παρουσία του ενζύμου στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες ήταν αναμενόμενη, καθώς το γλουταμινικό οξύ (υπόστρωμα του ενζύμου) και η γλουταμίνη (προϊόν της καταλυόμενης αντίδρασης) είναι τα πιο άφθονα ελεύθερα αμινοξέα στο χυμό του ηθμού της τομάτας (Valle *et al.*, 1998). Σε πολλές εργασίες, η κυτταροπλασματική GS1 έχει εντοπιστεί στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες διαφόρων φυτικών ειδών (Sakurai *et al.*, 1996; Kichey *et al.*, 2005; Martin *et al.*, 2006). Η συσχέτιση της κυτταροπλασματικής GS με την επανακινητοποίηση του αζώτου κατά το γέμισμα των σπερμάτων διαφόρων φυτών (Yamaya *et al.*, 2002; Habash *et al.*, 2007) και τη σποροπαραγωγή (Hirel *et al.*, 2001; Gallais & Hirel, 2004), φαίνεται να συμφωνεί, επίσης, με τον ζωηρό εντοπισμό του ενζύμου στους ιστούς των σπερμάτων.

Η αφυδρογονάση του γλουταμινικού εντοπίστηκε, και αυτή, κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στις σπερματικές βλάστες και, αργότερα, στα σπέρματα των καρπών, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης (**Εικόνες 3.1 - 3.11**). Η παρουσία του ενζύμου ανιχνεύθηκε, επίσης, στο ζελατινώδες παρέγχυμα και λιγότερο σε περικάρπιο και πλακούντα.

Οι θέσεις εντοπισμού της πρωτεΐνης GDH συμπίπτουν και με τις θέσεις δραστηριότητας του ενζύμου (**Εικόνες 3.12 - 3.18**) σε όλα τα στάδια ανάπτυξης των καρπών. Πιο συγκεκριμένα η δραστηριότητα του ενζύμου εμφανίζεται πολύ υψηλή σε ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, σπερματικές βλάστες/σπέρματα, και ζελατινώδες παρέγχυμα, και χαμηλότερη σε περικάρπιο και πλακούντα. Οι Loulakakis *et al.* (1994) αναφέρουν, ομοίως, ότι οι μεταβολές της συγκέντρωσης της GDH συμφωνούν με τη δραστηριότητα και τα επίπεδα μεταγραφημάτων mRNA του ενζύμου κατά την ωρίμανση καρπών αβοκάντο.

Η έντονη παρουσία και δραστηριότητα, λοιπόν, του ενζύμου στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες συμφωνεί με εργασίες που αναφέρουν υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου NAD(H)-GDH τόσο στα μιτοχόνδρια όσο και στο κυτόπλασμα των συνοδών κυττάρων του ηθμού (Terce-Laforgue *et al.*, 2004; Kichey *et al.*, 2005). Παράλληλα, ο εντοπισμός του ενζύμου στα αναπτυσσόμενα σπέρματα φαίνεται ότι συνδέεται με τα αυξημένα επίπεδα γλουταμινικού (Tsatsaronis and Boskou, 1975), και πιθανόν γλουταμίνης καθώς η ανάπτυξη του σπέρματος δημιουργεί μια καταβόθρα μεγάλης ισχύος για τις αζωτούχες ενώσεις και την βιοσύνθεση των αμινοξέων. Σε αυτό το πλαίσιο, η δράση της GDH θα μπορούσε να είναι προς οποιαδήποτε από τις δυο κατευθύνσεις της αμφίδρομης αντίδρασης που καταλύει. Άλλωστε, όπως αναφέρουν οι Lancien *et al.* (2000), υψηλές συγκεντρώσεις γλουταμίνης ευνοούν τη βιοσυνθετική κατεύθυνση της αμίνωσης, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις γλουταμινικού οξέος ευνοούν την καταβολική αντίδραση της απαμίνωσης.

Η μελέτη της έκφρασης δύο νουκλεοτιδικών αλυσίδων που κωδικοποιούν τη GS (**Σχήμα 3.3 - 3.4**), έδειξε ότι μόνο ο κυτταροπλασματικός ισότυπος εκφράστηκε σε μεγάλο βαθμό στους καρπούς της τομάτας. Η σχετική έκφραση του ενζύμου ήταν μεγαλύτερη στα τρία αρχικά στάδια ανάπτυξης ενώ παρουσίασε ελάχιστη τιμή στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού (**Σχήμα 3.3**).

Η εικόνα αυτή συμφωνεί με εργασίες που αναφέρουν την δραστηριότητα της GS στο περικάρπιο τομάτας, μέγιστη στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού και ελάχιστη στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού (Scarpeci *et al.*, 2007; Boggio *et*

al., 2000). Οι μεταβολές στην έκφραση του ενζύμου μπορούν να συσχετιστούν, επίσης, και με την αύξηση της περιεκτικότητας του γλουταμινικού στο περικάρπιο της τομάτας καθώς προχωρά η ωρίμανση του καρπού (Boggio *et al.*, 2000; Sorrequieta *et al.*, 2009). Πράγματι, η υψηλή έκφραση της GS στα πρώτα στάδια της ωρίμανσης μπορεί να συνδεθεί με τα υψηλά επίπεδα της γλουταμίνης που παρατηρούνται σε ώριμους πράσινους καρπούς και ώριμους καρπούς στην αλλαγή χρώματος, ενώ αντίθετα, η αποφυγή της ανάλωσης του γλουταμινικού ως υπόστρωμα της GS μπορεί να δικαιολογήσει, εν μέρει, την αύξηση του γλουταμινικού οξέος στο περικάρπιο των ώριμων κόκκινων καρπών. Οι μεταβολές της έκφρασης του ενζύμου στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού, πιθανόν να συνδέονται και με την αύξηση του εμβρύου στα σπέρματα και τις υψηλές ανάγκες για εφοδιασμό με άζωτο για τη βιοσύνθεση των αμινοξέων. Ίσως για τον λόγο αυτό, η έκφραση της GS1 είναι χαμηλότερη κατά το στάδιο του ώριμου καρπού όπου έχει ολοκληρωθεί κατά μεγάλο μέρος η ανάπτυξη του σπέρματος.

Και στην περίπτωση της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού, εξετάστηκε η έκφραση δύο νουκλεοτιδικών αλυσίδων που κωδικοποιούν το ένζυμο (**Σχήμα 3.1 - 3.2**). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το γονίδιο *GDH* που αντιστοιχεί στη νουκλεοτιδική αλυσίδα AK325267 εκφράζεται ελάχιστα στους ιστούς του καρπού της τομάτας cherry (**Σχήμα 3.2**). Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με δεδομένα έκφρασης του γονιδίου από τη βάση δεδομένων DFCI (Plant Gene Indices), όπου αναφέρεται ότι η έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου εντοπίζεται κυρίως στη ρίζα, και ότι είναι ελάχιστη στον καρπό. Όσον αφορά στο γονίδιο *GDH* που αντιστοιχεί στην αλληλουχία AAB39508, η έκφρασή του ήταν κατά μία τουλάχιστον τάξη μεγέθους μεγαλύτερη στον καρπό συγκρινόμενη με την AK325267. Η σχετική έκφραση του ενζύμου (**Σχήμα 3.1**) παρουσίασε μέγιστη τιμή στην έναρξη της ωρίμανσης (στάδιο ώριμου πράσινου καρπού) και ελάχιστη τιμή στο τέλος της ωρίμανσης (στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού).

Οι παρατηρούμενες διακυμάνσεις της σχετικής έκφρασης του ενζύμου στον καρπό, δεν συμβαδίζουν με αναφορές που αναφέρουν ότι η δραστηριότητα της *GDH* είναι ιδιαίτερα αυξημένη στο περικάρπιο ώριμων κόκκινων καρπών σε σχέση με το στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού (Boggio *et al.*, 2000; Pratta *et al.*, 2004; Scarpeci *et al.*, 2007). Το γεγονός αυτό δεν πρέπει να μας εκπλήσει δεδομένου ότι συνήθως το πλήθος των μεταγραφημάτων ενός ενζύμου δεν συνδέεται κατά κανόνα με τη δραστηριότητά του. Αντίθετα, οι μεταβολές της έκφρασης της ισότυπου αυτού

της GDH φαίνεται να ακολουθούν, με παρόμοιο τρόπο, τις μεταβολές της έκφρασης της κυτταροπλασματικής GS (**Σχήμα 3.3**). Πιθανόν, η εικόνα αυτή να οφείλεται στην αλληλεπίδραση του ενζύμου με τη δράση του κύκλου GS/GOGAT (**Εικόνα 1.3**), και στη διαδικασία ρύθμισης της συγκέντρωσης του γλουταμινικού (Labboun *et al.*, 2009).

4.2 GS και GDH στους παρθενοκαρπικούς καρπούς.

Η παρουσία της συνθετάσης της γλουταμίνης και της αφυδρογονάσης του γλουταμινικού σε παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας cherry, είχε παρόμοια εικόνα με τον εντοπισμό τους στους ένσπερμους καρπούς. Πράγματι, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης τα δυο ένζυμα έδωσαν έντονο σήμα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στις σπερματικές βλάστες, αρκετά έντονο σήμα στο ζελατινώδες παρέγχυμα, και ασθενέστερο σήμα σε περικάρπιο και πλακούντα (**Εικόνες 3.1 - 3.11**).

Ο εντοπισμός της δραστηριότητας της GDH (**Εικόνες 3.12 - 3.18**) στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, ήταν επίσης όμοιος με αυτόν των ένσπερμων καρπών. Η δραστηριότητα του ενζύμου εμφανίζεται πολύ υψηλή σε ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, σπερματικές βλάστες/σπέρματα, και ζελατινώδες παρέγχυμα, και χαμηλότερη σε περικάρπιο και πλακούντα.

Αναφορές σχετικές με την παρουσία και δράση των δυο ενζύμων σε παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας, δεν εντοπίστηκαν στην διεθνή βιβλιογραφία. Ωστόσο, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν την διαρκή δράση των ενζύμων στον εφοδιασμό των αναπτυσσόμενων καρπών με άζωτο είτε αυτοί είναι ένσπερμοι είτε παρθενοκαρπικοί.

Όπως και στην περίπτωση των ένσπερμων καρπών, τα γονίδια που αντιστοιχούν στην πλαστιδιακή GS και στην νουκλεοτιδική αλληλουχία GDH της ρίζας (AK325267), δεν έδειξαν αξιόλογη συσσώρευση μεταγραφημάτων στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας cherry (**Σχήμα 3.2, 3.4**). Αντίθετα, η έκφραση του γονιδίου της κυτοπλασματικής GS και του γονιδίου GDH που αντιστοιχεί στην αλληλουχία AAB39508, ήταν σημαντική και εμφάνισε μεταβολές με παρόμοια τάση ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του παρθενοκαρπικού καρπού, αλλά όχι στατιστικά σημαντικές (**Σχήμα 3.1, 3.3**). Το αξιοσημείωτο είναι ότι οι μεταβολές αυτές ήταν αντίστροφες σε σχέση με τις μεταβολές της έκφρασης των αντίστοιχων γονιδίων στους ένσπερμους καρπούς. Έτσι, στα πρώτα στάδια

ωρίμανσης του καρπού, η σχετική έκφραση των δυο γονιδίων ήταν μεγαλύτερη στους ένσπερμους καρπούς, ενώ στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού η έκφραση ήταν μεγαλύτερη (αλλά στην περίπτωση της GDH όχι στατιστικά σημαντική) στους παρθενοκαρπικούς (Σχήμα 3.1, 3.3).

Φαίνεται ότι η απουσία σπέρματος, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, συνδέεται με μικρότερες ανάγκες για μετατροπή γλουταμινικού σε γλουταμίνη ή 2-οξογλουταρικό, σε όλα τα στάδια ανάπτυξης μέχρι και το στάδιο αλλαγής χρώματος. Η συνεχής είσοδος αζώτου (με την μορφή γλουταμίνης και γλουταμινικού) στον καρπό μέσω του ηθμού και η αδυναμία αποθήκευσής του στα σπέρματα, ίσως να οδηγούν σε αυξημένο αριθμό μεταγραφημάτων και των δυο ενζύμων στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού, ώστε να επιτευχθεί ρύθμιση των συγκεντρώσεων του γλουταμινικού και της αμμωνίας στον καρπό.

Τα συμπεράσματα που εξάγονται είναι ότι, αφενός σε όλες τις εξεταζόμενες περιπτώσεις στον καρπό τομάτας, τα δυο γονίδια ακολουθούν περίπου το ίδιο πρότυπο έκφρασης και ότι οι διαφορές της σχετικής έκφρασης και των δύο ενζύμων που παρουσιάζονται κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας, θα μπορούσαν να αποδοθούν στην ανάπτυξη του εμβρύου.

Συμπεράσματα

1. Ο ανοσοεντοπισμός της GDH και GS έδειξε ότι και τα δύο ένζυμα εντοπίζονται με όμοιο τρόπο στους διάφορους ιστούς του καρπού κατά την ανάπτυξή του.
2. Δεν εντοπίστηκαν διαφορές στον ανοσοεντοπισμό των ενζύμων μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών.
3. Το πρότυπο της *in situ* δραστηριότητας της GDH συμπίπτει με το πρότυπο του ανοσοεντοπισμού του ενζύμου.
4. Από τις δύο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της GDH (AAB39508 και AK325267) στον καρπό εκφράζεται κυρίως η AAB39508.
5. Από τις δύο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες της GS (TC191691 και AK319584) στον καρπό εκφράζεται κυρίως η TC191691 που αντιστοιχεί στον κυτοπλασματικό ισότυπο του ενζύμου.
6. Η σχετική έκφραση τόσο της κυτοπλασματικής GS όσο και της GDH (AAB39508) ακολουθεί τις ίδιες τάσεις κατά την εξέλιξη της ανάπτυξης και ωρίμανσης του καρπού τομάτας cherry.
7. Οι σχετικές εκφράσεις της κυτοπλασματικής GS και της GDH (AAB39508) μεταβάλλονται με διαφορετικό τρόπο σε παρθενοκαρπικούς καρπούς σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς στα αντίστοιχα στάδια ανάπτυξης.

Βιβλιογραφία

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.

Alekhina ND, Sokolva SA (1979). Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**

Alekhina ND, Klyskova AI, Gerasimova SI (1984). Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**

Almassy RJ, Janson CA, Hamlin R, Xuong NH, Eisenberg D (1986). Novel subunit-subunit interactions in the structure of glutamine synthetase. *Nature*, **323**, 304-309.

Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **25**, 3389-3402.

Asahira T, Hosoki T, Shinya K (1982). Regulation of low temperature-induced malformation of tomato fruit by plant growth regulators. *J Jpn Soc Hort Sci*, **50**, 468-474.

Athwal GS, Pearson J, Laurie S (1997). Regulation of glutamate dehydrogenase activity by manipulation of nucleotide supply in *Daucus carota* suspension cultures. *Physiol Plantarum*, **101**, 503-509.

Aubert S, Bligny R, Douce R, Ratcliffe RG, Roberts JKM (2001). Contribution of glutamate dehydrogenase to mitochondrial metabolism studied by ¹³C and ³¹P nuclear magnetic resonance. *J Exp Bot*, **52**, 37-45.

Bai Y, Lindhout P (2007). Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future? *Ann Bot-London*, **100**, 1085-1094.

Bartley GE, Scolnik PA, Giuliano G (1994). Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. *Annu Rev Plant Phys*, **45**, 287-301.

Bathgate B, Purton ME, Grierson D, Goodenough PW (1985). Plastid changes during the conversion of chloroplasts to chromoplasts in ripening tomatoes. *Planta*, **165**, 197-204.

Bauer D, Biehler K, Fock H, Carrayol E, Hirel B, Migge A, Becker TW (1997). A role for cytosolic glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during water stress in tomato. *Physiol Plantarum*, **99**, 241-248.

Bearden JC (1978). Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochim Biophys Acta*, **533**, 525-529.

Becker TW, Perrot-Rechenman C, Suzuki A, Hirel B (1993). Subcellular and immunocytochemical localization of the enzymes involved in ammonia assimilation in mesophyll and bundle-sheath cells of maize leaves. *Planta*, **191**, 129-136.

Beckmann K, Dzuibany C, Biehler K, Fock H, Hell R, Migge A, Becker TW (1997). Photosynthesis and fluorescence quenching, and the mRNA levels of plastidic glutamine synthetase or of mitochondrial serine hydroxymethyltransferase (SHTM) in the leaves of the wild-type and of the SHTM-deficient *stm* mutant of *Arabidopsis thaliana* in relation to the rate of photorespiration. *Planta*, **202**, 379-386.

Bennett MJ, Lightfoot DA, Cullimore JV (1989). cDNA sequence and differential expression of the gene encoding the glutamine synthetase γ polypeptide of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Mol Biol*, **12**, 553-565.

Bernard SM, Moller ALB, Dionisio G, Kichey T, Jahn TP, Dubois F, Baudo M, Lopes MS, Terce-Laforgue T, Foyer CH, et al (2008). Gene expression, cellular localisation and function of glutamine synthetase isozymes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Mol Biol*, **67**, 89-105.

Bernard SM, Habash DZ (2009). The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *New Phytol*, **182**, 608-620.

Bertin N, Guichard S, Leonardi C, Longuenesse JJ, Langlois D, Navez B (2000). Seasonal evolution of the quality of fresh glasshouse tomatoes under Mediterranean conditions, as affected by air vapour pressure deficit and plant fruit load. *Ann Bot-London*, **85**, 741-750.

Boggio SB, Palatnik JF, Heldt HW, Valle EM (2000). Changes in amino acid composition and nitrogen metabolizing enzymes in ripening fruits of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Sci*, **159**, 125-133.

Bone DH (1959). Glutamate dehydrogenase of mung bean mitochondria. *Nature*, **184**, 184.

Bortolotti S, Boggio SB, Delgado L, Orellano EG, Valle EM (2003). Different induction patterns of glutamate metabolizing enzymes in ripening fruits of the tomato mutant *green flesh*. *Physiol Plantarum*, **119**, 384-391.

Brady CJ (1987). Fruit ripening. *Ann Rev Plant Physio*, **38**, 155-178.

Brechlin P, Mack G, Burba M, Tischner R (1999). Changes in the isoform pattern and subunit composition of cytosolic glutamine synthetase (GS1) in sugarbeet leaves dependent on leaf age. *J Plant Physiol*, **155**, 497-502.

Brechlin P, Unterhalt A, Tischner R, Mack G (2000). Cytosolic and chloroplastic glutamine synthetase of sugarbeet (*Beta vulgaris*) respond differently to organ ontogeny and nitrogen source. *Physiol Plantarum*, **108**, 263-269.

Britton KL, Baker PJ, Rice DW, Stillman TJ (1992). Structural relationship between the hexameric and tetrameric family of glutamate dehydrogenases. *Eur J Biochem*, **209**, 851-859.

Brown AHD, Nero E, Zon YD, Dagan O (1978). Genetic variation in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Genetica*, **49**, 97-108.

Brugiere N, Dubois F, Limami AM, Lelandais M, Roux Y, Sangwan RS, Hirel B (1999). Glutamine synthetase in the phloem plays a major role in controlling praline production. *Plant Cell*, **11**, 1995-2012.

Brugiere N, Dubois F, Masclaux C, Sangwan RS, Hirel B (2000). Immunolocalization of glutamine synthetase in senescing tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) leaves suggests that ammonia assimilation is progressively shifted to the mesophyll cytosol. *Planta*, **211**, 519-527.

Bunger-Kibler S, Bangerth F (1983). 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.

Cammaerts D, Jacobs M (1985). A study of the role of glutamate dehydrogenase in the nitrogen metabolism of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, **163**, 517-526.

Canovas FM, Avila C, Botella JR, Valpuesta V, Nunez de Castro I (1986). Effect of light-dark transition on glutamine synthetase activity in tomato leaves. *Physiol Plantarum*, **66**, 648-652.

Carrari F, Baxter C, Usadel B, Urbanczyk-Wochniak E, Zanon MI, Nunes-Nesi A, Nikiforova V, Centero D, Ratzka A, Pauly M, Sweetlove LJ, Fernie AR (2006). Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiol*, **142**, 1380-1396.

Carvalho H, Pereira S, Sunkel C, Salema R (1992). Detection of a cytosolic glutamine synthetase in leaves of *Nicotiana tabacum* L. by immunochemical methods. *Plant Physiol*, **100**, 1591-1594.

Carvalho H, Lima L, Lescure N, Camut S, Salema R, Cullimore J (2000). Differential expression of the two cytosolic glutamine synthetase genes in various organs of *Medicago truncatula*. *Plant Sci*, **159**, 301-312.

Chou KH, Splittstoesser WE (1972). Glutamate dehydrogenase from pumpkin cotyledons. *Plant Physiol*, **49**, 550-554.

Cock JM, Brock IW, Watson AT, Swarup R, Morby A, Cullimore JV (1991). Regulation of glutamine synthetase genes in leaves of *Phaseolus vulgaris*. *Plant Mol Biol*, **17**, 761-771.

Cong B, Liu J, Tanksley SD (2002). Natural alleles at a tomato fruit size quantitative trait locus differ by heterochronic regulatory mutations. *P Natl Acad Sci USA*, **99**, 13606-13611.

Cooke JEK, Weih M (2005). Nitrogen storage and seasonal nitrogen cycling in *Populus*: bridging molecular physiology and ecophysiology. *New Phytol*, **167**, 19-30.

Cren M, Hirel B (1999). Glutamine synthetase in higher plants: Regulation of gene and protein expression from the organ to the cell. *Plant Cell Physiol*, **40**, 1187-1193.

Cullimore JV, Gebhardt C, Saarelainen R, Mifflin BJ, Idler KB, Barker RF (1984). Glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: organ-specific expression of a multigene family. *J Mol Appl Genet*, **2**, 589-599.

D'Aoust MA, Yelle S, Nguyen-Quoc B (1999). Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell*, **11**, 2407-2418.

de Jong M, Mariani C, Vriezen WH (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J Exp Bot*, **60**, 1523-1532.

Denny OJ (1992). Xenia includes metaxenia. *HortScience*, **27**, 722-728.

Dubois F, Brugiere N, Sangwan RS, Hirel B (1996). Localization of tobacco cytosolic glutamine synthetase enzymes and the corresponding transcripts shows organ- and cell-specific patterns of protein synthesis and gene expression. *Plant Mol Biol*, **31**, 803-817.

Dubois F, Terce-Laforgue T, Gonzalez-Moro M-B, Estavillo J-M, Sangwan R, Gallais A, Hirel B (2003). Glutamate dehydrogenase in plants: is there a new story for an old enzyme? *Plant Physiol Bioch*, **41**, 565-576.

Duke SH, Schrader LE, Henston CA, Vogelzang RD, Rendleton JW (1979). Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**

Edwards JW, Walters EL, Coruzzi GM (1990). Cell-specific expression in transgenic plants reveals non-overlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthetase. *P Natl Acad Sci USA*, **87**, 3459-3463.

Falavigna A, Badino M, Soressi GP (1978). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P (2005).**

Fawole MO (1977). Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**

Ferrario-Mery S, Hodges M, Hirel B, Foyer CH (2002). Photorespiration-dependent increases in phosphoenolpyruvate carboxylase, isocitrate dehydrogenase and glutamate dehydrogenase in transformed tobacco plants deficient in ferredoxin-dependent glutamine- α -ketoglutarate aminotransferase. *Planta*, **214**, 877-886.

- Finnemann J, Schjoerring JK (1999).** Translocation of NH_4^+ in oilseed rape plants in relation to glutamine synthetase isogene expression and activity. *Physiol Plantarum*, **105**, 469-477.
- Finnemann J, Schjoerring JK (2000).** Post-Translational regulation of cytosolic glutamine synthetase by reversible phosphorylation and 14-3-3 protein interaction. *Plant J*, **24**, 171-181.
- Fisher HF (1985).** L-Glutamate dehydrogenase from bovine liver. *Method Enzymol*, **113**, 16-27.
- Fontaine J-X, Saladino F, Agrimonti C, Bedu M, Terce-Laforgue T, Tetu T et al. (2006).** Control of the synthesis and subcellular targeting of the two GDH genes products in leaves and stems of *Nicotiana plumbaginifolia* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*, **47**, 410-418.
- Forde BG, Cullimore JV (1989).** The molecular biology of glutamine synthetase in higher plants. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, **6**, 247-296.
- 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.
- Fox GG, Ratcliffe RG, Robinson SA, Stewart GR (1995).** Evidence for deamination by glutamate dehydrogenase in higher plants: commentary. *Can J Bot*, **73**, 1112-1115.
- Francis D, Halford NG (2006).** Nutrient sensing in plants. *Plant Mol Biol*, **60**: 981-993.
- Frary A, Nesbitt TC, Grandillo S, van der Knaap E, Cong B, Liu JP, Meller J, Elber R, Alpert KB, Tanksley SD (2000).** fw2.2: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, **289**, 85-88.
- Frechilla S, Lasa B, Aleu M, Juanarena N, Lamsfus C, Aparicio-Tejo PM (2002).** Short-term ammonium supply stimulates glutamate dehydrogenase activity and alternative pathway respiration in roots of pea plants. *J Plant Physiol*, **159**, 811-818.
- Freeman J, Marquez A, Wallsgrove RM, Saarelainen R, Forde BG (1990).** Molecular analysis of barley mutants deficient in chloroplast glutamine synthetase. *Plant Mol Biol*, **14**, 297-311.
- Fuke S, Konosu S (1991).** Taste-active components in some foods: a review of Japanese research. *Physiol Behav*, **49**, 863-868.
- Gallais A, Hirel B (2004).** An approach to the genetics of nitrogen use efficiency in maize. *J Exp Bot*, **55**, 295-306.
- George WL, Scott JW, Splittstoesser WE (1984).** Parthenocarpy in tomato. *Hortic Rev*, **6**, 65-84.

Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W (1993). Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell*, **5**: 1439-1451.

Givan CV (1979). Metabolic detoxification of ammonia in tissues of higher plants. *Phytochemistry*, **18**, 375-382.

Glevarec G, Bouton S, Jaspard E, Riou MT, Cliquetg JB, Suzuki A (2004). Respective roles of the glutamine synthetase/glutamate synthase cycle and glutamate dehydrogenase in ammonium and amino acid metabolism during germination and post-germinative growth in the model legume *Medicago truncatula*. *Planta*, **219**, 286-297.

Gomez-Maldonado J, Avila C, de la Torre F, Canas R, Canovas FM, Campbell MM (2004). Functional interactions between a glutamine synthetase promoter and MYB proteins. *Plant J*, **39**, 513-526.

Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P (2005). Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biol*, **7**, 131-139.

Groot SPC, Bruinsma J, Karssen 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. *P Natl Acad Sci USA*, **22**, 628-636.

Gustafson FG (1937). Parthenocarpy induced by pollen extracts. *A J Bot*, **24**, 102-107.

Gustafson FG (1939). The cause of natural parthenocarpy. *A J Bot*, **26**, 135-138.

Habash DZ, Bernard S, Schondelmaier J, Weyen J, Quarrie SA (2007). The genetics of nitrogen use in hexaploid wheat: N utilisation, development and yield. *Theor Appl Genet*, **114**, 403-419.

Hirel B, Bertin P, Quillere I, Bourdoncle W, Attagnant C, Dellay C, Gouy A, Cadiou S, Retalliau C, Falque M, Gallais A (2001). Towards a better understanding of the genetic and physiological basis for nitrogen use efficiency in maize. *Plant Physiol*, **125**, 1258-1270.

Hirel B, Martin A, Terce-Laforgue T, Gonzalez-Moro MB, Estavillo JM (2005). Physiology of maize I: a comprehensive and integrated view of nitrogen metabolism in a C₄ plant. *Physiol Plantarum*, **124**, 167-177.

Hirel B, Weatherley C, Cretin C, Bergounioux C, Gadal P (1984). Multiple subunit composition of chloroplastic glutamine synthetase of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiol*, **74**, 448-450.

- Hirel B, Miao GH, Verma DPS (1993).** Metabolic and developmental control of glutamine synthetase genes in legume and non-legume plants. *In Plant Gene Expression*, D.P.S. Verma, ed (Boca Raton, FLQCRC Press Inc), 443-458
- 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 (1996).** Tomato. *In E Zomstein, AA Schaffer, eds, Photoassimilate Distribution in Plants.* Marcel Dekker, New York, pp 709-728.
- Hobson G (1988).** Cherry tomatoes. *The Garden.* pp. 55-60
- Holloway PJ (1994).** Plant cuticles: physicochemical characteristics and biosynthesis. *In Percy KE, Cape JN, Jagels R, Simpson CJ, eds, Air pollution and the leaf cuticle.* New York, Springer, pp 1-13.
- Hopfner M, Reifferscheid G, Wild A (1988).** Molecular composition of glutamine synthetase of *Sinapsis alba* L. *Z Naturforsch*, **43c**, 194-198.
- Ireland RJ, Lea PJ (1999).** The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. *In: Singh (Ed.), Plant Amino Acids Biochemistry and Biotechnology*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, pp. 49-109.
- Ishiyama K, Inoue E, Tabuchi M, Yamaya T, Takahashi H (2004a).** Biochemical background and compartmentalized functions of cytosolic glutamine synthetase for active ammonium assimilation in rice roots. *Plant Cell Physiol*, **45**, 1640-1647.
- Ishiyama K, Inoue E, Watanabe-Takahashi A, Obara M, Yamaya T, Takahashi H (2004b).** Nitrogen-dependent regulation of cytosolic glutamine synthetase in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol*, **45**, S98-S98.
- Itagaki T, Dry IB, Wiskich JT (1988).** Purification and properties of NAD-glutamate dehydrogenase from turnip mitochondria. *Phytochemistry*, **27**, 3373-3378.
- Iwahori S (1967).** Auxin of tomato fruit at different stages of its development with a special reference to high temperature injuries. *Plant Cell Physiol*, **8**, 15-22.
- Janes BE (1941).** Some chemical differences between artificially produced parthenocarpic fruits and normal seeded fruits of tomato. *Am J Bot*, **28**, 639-646.
- Jaspard E (2006).** A computational analysis of the three isoforms of glutamate dehydrogenase reveals structural features of the isoform EC 1.4.1.4 supporting a key role in ammonium assimilation in plants. *Biol Direct*, **1**, 38.
- Joubes J, Phan T-H, Just D, Rothan C, Bergounioux C, Raymond P, Chevalier C (1999).** Molecular and biochemical characterization of the involvement of cyclin-dependent kinase A during the early development of tomato fruit. *Plant Physiol*, **121**: 857-869.

- Joy KW (1969).** Nitrogen metabolism of *Lemna minor*. II. Enzymes of nitrate assimilation and some aspects of their regulation. *Plant Physiol*, **44**, 849-853.
- Joy KW (1973).** Control of glutamate dehydrogenase from *Pisum sativum* roots. *Phytochemistry*, **12**, 1031-1040.
- Kahlau S, Bock R (2008).** Plastid transcriptomics and translomics of tomato fruit development and chloroplast-to-chromoplast differentiation: chromoplast gene expression largely serves the production of a single protein. *Plant Cell*, **20**, 856-874.
- Kamachi K, Yamaya T, Mae T, Kunihiko O (1991).** A role for glutamine synthetase in the remobilization of leaf nitrogen during natural senescence in rice leaves. *Plant Physiol*, **96**, 411-417
- Kamachi K, Yamaya T, Hayakawa T, Mae T, Ojima K (1992).** Vascular bundle-specific localization of cytosolic glutamine synthetase in rice leaves. *Plant Physiol*, **99**, 1481-1486.
- Kar M, Feierabend J (1984a).** Metabolism of activated oxygen in detached wheat and rye leaves and its relevance to the initiation of senescence. *Planta*, **160**, 385-391.
- Kar M, Feierabend J (1984b).** Changes in the activities of enzymes involved in amino acid metabolism during the senescence of detached wheat leaves. *Physiol Plantarum*, **62**, 39-44.
- 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.
- 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.
- Keys AJ, Bird IF, Cornelius MJ, Lea PJ, Wallsgrave RM, Mifflin BJ (1978).** Photorespiratory nitrogen cycle. *Nature*, **275**, 741-742.
- Kichey T, Le Gouis J, Sangwan B, Hirel B, Dubois F (2005).** Changes in the cellular and subcellular localization of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase during flag leaf senescence in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Physiol*, **46**, 964-974.
- Kisaka H, Kida T (2003).** Transgenic tomato plant carrying a gene for NADP-dependent glutamate dehydrogenase (*gdgA*) from *Aspergillus nidulans*. *Plant Science*, **164**, 35-42.
- Kisaka H, Kida T, Miwa T (2007).** Transgenic tomato plants that overexpress a gene for NADH-glutamate dehydrogenase (*legdh1*). *Breeding Sci*, **57**, 101-106.
- Kolattukudy PE (1980).** Biopolyester membranes of plants: cutin and suberin. *Science*, **208**, 990-1000.

- Koshioka M, Nishijima T, Yamazaki H, Liu Y, Nonaka M, Mander LN (1994).** Analysis of gibberellins in growing fruits of *Lycopersicon esculentum* after pollination or treatment with 4-chlorophenoxyacetic acid. *J Hort Sci*, **69**, 171-179.
- Kortstee AJ, Appeldoorn NJG, Oortwijn MEP, Visser RGF (2007).** Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. *Planta*, **226**, 929-939.
- Kozaki A, Sakamoto A, Takeba G (1992).** The promoter of the gene for plastidic glutamine synthetase (GS2) from rice is developmentally regulated and exhibits substrate-induced expression in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiol*, **33**, 233-238.
- Kraweski WW, Jones TA, Mowbray SL (2005).** Structure of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase in complex with a transition-state mimic provides functional insights. *P Natl Acad Sci USA*, **102**, 10499-10504.
- Kumada Y, Benson DR, Hillemann D, Hosted TJ, Rochefort DA, Thompson CJ, Wohlleben W, Tateno Y (1993).** Evolution of the glutamine synthetase gene, one of the oldest and functioning genes. *P Natl Acad Sci USA*, **90**, 3009-3013.
- Kuo CG, Tsai CT (1984).** Alternation by high temperature of auxin and gibberellin concentrations in the floral buds, flowers, and young fruit of tomato. *HortScience*, **19**, 870-872.
- Laboun S, Terce-Laforgue T, Roscher A, Bedu M, Restivo FM, Velanis Ch, Skopelitis DS, Moshou PN, Roubelakis-Angelakis KA, Suzuki A, Hirel B (2009).** Resolving the role of plant glutamate dehydrogenase. I. in vivo real time nuclear magnetic resonance spectroscopy experiments. *Plant Cell Physiol*, **50**, 1761-1773.
- Lancien M, Gadal P, Hodges M (2000).** Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol*, **123**, 817-824.
- Lauriere C, Daussant J (1983).** Identification of the ammonium-dependent isoenzyme of glutamate dehydrogenase as the form induced by senescence or darkness stress in the first leaf of wheat. *Physiol Plantarum*, **58**, 89-92.
- Laval-Martin D, Farineau J, Diamond J (1977).** Light versus dark carbon metabolism in cherry tomato fruits. I. Occurrence of photosynthesis: studies of the intermediates. *Plant Physiol*, **60**, 872-876.
- Lea PJ, Thurman DA (1972).** Intercellular location and properties of plant L-glutamate dehydrogenases. *J Exp Bot*, **23**, 440-449.
- Lea PJ, Mifflin BJ (1974).** An alternative route for nitrogen assimilation in plants. *Nature*, **251**, 680-685.
- Lea PJ, Ireland RJ (1999).** Plant amino acids. In: Singh (Ed.), *Nitrogen Metabolism in Higher Plants*, Marcel Dekker, New York, pp. 1-47.

Leech RM, Kirk PR (1968). An NADP-dependent L-glutamate dehydrogenase from chloroplasts of *Vicia faba* L. *Biochem Biophys Res Commun*, **32**, 685-690.

Leegood RC, Lea PJ, Adcock MD, Hausler RE (1995). The regulation and control of photorespiration. *J Exp Bot*, **46**, 1397-1414.

Lehmann T, Ratajczak L, Deckert J, Prybylska M (2003). The modifying effect of sucrose on glutamate dehydrogenase (GDH) activity in lupine embryos treated with inhibitors of RNA and protein synthesis. *Acta Physiol Plant*, **25**, 325-335.

Lehmann T, Ratajczak L (2008). The pivotal role of glutamate dehydrogenase (GDH) in the mobilization of N and C from storage material to asparagine in germinating seeds of yellow lupine. *J Plant Physiol*, **165**, 149-158.

Lemaitre T, Gaufichon L, Boutet-Mercey S, Christ A, Masclaux-Daubresse C (2008). Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in *Arabidopsis thaliana* Wassileskija accession. *Plant Cell Physiol*, **49**, 1056-1065.

Lenucci MS, Cadinu D, Taurino M, Piro G, Dalessandro G (2006). Antioxidant composition in cherry and high-pigment tomato cultivars. *J Agr Food Chem*, **54**, 2606-2613.

Liepmann AH, Olsen LJ (2004). Genomic analysis of aminotransferases in *Arabidopsis thaliana*. *Crit Rev Plant Sci*, **23**, 73-89.

Lightfoot A, Green NK, Cullimore JV (1988). The chloroplast-located glutamine synthetase of *Phaseolus vulgaris* L.: Nucleotide sequence, expression in different organs and uptake into isolated chloroplasts. *Plant Mol Biol*, **11**, 191-202.

Limami AM, Rouillon C, Glevarec G, Gallais A, Hirel B (2002). Genetic and physiological analysis of germination efficiency in maize in relation to nitrogen metabolism reveals the importance of cytosolic glutamine synthetase. *Plant Physiol*, **130**, 1860-1870.

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.

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (1990a). Immunocharacterization of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L. *Plant Physiol*, **94**, 109-113.

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (1990b). Intracellular localization and properties of NADH-glutamate dehydrogenase from *Vitis vinifera* L. Purification and characterization of the major leaf isoenzyme. *J Exp Bot*, **41**, 1223-1230.

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (1991). Plant NADH-glutamate dehydrogenase consists of two polypeptides subunits and their participation in the seven isoenzymes occurs in ordered ratio. *Plant Physiol*, **97**, 104-111.

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (1992). Ammonium-induced increase in NADH-glutamate dehydrogenase activity is caused by de-novo synthesis of the α -subunit. *Planta*, **187**, 322-327.

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA, Kanellis A (1994). Regulation of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in avocado fruit during development and ripening. *Plant Physiol*, **106**, 217-222.

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (1996). The seven NAD(H)-glutamate dehydrogenase isoenzymes exhibit similar anabolic and catabolic activities. *Physiol Plantarum*, **96**, 29-35.

Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (2001). Ammonium assimilation genes in *Vitis vinifera* L. In: *Roubelakis-Angelakis (Ed.), Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands*, pp. 59-108.

Loulakakis KA, Primikiriou NI, Nikolantonakis MA, Roubelakis-Angelakis KA (2002). Immunocharacterization of *Vitis vinifera* L. ferredoxin-dependent glutamate synthase and its spatial and temporal changes during leaf development. *Planta*, **215**, 630-638.

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.

Lutts S, Majerus V, Kinet JM (1999). NaCl effects on praline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. *Physiol Plantarum*, **105**, 450-458.

Mack G (1995). Organ-specific changes in the activity and subunit composition of glutamine synthetase isoforms of barley (*Hordeum vulgare* L.) after growth on different levels of NH_4^+ . *Planta*, **196**, 231-238.

Mack G (1998). Glutamine synthetase isoenzymes, oligomers and subunits from hairy roots of *Beta vulgaris* L. var. *lutea*. *Planta*, **205**, 113-120.

Maestri E, Restivo FM, Gulli M, Tassi F (1991). Glutamate dehydrogenase regulation in callus cultures of *Nicotiana plumbaginifolia*: effect of glucose feeding and carbon source starvation on the isoenzymatic pattern. *Plant Cell Environ*, **14**, 613-618.

Maki H, Ushioda A, Abiko T, Hayakawa T, Yamaya T (2002). Cloning and expression analysis of NADH-glutamate dehydrogenase in rice plants. *Plant Cell Physiol*, **43**, 127.

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 A, Lee J, Kichey T, Gerentes D, Zivy M, Tatout C, Dubois F, Balliau T, Valot B, Davanture M, et al (2006). Two cytosolic glutamine synthetase isoforms of maize are specifically involved in the control of grain production. *Plant Cell*, **18**, 3252-3274.

Martinelli T, Whittaker A, Bochicchio A, Vazzana C, Suzuki A, Masclaux-Daubresse C (2007). Amino acid pattern and glutamate metabolism during dehydration stress in the 'resurrection' plant *Sporobolus stapfianus*: a comparison between desiccation-sensitive and desiccation-tolerant leaves. *J Exp Bot*, **58**, 3037-3046.

Masclaux C, Valadier MH, Brugiere N, Morot-Gaudry JF, Hirel B (2000). Characterization of the sink/source transition in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) shoots in relation to nitrogen management and leaf senescence. *Planta*, **211**, 510-518.

Masclaux-Daubresse C, Carrayol E, Valadier MH (2005). The two nitrogen mobilisation- and senescence-associated GS1 and GDH genes are controlled by C and N metabolites. *Planta*, **221**, 580-588.

Masclaux-Daubresse C, Reisdorf-Cren M, Pageau K, Lelandais M, Grandjean O, Kronenberger J et al. (2006). Glutamine synthetase-Glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant Physiol*, **140**, 444-456.

Masurova H, Ratajczak W, Ratajczak L (1980). Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**

Mathis R, Gamas P, Meyer Y, Cullimore JV (2000). The presence of GSI-like genes in higher plants: support for the paralogous evolution of GSI and GSII genes. *J Mol Evol*, **50**, 116-122.

McNally SF, Hirel B, Gadal P, Mann AF, Stewart GR (1983). Glutamine synthetases of higher plants. *Plant Physiol*, **72**, 22-25.

Meinke DW, Sussex IM (1979). Isolation and characterization of six embryo-lethal mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Dev Biol*, **72**, 62-72.

Melo-Oliveira R, Cinha-Oliveira I, Coruzzi GM (1996). *Arabidopsis* mutant analysis and gene regulation define a non-redundant role for glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation. *P Natl Acad Sci USA*, **93**, 4718-4723.

Miflin BJ, Habash DZ (2002). The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in the nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot*, **53**, 979-987.

Migge A, Meya G, Carrayol E, Hirel B, Becker TW (1996). Regulation of the subunit composition of tomato plastidic glutamine synthetase by light and nitrogen source. *Planta*, **200**, 213-220.

- Miyashita Y, Good AG (2008).** NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. *J Exp Bot*, **59**, 667-680.
- Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, Morrice N, Meek S (1999).** Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J*, **18**, 1-12.
- Morkunas I, Lehmann T, Ratajczak W, Ratajczak L, Tomaszewska B (2000).** The involvement of glutamate dehydrogenase in the adaptation of mitochondria to oxidize glutamate in sucrose starved pea embryos. *Acta Physiol Plant*, **22**, 389-394.
- Nagata M, Saito R (1992).** Changes in free amino acid contents of tomato fruits during ripening, especially changes in glutamine. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **39**, 64-67.
- Nesbitt TC, Tanksley SD (2002).** Comparative sequencing in the genus *Lycopersicon*: implication for the evolution of fruit size in the domestication of cultivated tomatoes. *Genetics*, **162**, 365–379.
- Nogueira ED, Olivares FL, Japiassu JC, Vilar C, Vinagre F, Baldani JI, Hemerly AS (2005).** Characterization of glutamine synthetase genes in sugarcane genotypes with different rates of biological nitrogen fixation. *Plant Sci*, **199**, 819-832.
- Nuez F, Costa J, Cuartero J (1986).** Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties “Sub-Artic Plenty”, “75/59” and “Severianin”. *Z Pflanzenzucht*, **96**, 200-206.
- Oaks A (1994).** Efficiency of nitrogen utilization in C₃ and C₄ cereals. *Plant Physiol*, **106**, 407-414.
- Obara M, Sato T, Sasaki S, Kashiba K, Nagano A, Nakamura I, Ebitany T, Yano M, Yamaya T (2004).** Identification and characterization of a QTL on chromosome 2 for cytosolic glutamine synthetase content and panicle number in rice. *Theor Appl Genet*, **110**, 1-11.
- Ochs G, Schock G, Trischler M, Kosemund K, Wild A (1999).** Complexity and expression of the glutamine synthetase multigene family in the amphidiploid crop *Brassica napus*. *Plant Mol Biol*, **392**, 395-405.
- Oliveira IC, Coruzzi GM (1999).** Carbon and amino acids reciprocally modulate the expression of glutamine synthetase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, **121**, 301-310.
- Osborne DJ, Went FW (1953).** Αναφορά από Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P (2005).
- Ortega JL, Roche D, Sengupta-Gopalan C (1999).** Oxidative turnover of soybean root glutamine synthetase. In vitro and in vivo studies. *Plant Physiol*, **119**, 1483-1495.
- Ortega JL, Moguel-Esponda S, Potenza C, Conklin CF, Quintana A, Sengupta-Gopalan C (2006).** The 3' untranslated region of a soybean cytosolic glutamine

synthetase (GS1) affects transcript stability and protein accumulation of transgenic alfalfa. *Plant J*, **45**, 832-846.

Osuji GO, Madu WC (1996). Ammonium ion salvage by glutamate dehydrogenase during defence response in maize. *Phytochemistry*, **42**, 1491-1498.

Osuji GO, Haby VA, Beyene A, Madu WC, Mangaroo AS (1997). The isomerization of glutamate dehydrogenase in response to lead toxicity. *Biol Plantarum*, **40**, 389-398.

Paczek V, Dubois F, Sangwan R, Moro-Gaudry JF, Roubelakis-Angelakis KA, Hirel B (2002). Cellular and subcellular localisation of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in grapes gives new insights on the regulation of N and C metabolism. *Planta*, **216**, 245-254.

Pageau K, Reisdorf-Cren M, Morot-Gaudry JF, Masclaux-Daubresse C (2006). The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. *J Exp Bot*, **57**, 547-557.

Pavesi A, Ficarelli A, Tassi F, Restivo FM (2000). Cloning of two glutamate dehydrogenase cDNAs from *Asparagus officinalis*: sequence analysis and evolutionary implications. *Genome*, **43**, 306-316.

Peat LJ, Tobin AK (1996). The effect of nitrogen nutrition on the cellular localization of glutamine synthetase isoforms in barley roots. *Plant Physiol*, **111**, 1109-1117.

Peeters KMU, Van Laere AJ (1992). Ammonium and amino acid metabolism in excised leaves of wheat (*Triticum aestivum*) senescing in the dark. *Physiol Plantarum*, **84**, 243-249.

Pereira S, Carvalho H, Sunkel C, Salema R (1992). Immunocyto-localization of glutamine synthetase in mesophyll and phloem of leaves of *Solanum tuberosum* L. *Protoplasma*, **167**, 66-73.

Perez-Garcia A, Canovas FM, Gallardo F, Hirel B, de Vicente A (1995). Differential expression of glutamine synthetase isoforms in tomato detached leaflets infected with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Mol Plant Microbe In*, **8**, 96-103.

Perez-Garcia A, Pereira S, Pissarra J, Gutierrez AG, Cazorla FM, Salema R, de Vicente A, Canovas FM (1998). Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta*, **206**, 426-434.

Perez-Rodriguez J, Valpuesta V (1996). Expression of glutamine synthetase genes during natural senescence of tomato leaves. *Physiol Plantarum*, **97**, 576-582.

- Peterman TK, Goodman HM (1991).** The glutamine synthetase gene family of *Arabidopsis thaliana*: Light-regulation and differential expression in leaves, roots and seeds. *Mol Gen Genet*, **230**, 145-154.
- 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 (1983).** Parthenocarpie naturelle chez la tomate. I. Revue bibliographique. *Agronomie*, **3**, 311-320.
- Phinney BO, West CA, Ritzel M, Neely PM (1957).** Evidence for 'gibberellin-like' substances from flowering plants. *P Natl Acad Sci USA*, **43**, 398-404.
- Picault N, Hodges M, Palmieri L, Palmieri F (2004).** The growing family of mitochondrial carriers in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, **9**, 138-146.
- Picha DH (1986).** Effect of harvest maturity on the final fruit composition of cherry and large-fruited tomato cultivars. *J Am Soc Hortic Sci*, **76**, 764-770.
- Pontoppidan B, Kannangara (1994).** Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA(Glu) reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis. *Eur J Biochem*, **225**, 529-537.
- Pratta G, Zorzoli R, Boggio SB, Picardi LA, Valle EM (2004).** Glutamine and glutamate levels and related metabolizing enzymes in tomato fruits with different shelf-life. *Sci Hort-Amsterdam*, **100**, 341-347.
- Purnell M, Skopelitis DM, Roubelakis-Angelakis K, Botella JR (2005).** Modulation of higher-plant NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase activity in transgenic tobacco via alteration of beta subunit levels. *Planta*, **222**, 167-180.
- Purnell MP, Botella JR (2007).** Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo. *Plant Physiol*, **143**, 530-539.
- Qiu X, Xie W, Lian XM, Zhang Q (2009).** Molecular analyses of the rice glutamate dehydrogenase gene family and their response to nitrogen and phosphorous deprivation. *Plant Cell Rep*, **28**, 1115-1126.
- Quetz PC, Tischner R, Lorenzen H (1982).** Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**
- Ramamurthy S, Ludders P (1982).** Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**
- Remakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF (2003).** Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction PCR data. *Neurosci Lett*, **339**, 62-66.

Restivo FM (2004). Molecular cloning of glutamate dehydrogenase genes of *Nicotiana plumbaginifolia*: structure and regulation of their expression by physiological and stress conditions. *Plant Sci*, **166**, 971-982.

Riedel J, Tischner R, Mack G (2001). The chloroplastic glutamine synthetase (GS-2) of tobacco is phosphorylated and associated with 14-3-3 proteins inside the chloroplast. *Planta*, **213**, 396-401.

Robinson SA, Slade AP, Fox GG, Phillips RR, Ratcliffe RG, Stewart GR, (1991). The role of glutamate dehydrogenase in plant nitrogen metabolism. *Plant Physiol*, **95**, 509-516.

Robinson SA, Stewart GR, Phillips R (1992). Regulation of glutamate dehydrogenase activity in relation to carbon limitation and protein catabolism in carrot cell suspension cultures. *Plant Physiol*, **98**, 1190-1195.

Rubatzhy VE, Yamaguchi M (1997). World vegetables (principles, production and nutritive values). *Chapman and Hall, London*. pp. 533-553

Sahulka J, Lisa L (1979). Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**

Sahulka J, Lisa L (1980). Effect of some disaccharides, hexoses and pentoses on nitrate reductase, glutamine synthetase, and glutamate dehydrogenase in excised pea roots. *Physiol Plantarum*, **50**, 32-36.

Sairam RK, Sirohi GS, Srivastava GC (1975). Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**

Sakakibara H, Shimizu H, Hase T, Yamazaki Y, Takao T, Shimonishi Y, Sugiyama T (1996). Molecular identification and characterization of cytosolic isoforms of glutamine synthetase in maize roots. *J Biol Chem*, **271**, 29561-29568.

Sakurai N, Hayakawa T, Nakamura T, Yamaya T (1996). Changes in the cellular localization of cytosolic glutamine synthetase protein in vascular bundles of rice leaves at various stages of development. *Planta*, **200**, 306-311.

Santos C, Pereira A, Pereira S, Teixeira J (2004). Regulation of glutamine synthetase expression in sunflower cells exposed to salt and osmotic stress. *Sci Horti-Amsterdam*, **103**, 101-111.

Sastry KKS, Muir RM (1963). Gibberellin: effect on diffusible auxin in fruit development. *Science*, **140**, 494-495.

Scarpeci TE, Marro ML, Bortolotti S, Boggio SB, Valle EM (2007). Plant nutritional status modulates glutamine synthetase levels in ripe tomatoes (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom). *J Plant Physiol*, **164**, 137-145.

Scheible WR, Pauly M (2004). Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr Opin Plant Biol*, **7**, 285-295.

Schwabe WW, Mills JJ (1981). Hormones and parthenocarpic fruit set: a literature survey. *Hortic Abstr*, **51**, 661-698.

Serrani JC, Fos M, Atares A, Garcia-Martinez JL (2007). Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv. Micro-tom of tomato. *J Plant Growth Regul*, **26**, 211-221.

Skopelitis DS, Paranychiankis NV, Paschalidis KA, Plianokis ED, Delis ID, Yakoumakis DI et al. (2006). Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenase to form glutamate for praline synthesis in tobacco and grapevine. *Plant Cell*, **18**, 2767-2781.

Skopelitis DS, Paranychiankis NV, Kouvarakis A, Spyros A, Stephanou EG, Roubelakis-Angelakis K (2007). The isoenzyme 7 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase exhibits high deaminating and low aminating activity. *Plant Physiol*, **145**, 1726-1734.

Slimestad R, Verheul MJ (2005). Content of chalconaringenin and chlorogenic acid in cherry tomatoes is strongly reduced during post-harvest ripening. *J Agr Food Chem*, **53**, 7251-7256.

Smillie RM, Hetherington SE, Davies WJ (1999). Photosynthetic activity of calyx, green shoulder, pericarp, and locular parenchyma of tomato fruit. *J Exp Bot*, **50**, 707-718.

Somerville CR, Ogran WL (1980). Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking leaf glutamate synthase. *Nature*, **286**, 257-259

Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, Yamaya T, Yamaguchi J (2003). Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. *Plant Cell Biol*, **44**, 1396-1402.

Sorrequieta A, Ferraro G, Boggio SB, Valle EM (2009). Free amino acid production during tomato fruit ripening: a focus on L-glutamate. *Amino Acids*, **38**, 1523-1532.

Srivastava GC, Fowden L (1972). Αναφορά από **Srivastava HS, Singh RP (1987).**

Srivastava HS, Singh RP (1987). Role and regulation of L-glutamate dehydrogenase activity in higher plants. *Phytochemistry*, **26**, 597-610.

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.

Stevens MA, Kader AA, Albright-Holton M, Algazi M (1977). Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *J Am Soc Hortic Sci*, **102**, 724-731.

- Stewart GR, Shatilov VR, Turnbull MH, Robinson SA, Goodall R (1995).** Evidence that glutamate dehydrogenase plays a role in oxidative deamination of glutamate in seedlings of *Zea mays*. *Aust J Plant Physiol*, **22**, 805-809.
- Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible W-R, Krapp A (2002).** Steps toward an integrative view of nitrogen metabolism. *J Exp Bot*, **53**, 959-970.
- Sukanya R, Li MG, Snustad DP (1994).** Root-specific responses of individual glutamine synthetase genes of maize to nitrate and ammonium. *Plant Mol Biol*, **26**, 1935-1946.
- Syntichaki KM, Loulakakis KA, Roubelakis-Angelakis KA (1996).** The amino-acid sequence similarity of plant glutamate dehydrogenase to the extremophilic archaeal enzyme conforms to its stress-related function. *Gene*, **168**, 87-92.
- Tabuchi M, Abiko T, Yamaya T (2007).** Assimilation of ammonium ions and reutilization of nitrogen in rice (*Oryza sativa* L.). *J Exp Bot*, **58**, 2319-2327.
- Taira M, Valtersson U, Burkhardt B, Ludwig R (2004).** Arabidopsis thaliana GLN2-Encoded Glutamine Synthetase Is Dual Targeted to Leaf Mitochondria and Chloroplasts. *Plant Cell*, **16**, 2048-2058.
- Tanksley SD (2004).** The genetic, developmental and molecular bases of fruit size and shape variation in tomato. *Plant Cell Special Issue*, **16**, S181-S189.
- Tavernier V, Cadiou S, Pageau K, Lauge R, Reisdorf-Cren M, Langin T, Masclaux-Daubresse C (2007).** The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *J Exp Bot*, **58**, 3351-3360.
- 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.
- Teixeira J, Pereira S, Canovas F, Salema R (2005).** Glutamine synthetase of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Desiree) plants: cell- and organ-specific expression and differential developmental regulation reveal specific roles in nitrogen assimilation and mobilization. *J Exp Bot*, **56**, 663-671.
- Temple SJ, Kunjibettu S, Roche D, Sengupta-Gopalan C (1996).** Total glutamine synthetase activity during soybean nodule development is controlled at the level of transcription and holoprotein turnover. *Plant Physiol*, **112**, 1723-1733.
- Terce-Laforgue T, Dubois F, Ferrario-Mery S, Pou de Crezenzo M, Sangwan R, Hirel B (2004).** Glutamate dehydrogenase of tobacco is mainly induced in the cytosol of phloem companion cells when ammonia is provided either externally or released during photorespiration. *Plant Physiol*, **136**, 4308-4317.
- Thompson DS, Davies WJ, Ho LC (1998).** Regulation of tomato fruit growth by epidermal cell wall enzymes. *Plant Cell Environ*, **21**, 589-599.

Toor RK, Savage GP (2006). Effect of semi-drying on the antioxidant components of tomatoes. *Food Chem*, **94**, 90-97.

Tsatsaronis GC, Boskou D (1975). Amino acid and mineral salt content of tomato seed and skin waste. *J Sci Food Agr*, **26**, 421-423.

Turano FJ, Thakkar SS, Fang T, Weisemann JM (1997). Characterization and expression of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase genes in Arabidopsis. *Plant Physiol*, **113**, 1329-1341.

Unno H, Uchida T, Sugawara H, Kurisu G, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H, Hase T, Kusunoki M (2006). Atomic structure of plant glutamine synthetase – a key enzyme for plant productivity. *J Biol Chem*, **281**, 29287-29296.

Valle EM, Boggio SB, Heldt HW (1998). Free amino acids content of phloem sap and fruits in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell Physiol*, **39**, 458-461.

Vandepoele K, Simillion C, Van de Peer Y (2003). Evidence that rice and other cereals are ancient aneuploids. *Plant Cell*, **15**, 2192-2202.

Vardy E, Lapushner D, Genizi A, Hewitt J (1989). Genetics of parthenocarpy in tomato under a low temperature regime: I. Line RP75/59. *Euphytica*, **41**, 1-8.

Vardy E, Lapushner D, Genizi A, Hewitt J (1989a). Genetics of parthenocarpy in tomato under a low temperature regime: II. Cultivar Severianin. *Euphytica*, **41**, 9-15.

Varga A, Bruinsma J (1986). Tomato. In *SP Monselise, ed, CRC Handbook of Fruit Set and Development*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 461-491.

Varoquaux F, Blanvillain R, Delseny M, Gallois P (2000). Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends Biotechnol*, **18**, 233-242.

Wallsgrave RM, Turner JC, Hall NP, Kendall AC, Bright SWJ (1987). Barley mutants lacking chloroplast glutamine synthetase – biochemical and genetic analysis. *Plant Physiol*, **83**, 155-158.

Wittwer SH, Bukovac MJ, Sell HM, Weller LE (1957). Some effects of gibberellin on flowering and fruit setting. *Plant Physiol*, **32**, 39-41.

Woodall J, Forde BG (1996). Glutamine synthetase polypeptides in the roots of 55 legume species in relation to their climatic origin and the partitioning of nitrate assimilation. *Plant Cell Environ*, **19**, 848-858.

Xuan PT (1999). Effect of potassium nitrate on seed production of cherry tomato. *ARC Training report*.

Yakovleva VI, Kretovitch VL, Gil'Manov MK (1964). Localization of glutamate dehydrogenase in corn roots. *Biokhimiya*, **29**, 401-406.

Yamaya T, Oaks A, Matsumoto H (1984). Characterization of glutamate dehydrogenase in mitochondria prepared from corn shoots. *Plant Physiol*, **76**, 1009-1013.

Yamaya T, Obara M, Nakajima H, Sasaki S, Hayakawa T, Sato T (2002). Genetic manipulation and quantitative-trait loci mapping for nitrogen recycling in rice. *J Exp Bot*, **53**, 917-925.

Yasuda S, Komatsu T, Nonomura T (1930). Parthenocarpy caused by the stimulation of pollination in some plants of Solanaceae (Pre-report I). *Nogyo Oyobi Engei*, **5**, 287-294.

Yu SM (1999). Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol*, **121**, 687-693.

Zozaya-Hinchliffe M, Potenza C, Ortega JL, Sengupta-Gopalan C (2005). Nitrogen and metabolic regulation of the expression of plastidic glutamine synthetase in alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Sci*, **168**, 1041-1052.