

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

**Μελέτη της καρβοξυκινάσης του φωσφορο-  
ενολοπυροσταφυλικού οξέος (PEPCK) σε παρθενο-  
καρπικούς και ένσπερμους καρπούς τομάτας κατά τη  
διάρκεια της ανάπτυξής τους**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ  
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ  
ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥ**

**ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΪΒΑΛΑΚΙ**

**ΜΑΡΙΑ Α. ΧΡΗΣΤΑΚΗ**

**ΑΘΗΝΑ 2012**

## ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη της καρβοξυκινάσης του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού οξέος σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς τομάτας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους»

Εξεταστική επιτροπή:

Αν. Καθηγητής Γ. Αϊβαλάκης, Επιβλέπων

Καθηγητής Γ.Καραμπουρνιώτης, Μέλος

Αν. Καθηγητής Κ. Ακουμιανάκης, Μέλος

ΜΑΡΙΑ Α. ΧΡΗΣΤΑΚΗ

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

## Περίληψη

Η καρβοξυκινάση του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), είναι ένζυμο-κλειδί της γλυκονεογένεσης. Στον καρπό της τομάτας η συγκέντρωση των οργανικών οξέων (μηλικού και κιτρικού) αυξάνεται έως το στάδιο της αλλαγής του χρώματος του καρπού και μετά μειώνεται. Στο ζελατινώδες παρέγχυμα η συγκέντρωση των οξέων είναι πολλαπλάσια από ότι σε άλλους ιστούς. Επιπλέον, οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσιάζουν ελάχιστη ανάπτυξη του ζελατινώδους παρεγχύματος.

Οι παρθενοκαρπικοί καρποί αναπτύχθηκαν μετά την αφαίρεση των ανθέρων κλειστών ανθέων με την εφαρμογή 50ppm β-NOA. Το ένζυμο μελετήθηκε σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερους καρπούς τομάτας τύπου cherry στα ακόλουθα στάδια ωρίμανσής τους: νεαροί, ανώριμοι πράσινοι (διαμέτρου 5mm και 15mm), ώριμοι πράσινοι, κατά την αλλαγή του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι καρποί. Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε 1:1000 αντι-PEPCK (AS07241, Agrisera). Ως μάρτυρας, χρησιμοποιήθηκε ορρός κουνελιού προ της δημιουργίας των αντισωμάτων. Το δευτερογενές αντισώμα έφερε συνδεδεμένη την αλκαλική φωσφατάση και η PEPCK εντοπίστηκε μετά τη χρωματική αντίδραση με 5-βρωμο-3-χλωρο-ινδολλο-φωσφορικό (BCIP) και νιτρομπλέ του τετραζολίου (NBT).

Σήμα εντοπίστηκε στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, στις σπερματικές βλάστες /σπέρματα και στο ζελατινώδες παρέγχυμα τόσο των ένσπερων όσο και των παρθενοκαρπικών καρπών. Όσον αφορά στο σήμα, που παρατηρήθηκε στο ζελατινώδες παρέγχυμα των παρθενοκαρπικών καρπών, ήταν εντονότερο στα τελευταία στάδια ωρίμανσης. Μελέτη της έκφρασης της PEPCK στα διάφορα στάδια ανάπτυξης έδειξε υψηλά επίπεδα μεταγραφημάτων στα τελευταία στάδια ανάπτυξης των ένσπερων καρπών και στο στάδιο αλλαγής χρώματος των παρθενοκαρπικών καρπών. Τα αποτελέσματα αυτά παραπέμπουν στην πιθανή συμμετοχή του ενζύμου στη μετατροπή των οργανικών οξέων σε σάκχαρα ιδιαίτερα στα τελευταία στάδια ανάπτυξης του καρπού.

## **Abstract**

PEP Carboxykinase (PEPCK) is a key enzyme of glyconeogenesis. In tomato fruit the concentration of malic and citric acids increases during the early stages of development, while after the breaker stage it decreases. The highest organic acid concentration has been observed in the locular parenchyma. The development of locular parenchyma in parthenocarpic tomato fruit is much less compared to that in the seeded fruit.

PEPCK immunolocalization was studied both in parthenocarpic and seeded tomato cherry fruit in young immature green fruits of 5mm and 15 mm in diameter, mature green, breaker and red ripe. Parthenocarpic fruits were developed by the application of 50 ppm  $\beta$ -naphthoxyacetic acid on emasculated closed flowers. For the immunolocalization of the enzyme a dilution 1:1000 anti PEPCK (AS07241, Agrisera) was used. Rabbit preimmune serum was used as a control, and as a secondary antibody AP-Anti-Rabbit, Promega was applied.

The immunodetection signal was localised in the locular parenchyma, in the vascular bundles and in the embryo organs of seeded and parthenocarpic fruits. The presence of the enzyme in the locular parenchyma of the parthenocarpic fruits was more intense at the latter stages of the fruit development. Real time PCR revealed that transcripts of PEPCK gene were accumulated at later development stages of seeded fruits and at the breaker stage of parthenocarpic fruits. These results point to the probable contribution of PEPCK enzyme to the conversion of organic acids into carbohydrates especially during the latter stages of tomato fruit development.

## **Πρόλογος**

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο της Φυσιολογίας φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αν. Καθηγητή Γεώργιου Αϊβαλάκι στα πλαίσια μεταπτυχιακού προγράμματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κύριο Αϊβαλάκι για την πολύτιμη και καθοριστική του συμβολή στην εκπόνηση της παρούσας μελέτης. Υποβάλλω επίσης τις ευχαριστίες μου προς τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, στον Καθηγητή Γ. Καραμπουρνιώτη και στον Αναπληρωτή Καθηγητή Κ. Ακουμιανάκη για τις διορθώσεις που εισηγήθηκαν καθώς και για την αξιολόγηση της παρούσας μελέτης.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω το Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών για την παραχώρηση του φυτικού υλικού και ιδιαίτερα τον Δρ. Ι. Καραπάνο και τους συνάδελφους Γ. Τσιλικόχρυσο και Γ. Τσανικλίδη για τη σημαντική βοήθειά τους.

**Μάρτιος 2012**

## Περιεχόμενα

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 1.    | Εισαγωγή.....   | 1  |
| 1.1.  | Η τομάτα cherry .....                                       | 1  |
| 1.1.1 | Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας.....                        | 1  |
| 1.1.2 | Διαιτητική αξία του καρπού της τομάτας τύπου cherry.....    | 3  |
| 1.1.3 | Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry .....               | 4  |
| 1.1.4 | Μορφολογία και ανατομία του καρπού .....                    | 5  |
| 1.1.5 | Η ανάπτυξη του καρπού.....                                  | 7  |
| 1.2.  | Η Παρθενοκαρπία.....  | 12 |
| 1.2.1 | Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα .....      | 13 |
| 1.2.2 | Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία.....           | 14 |
| 1.2.3 | Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας ..... | 14 |
| 1.3.  | Η σύσταση του καρπού της τομάτας.....                       | 15 |
| 1.3.1 | Τα οξέα του καρπού της τομάτας .....                        | 16 |
| 1.4.  | Η καρβοξυκινάση του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού οξέος.....   | 17 |
| 1.4.1 | Δομή του ενζύμου.....                                       | 19 |
| 1.4.2 | Η Φωσφορυλίωση του ενζύμου.....                             | 20 |
| 1.4.3 | Ο ρόλος της PEPCK στη Φωτοσύνθεση.....                      | 21 |
| 1.4.4 | Μεταβολισμός CAM.....                                       | 23 |
| 1.4.5 | Γονίδια που κωδικοποιούν την PEPCK .....                    | 24 |
| 1.5.  | Εντοπισμός του ενζύμου.....                                 | 25 |
| 1.6.  | Σκοπός της εργασίας.....                                    | 28 |
| 2.    | Υλικά και Μέθοδοι.....                                      | 29 |
| 2.1.  | Η διαδικασία του πειράματος.....                            | 29 |
| 2.2.  | Το φυτικό υλικό.....  | 29 |
| 2.3.  | Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.....             | 31 |
| 2.3.1 | Εκχύλιση των ενζύμων.....                                   | 31 |
| 2.3.2 | Μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.....          | 31 |
| 2.3.3 | Ηλεκτροφορήσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών.....            | 32 |
| 2.3.4 | Ηλεκτρομεταφορά πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....  | 33 |
| 2.3.5 | Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.....             | 33 |
| 2.4.  | Ανοσοεντοπισμός.....  | 35 |
| 2.4.1 | Προσήλωση.....  | 35 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 2.4.2 | Αφυδάτωση.....  | 35 |
| 2.4.3 | Διαφανοποίηση.....  | 35 |
| 2.4.4 | Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη.....   | 36 |
| 2.4.5 | Προετοιμασία αντικειμενοφόρων.....  | 36 |
| 2.4.6 | Μικροτόμηση.....  | 36 |
| 2.4.7 | Αποπαραφίνωση.....  | 37 |
| 2.4.8 | Ανοσοεντοπισμός.....  | 37 |
| 2.5.  | Έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την PEPCK στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού..... | 38 |
| 2.5.1 | Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.....                                | 38 |
| 2.5.2 | Έλεγχος της ποιότητας του παραλαμβανόμενου RNA.....   | 40 |
| 2.5.3 | Υδρόλυση του DNA των δειγμάτων.....   | 41 |
| 2.5.4 | Παρασκευή cDNA.....   | 42 |
| 2.5.5 | Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....  | 42 |
| 3.    | Αποτελέσματα.....   | 45 |
| 3.1.  | Έλεγχος καταλληλότητας αντισωμάτων PEPCK.....   | 45 |
| 3.2.  | Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου PEPCK.....  | 45 |
| 3.2.1 | Ανώριμος καρπός διαμέτρου 0,5cm.....  | 46 |
| 3.2.2 | Ανώριμος καρπός διαμέτρου 1,5cm.....  | 47 |
| 3.2.3 | Ώριμος πράσινος καρπός.....   | 48 |
| 3.2.4 | Ώριμος καρπός στο στάδιο αλλαγής χρώματος.....  | 49 |
| 3.2.5 | Ώριμος κόκκινος καρπός.....   | 50 |
| 3.3.  | Έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την PEPCK στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού..... | 51 |
| 4.    | Συζήτηση.....   | 55 |
| 4.1.  | Η PEPCK στους ένσπερμους καρπούς.....   | 55 |
| 4.2.  | Η PEPCK στους παρθενοκαρπικούς καρπούς.....   | 57 |
| 5.    | Συμπεράσματα.....   | 59 |
| 6.    | Βιβλιογραφία.....   | 60 |
| 7.    | Εικόνες.....  | 71 |
| 8.    | Πίνακες.....  | 73 |

# 1. Εισαγωγή

## 1.1. Η τομάτα cherry

### 1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας

Η τομάτα ταξινομείται στο γένος *Solanum* και είδος *lycopersicon* της οικογένειας *Solanaceae* (Heiser & Anderson, 1999). Ανατρέχοντας στο παρελθόν, το 1753, ο Σουηδός βοτανολόγος Linnaeus ονόμασε την τομάτα *Solanum lycopersicon* αλλά 15 χρόνια αργότερα ο Miller ταξινόμησε την τομάτα στο νέο γένος *Lycopersicon* (*Lycopersicon esculentum*) (Taylor, 1986).

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

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

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

Η τομάτα τύπου cherry (*S. lycopersicon* var. *cerasiforme*) είναι σχεδόν βέβαιο ότι, αποτελεί τον άμεσο πρόγονο των σύγχρονων καλλιεργουμένων τύπων τομάτας,



ενώ, είναι και το μοναδικό άγριο είδος τομάτας που απαντάται και εκτός Νότιας Αμερικής (Taylor, 1986).

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

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

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

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

Η συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση της τομάτας cherry οφείλεται κατά κύριο λόγο στη μεγάλη διατροφική αξία της και στα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της. Άλλωστε, οι τομάτες cherry παρουσιάζουν υψηλότερη αναλογία σε ξηρά ουσία και μεγαλύτερο περιεχόμενο σε ολικά σάκχαρα, οργανικά οξέα, βιταμίνη C, ελεύθερα αμινοξέα, αντιοξειδωτικά (β-καροτίνη, λυκοπένιο) και φλαβονοειδή σε σχέση με τις μεγαλύτερες τομάτες (Hallman and Kobryń, 2003). Εκτός αυτού, εμφανίζουν και υψηλότερη περιεκτικότητα σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και οργανικών οξέων (κιτρικό και μηλικό), τα οποία αποτελούν βασικούς παράγοντες στον προσδιορισμό της γλυκύτητας, της οξύτητας και γενικά της έντασης της γεύσης των καρπών της τομάτας (Raffo *et al.*, 2002).

Μάλιστα, ο Hobson (1988) αναφέρει ότι εκτός της υψηλότερης περιεκτικότητας σακχάρων (με κυρίαρχα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη), η γλυκύτητα στη γεύση των cherry αποδίδεται και στην παρουσία της σακχαρόζης όπου απαντάται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 0,5% του νεπού βάρους.

Ακόμη, η διαιτητική αξία των καρπών cherry είναι υψηλή, γιατί περιέχουν ικανοποιητικές ποσότητες βιταμινών, ιχνοστοιχείων, αλάτων και αντιοξειδωτικών, απαραίτητων για βασικές λειτουργίες του οργανισμού με χαμηλό θερμιδικό και ενεργειακό δυναμικό. Αναφέρεται ότι 100g ώριμου καρπού τύπου cherry, παρέχουν 22 θερμίδες ενέργειας, 1,1g πρωτεΐνης, 0,2g λίπους, 4,7g υδατανθράκων, 13mg Ca, 27mg P, 0,5mg Fe, 3mg Na, 900 IU βιταμίνης A, 0,06mg βιταμίνης B1, 0,04mg βιταμίνης B2, 0,7mg νιασίνης και 23mg βιταμίνης C (FAO, 1985). Οι καρποί τομάτας τύπου cherry αποτελούν καλή πηγή βιταμινών και αλάτων, με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (Long, 1998), ενώ χαρακτηρίζονται από σχετικά υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών (ιδιαίτερα καροτενοειδών όπως το λυκοπένιο και το β-καροτένιο) που τους προσδίδει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Raffo *et al.*, 2002).

Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν το περιεχόμενο των καρπών σε βασικά αντιοξειδωτικά (καροτενοειδή, ασκορβικό οξύ, φαινολικά συστατικά) σε διαφορετικά στάδια ωριμότητας. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη σχετικά υψηλή περιεκτικότητα των καρπών τομάτας cherry σε καροτενοειδή, που μάλιστα αυξάνεται με την πρόοδο της ωριμότητας των καρπών, έτσι ώστε στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας να παρουσιάζουν το μέγιστο επίπεδο καροτενοειδών, καθώς και αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των μη υδατοδιαλυτών αντιοξειδωτικών.

### 1.1.3 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry

Το φυτό τομάτας τύπου cherry χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευρωστία και μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 3,0-3,6m. Όσον αφορά την ανάπτυξη του βλαστού, αναφέρεται ότι το μήκος καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες. Έτσι, αν και οι πλείστοι γονότυποι cherry τομάτας χαρακτηρίζονται από απεριόριστη ανάπτυξη βλαστών (indeterminate), υπάρχουν και ποικιλίες ημικαθορισμένης (semi-determinate) και καθορισμένης (determinate) ανάπτυξης. Μάλιστα, στις ποικιλίες με απεριόριστη ανάπτυξη το μήκος του κεντρικού βλαστού μπορεί να φθάσει και 10 ή περισσότερα μέτρα όταν το φυτό κλαδεύεται σε μονοστέλεχο σύστημα (Ολύμπιος, 2001).

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

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

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

#### 1.1.4 Μορφολογία και ανατομία του καρπού

Ο καρπός της τομάτας είναι πολύχωρος ράγα, με ποικίλα σχήματα και αποτελείται από το περικόρπιο, το ζελατινώδες παρέγχυμα, μέσα στον οποίο βρίσκονται τα σπέρματα και τον πλακούντα (Εικόνες 1-1, 1-2).

Το περικόρπιο προέρχεται από τα τοιχώματα της ωοθήκης και αποτελείται από το εξωκόρπιο, από το παρεγχυματικό μεσοκόρπιο με τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και από ένα μονοκύτταρο στρώμα ενδοκαρπίου που επικαλύπτει χώρους που βρίσκονται οι σπερματικές βλάστες.

Τα κύτταρα του περικορπίου υφίστανται ανατομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας σχηματισμού του καρπού. Μία έως δύο ημέρες μετά τη γονιμοποίηση, τα μικρά χυμοτόπια μέσα σε κάθε κύτταρο ενώνονται ώστε να σχηματιστεί ένα κεντρικό χυμοτόπιο (Mohr and Stein, 1969). Στις ακόλουθες δύο εβδομάδες το κυτταρόπλασμα μειώνεται σε ένα λεπτό περιφερειακό στρώμα. Εντωμεταξύ πραγματοποιείται και η αρχική φάση διαχωρισμού του κυτταρικού τοιχώματος.

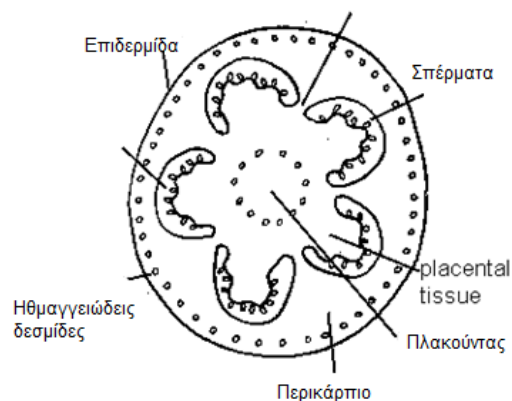
Ο διαχωρισμός αρχίζει από τις περιοχές που συνδέονται τα γειτονικά κύτταρα και συνεχίζεται κατά μήκος των μεσοτοιχιών. Τα πλασμοδέματα που αλληλοσυνδέουν το κυτόπλασμα των γειτονικών κυττάρων είναι πολύ μικρά. Όλα τα οργανίδια μπορούν να παρατηρηθούν μέσα στα κύτταρα αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και το πλασμάλλημα και ο τονοπλάστης παραμένουν άθικτοι (Mohr and Stein, 1969) και φυσιολογικώς ενεργοί (Vickery and Bruinsma, 1973) στη διάρκεια ωρίμανσης του καρπού.

Τα μιτοχόνδρια, οι χρωμοπλάστες και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, διατηρούνται και στους ώριμους καρπούς (Crookes and Grierson, 1983). Τα πλαστίδια περιέχουν άμυλο και διαθέτουν τυπικές περιοχές grana και θυλακοειδείς μεμβράνες στρώματος (Harris and Spragg, 1969). Στους πράσινους καρπούς τα επιδερμικά κύτταρα τείνουν να έχουν λιγότερο άμυλο σε σχέση με αυτά του εσωτερικού παρεγχύματος (Rosso, 1968). Ο κύριος όγκος της κυτταρικής διαίρεσης στο περικόρπιο πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά την άνθηση (Davies and Cocking, 1965) αν και οι Asahira *et al.* (1968) αναφέρουν πως κυτταρικές διαιρέσεις μπορεί να υπάρξουν και κατά τη δεύτερη εβδομάδα. Ωστόσο, στο *L. pimpinellifolium* κυτταρική διαίρεση παρατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού (Houghtalin, 1935).

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

Κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης του καρπού το ζελατινώδες παρέγχυμα αρχίζει να επεκτείνεται μέσα στους χώρους της ωοθήκης και να περιβάλλει τις σπερματικές βλάστες. Η διαδικασία αυτή

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



*Εικόνα 1-1: Ανατομία πεντάχωρου καρπού τομάτας*

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



**Εικόνα 1-2: Ανατομία δίχωρου καρπού τομάτας**

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

### 1.1.5 Η ανάπτυξη του καρπού

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

διαρκεί τρεις έως πέντε εβδομάδες. Στη φάση αυτή, που φτάνει μέχρι το στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, ο καρπός αποκτά το μεγαλύτερο μέρος του βάρους του. Ο σχηματισμός του καρπού ολοκληρώνεται μετά και την τρίτη περίοδο που διαρκεί δύο εβδομάδες και που χαρακτηρίζεται από αργή ανάπτυξη. Στη φάση αυτή παρατηρείται μικρή αύξηση του βάρους αλλά και έντονες μεταβολικές διεργασίες στον καρπό.

### **Πρώιμη ανάπτυξη καρπού**

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

### **1η Φάση ανάπτυξης: Ανάπτυξη της ωοθήκης, γονιμοποίηση και καρπόδεση.**

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

Σύμφωνα με τους Gillaspay *et al.* (1993) η φύση του σήματος (ή των σημάτων) που ελέγχει το σχηματισμό της ωοθήκης δεν μας είναι γνωστή. Φαίνεται πως ο παράγοντας (ή οι παράγοντες) που προέρχεται από το σποροφυτικό ιστό που περιβάλλει την αναπτυσσόμενη ωοθήκη απαιτείται για τον ερεθισμό και τη λειτουργία των κυτταρικών διαιρέσεων στις ανθικές καταβολές μέχρι η ωοθήκη να αποκτήσει το ώριμο μέγεθός της. Στη φάση αυτή η δραστηριότητα των κυτταρικών διαιρέσεων παραμένει προσωρινά μειωμένη μέχρι να ολοκληρωθεί η γονιμοποίηση.

Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης η εξέλιξη της καρπόδεσης έπεται της επιτυχημένης ολοκλήρωσης της επικονίασης και γονιμοποίησης. Η γονιμοποίηση που ακολουθεί την επικονίαση προϋποθέτει τη βλάστηση της γύρης, τη διείσδυση και ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα μέσα στο στυλό. Η παρουσία γονιμοποιημένων ωοθηκών

γενικά προάγει την εξέλιξη της ωοθήκης σε καρπό. Συνεπώς, η εξέλιξη της καρπόδεσης εξαρτάται από ένα ή περισσότερα θετικά σήματα που παράγονται κατά τη διάρκεια ή μετά την επικονίαση και πιθανόν μετά τη γονιμοποίηση. Τα θετικά αυτά σήματα παράγονται από τη γύρη κατά τη διάρκεια της βλάστησης και της ανάπτυξης του γυρεοσωλήνα και κατά τη διάρκεια ή μετά τη σύντηξη των πυρήνων. Οι αυξητικοί παράγοντες με τους οποίους η γύρη επηρεάζει την καρπόδεση κυρίως είναι οι γιββερελλίνες και η αυξίνη.

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

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

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης η κυτταρική διαίρεση είναι πιο έντονη στο περικάρπιο και στον πλακούντα (Varga and Bruinsma, 1986).

Στα πολύ πρώιμα στάδια της φάσης αυτής η μιτωτική δραστηριότητα είναι πιο έντονη στο εξωτερικό περικάρπιο σε σχέση με το εσωτερικό. Οι κυτταρικές διαίρεσεις στα αναπτυσσόμενα σπέρματα γίνονται κυρίως στις περιφερειακές στιβάδες των χιτώνων παρά στο έμβρυο.

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

Μετά τις κυτταρικές διαίρεσεις, η ανάπτυξη του καρπού βασίζεται στην αύξηση του κυτταρικού όγκου. Ο αριθμός και ο συγχρονισμός των κυτταρικών διαίρεσεων μπορεί να διαφέρει σημαντικά στα διάφορα είδη καρπών, αλλά και τα δύο συμβάλλουν στο τελικό του μέγεθος. Ωστόσο, στα περισσότερα φυτά η αύξηση του όγκου των κυττάρων συμβάλλει περισσότερο στο τελικό μέγεθος του καρπού (Gillaspy *et al.*, 1993). Η αύξηση του όγκου των κυττάρων συνήθως αυξάνει το



μέγεθος του καρπού κατά 100 φορές ή και περισσότερο (Coomble, 1976). Στον καρπό της τομάτας, ο όγκος των κυττάρων στον πλακούντα, στο ζελατινώδες παρέγχυμα και στο εσωτερικό περικάρπιο μπορεί να δεκαπλασιαστεί, αλλά τα κύτταρα που αποτελούν το εξωτερικό περικάρπιο επειδή συνεχίζουν να διαιρούνται αυξάνονται λιγότερο.

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

### **Ώριμος πράσινος καρπός**

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

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

### **Ωρίμανση του καρπού**

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

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

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

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

## 1.2. Η παρθενοκαρπία

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

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

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

Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρθενοκαρπία έχει μεγάλη σημασία για τις καλλιέργειες στις οποίες οι άσπερμοι καρποί παρουσιάζουν μεγάλη ζήτηση από το καταναλωτικό κοινό, όπως οι μπανάνες, εσπεριδοειδή κ.α. (Varoquaux *et al.*, 2000). Εκτός αυτού, η ζωή ενός παρθενοκαρπικού καρπού είναι μεγαλύτερη σε σχέση με έναν ένσπερμο, καθώς τα σπέρματα παράγουν ορμόνες που σταδιακά επιφέρουν τη γήρανσή του. Παρά τα πλεονεκτήματα που μπορεί να παρουσιάζει ένας άσπερμος

καρπός η χρήση του φαινομένου της παρθενοκαρπίας στη γεωργία είναι περιορισμένη.

Άλλωστε, μεταλλάξεις που δημιουργούν παρθενοκαρπικούς καρπούς συχνά παρουσιάζουν πλειοτροπικές δράσεις αλλά και συνδέονται με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά όπως αρσενική και θηλυκή στειρότητα ή μικρότερους και κακοσχηματισμένους καρπούς (Varoquaux *et al.*, 2000).

### **1.2.1 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα**

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

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

Οι Ho and Hewitt (1986) αναφέρουν μια ποικιλία από χημικές ουσίες που προάγουν την καρπόδεση παρθενοκαρπικούς καρπούς. Το 2-ναφθυλοξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε συγκεντρώσεις 40-60ppm. Επίσης, εφαρμογή βρίσκει το 2-(3-χλωροφαινόξυ) προπιονικό οξύ στα 25-40ppm μόνο για καλλιέργεια θερμοκηπίου και το N-m-τολοφθαλμικό οξύ 0.1-0.5% με καθολικό ψεκασμό όταν τα φυτά έχουν αναπτύξει 2-3 ταξικαρπίες, όπου η καθεμία έχει 2-3 ανοικτά άνθη (Thomas, 1982). Το 4-χλωροφαινόξυ-οξικό οξύ, με προτεινόμενη συγκέντρωση τα 15-50ppm (Τα 15ppm για θερμοκηπιακή καλλιέργεια), εφαρμόζεται με ψεκασμό στις ταξιανθίες κατά το άνοιγμα των ανθέων.

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

### 1.2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία

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

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

### 1.2.3 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας

Σύμφωνα με τους Ho & Hewitt (1986) η παραγωγή παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας συχνά συνοδεύεται από την εμφάνιση ανωμαλιών σε αυτούς. Για παράδειγμα καρποί δίχως σπέρματα που παράγονται κάτω από συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών (Asahira et al., 1982) αλλά και από τη χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης (Osborne & Went, 1953) συχνά εμφανίζουν δυσμορφίες. Οι Asahira et al. (1982) κατηγοριοποίησαν τους παραμορφωμένους παρθενοκαρπικούς καρπούς σε πέντε κατηγορίες, καρποί με ρυτιδώσεις/εγκολπώσεις, με σημάδια/κηλίδες στην κορυφή τους, φουσκωμένοι και κούφιοι, μαλακοί πράσινοι και με επιμηκυσμένη και αιχμηρή κορυφή.

Το νωπό βάρος των καρπών που προέρχονται από γενετική παρθενοκαρπία είναι το μισό ή τα δύο τρίτα των ένσπερμων καρπών (Mapelli et al., 1978), αν και ορισμένοι παρθενοκαρπικοί καρποί είχαν περίπου το ίδιο βάρος ή ακόμη και μεγαλύτερο (Osborne and Went, 1953). Ακόμη, το περιβάλλον και το γενετικό

υπόβαθρο μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος του καρπού. Οι Philouze and Maisonneuve (1978) παρατήρησαν πως σε ανοιξιάτικες και καλοκαιρινές καλλιέργειες, τα βάρη τόσο των άσπερμων όσο και των ένσπερμων ποικιλιών τομάτας της ποικιλίας ‘Severianin’ ήταν όμοια, στη φθινοπωρινή όμως καλλιέργεια το βάρος των άσπερμων καρπών ήταν χαρακτηριστικά μικρότερο.

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

### 1.3. Η σύσταση του καρπού της τομάτας.

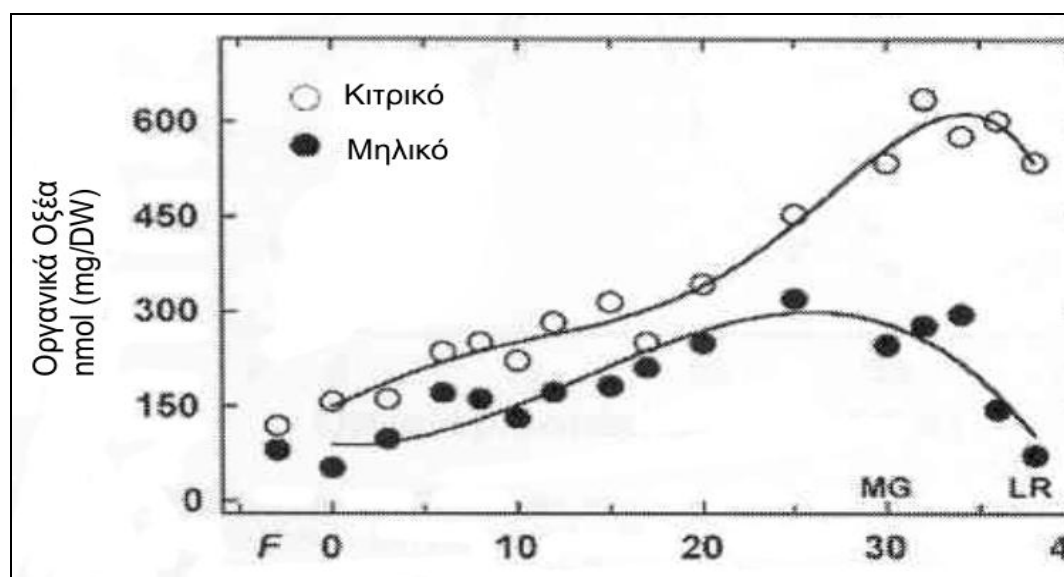
Η ξηρή ουσία του ώριμου κόκκινου καρπού της τομάτας κυμαίνεται μεταξύ 5.0 και 7.5% (Petro-Turza, 1987). Η ποσοστιαία σύνθεσή της φαίνεται στον **Πίνακα 1-1**. Τα ελεύθερα σάκχαρα είναι κυρίως αναγωγικά ενώ η συγκέντρωση της σακχαρόζης είναι μικρή. Οι πηκτίνες, αραβινογαλακτάνες, ξυλάνες, αραβινοξυλάνες, είναι οι κύριοι πολυσακχαρίτες. Το γλουταμινικό οξύ αποτελεί το 45% των ελεύθερων αμινοξέων και ακολουθεί το ασπαραγινικό οξύ.

**Πίνακας 1-1:** Η ποσοστιαία σύσταση της ξηρής ουσίας του καρπού της τομάτας (Petro-Turza, 1987).

| Συστατικό              | % επί της Ξ.Ο. | Συστατικό     | % επί της Ξ.Ο. |
|------------------------|----------------|---------------|----------------|
| Φρουκτόζη              | 25             | Πρωτεΐνες     | 8              |
| Γλυκόζη                | 22             | Κυτταρίνη     | 6              |
| Σακχαρόζη              | 1              | Ημικυτταρίνες | 4              |
| Κιτρικό οξύ            | 9              | Ανόργανα      | 8              |
| Μηλικό οξύ             | 4              | Λιπίδια       | 2              |
| Δικαρβοξυλικά αμινοξέα | 2              | Ασκορβικό οξύ | 0.5            |
| Πηκτινικές ύλες        | 7              | Πτητικά       | 0.1            |

### 1.3.1 Τα οξέα του καρπού της τομάτας

Ο καρπός της τομάτας όπως και άλλοι σαρκώδεις καρποί χαρακτηρίζονται από τη συσσώρευση κιτρικού και μηλικού οξέος (Hobson & Davies, 1971; Gould, 1983). Η μέγιστη συγκέντρωση οργανικών οξέων έχει βρεθεί στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος όπου τα οργανικά οξέα αποτελούν το 15% της ξηρής ουσίας του καρπού που βρίσκεται στα επίπεδα μεταξύ 5 και 7,5% του νωπού βάρους (Petro-Turza, 1987). Η αναλογία σακχάρων προς οξέα στον καρπό είναι επίσης ένας σημαντικός ποιοτικός παράγοντας, που καθορίζει τη γεύση ενός ώριμου σαρκώδους καρπού (Rhodes, 1980). Η αναλογία αυτή εξαρτάται από τη δραστηριότητα των ενζύμων και την αλληλεπίδραση του μεταβολισμού των υδατανθράκων και των οξέων (Ruffner *et al.*, 1982). Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων αυτών αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού από την καρπόδεση μέχρι το στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, οπότε φτάνει μέχρι και 13% της ξηράς ουσίας του καρπού, συμβάλλοντας σημαντικά μαζί με τα πτητικά στη γεύση του καρπού (Grierson and Kadar, 1986; Guillet *et al.*, 2002).



Εικόνα 1-3: Η συσσώρευση μηλικού και κιτρικού οξέος κατά την ανάπτυξη του καρπού της τομάτας. (από Davies and Hobson, 1981)

Η πλειοψηφία των μελετών των σχετικών με τον καρπό της τομάτας, έχουν γίνει στο περικάρπιο επειδή αυτό αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του καρπού. Και παρόλο που με την ανάλυση του ιστού αυτού έχουν εξαχθεί σημαντικά συμπεράσματα, είναι πλέον αποδεκτό ότι ο μεταβολισμός στο περικάρπιο είναι διαφορετικός από ότι στον πλακούντα ή στο ζελατινώδες παρέγχυμα και στην columella, που είναι ένας ιστός ο

οποίος εξελίσσεται σε πλακούντα και ζελατινώδες παρέγχυμα. (Obiadalla-Ali *et al.*, 2004; Baxter *et al.*, 2005). Οι διαφορές αυτές δεν αφορούν μόνο στις διαφορετικές συγκεντρώσεις των σακχάρων και του αμύλου αλλά και στις διαφορές μεταξύ των ιστών στις δραστηριότητες των ενζύμων της γλυκόλυσης, του κύκλου του Krebs και της υδρόλυσης της σακχαρόζης (Obiadalla-Ali *et al.*, 2004).

Η περιεκτικότητα των οργανικών οξέων είναι υψηλότερη στο ζελατινώδες παρέγχυμα απ' ό τι στο περικάρπιο και στους ιστούς του πλακούντα (Carangal *et al.*, 1954; Davies, 1966).

Κατά την ωρίμανση του καρπού της τομάτας πραγματοποιείται μια μετάβαση από φωτοσυνθετικό σε ετερότροφο μεταβολισμό με την παράλληλη διαφοροποίηση των χλωροπλαστών σε χρωμοπλάστες και την κυριαρχία των καροτενοειδών και του λυκοπενίου.

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης ο καρπός μαλακώνει, τα οργανικά οξέα μειώνονται (**Εικόνα 1-3**) και αυξάνεται δραματικά η αναπνοή των καρπών που σηματοδοτεί τους κλιμακτηριακούς καρπούς (Davies *et al.*, 1981). Η καρβοξυκινάση του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) είναι δυνατόν να εμπλέκεται στο μεταβολισμό του μηλικού και προς την κατεύθυνση της γλυκονεογένεσης με τη χρήση του παραγόμενου φωσφοροενολοπυροσταφυλικού (Ruffner & Kliwer, 1975; Ruffner, 1982; Knee & Finger, 1992). Επίσης, η σύνθεση των οργανικών οξέων μπορεί επίσης να μειώνεται ως αποτέλεσμα της μείωσης της δραστηριότητας της καρβοξυλάσης του φωσφοενολοπυροσταφυλικού (Hawker 1969) και παρεμπόδιση της γλυκόλυσης (Ruffner & Hawker, 1977). Εξάλλου, είναι δυνατόν να συμβαίνει καταβολισμός των οργανικών οξέων μέσω των μηλικών αφυδρογονασών και του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων (Ruffner *et al.*, 1984).

#### **1.4. Η καρβοξυκινάση του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού οξέος**

Η PEPCK των φυτών (EC 4.1.1.49) καταλύει την εξαρτώμενη από το ATP αντιστρεπτή αποκαρβοξυλίωση του οξαλοξικού οξέος και παράγει PEP και CO<sub>2</sub>, σε μια αντίδραση που απαιτεί Mn<sup>2+</sup>:



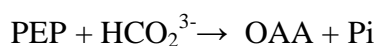
Στους ζωικούς οργανισμούς αυτή η αντίδραση καθορίζει την ταχύτητα της γλυκονεογένεσης. Η γλυκόζη στο αίμα διατηρείται σε ορισμένα επίπεδα εν μέρει εξαιτίας της ρύθμισης της έκφρασης της PEPCK. Υπερέκφραση του ενζύμου στα



ποντίκια καταλήγει στην εμφάνιση συμπτωμάτων τύπου II του διαβήτη που είναι ο πιο κοινός τύπος διαβήτη στον άνθρωπο. Εξαιτίας της σπουδαιότητας της ομοιόστασης της γλυκόζης στο αίμα, ορισμένες ορμόνες ρυθμίζουν μια ομάδα γονιδίων στο συκώτι (συμπεριλαμβανομένης και της PEPCK) τα οποία ρυθμίζουν το ρυθμό της σύνθεσης της γλυκόζης.

Οι Matte *et al.* (1997) αναφέρουν ότι η μετατροπή του οξαλοξικού σε PEP είναι διαδικασία δύο βημάτων που προϋποθέτει την αποκαρβοξυλίωση του οξαλοξικού ώστε να παραχθεί ενολοπυροσταφυλικό ανιόν στο οποίο μεταφέρεται γ-φωσφορική ομάδα από το ATP . Μια αργινίνη (Arg-333 στο βακτήριο *E. coli*) φαίνεται να σταθεροποιεί το ανιόν (Matte *et al.*, 1997) και μια λυσίνη (Lys-256 στο βακτήριο *Saccharomyces cerevisiae*) εμπλέκεται στη μεταφορά της φωσφορικής ομάδας (Krautwurst *et al.*, 1998).

Η ισορροπία ευνοεί την αποκαρβοξυλίωση και έτσι το ένζυμο λειτουργεί αντίστροφα από την καρβοξυλίωση του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού (PEPC, EC 4.1.1.31) που καταλύει τη σύνθεση του οξαλοξικού σύμφωνα με την αντίδραση:



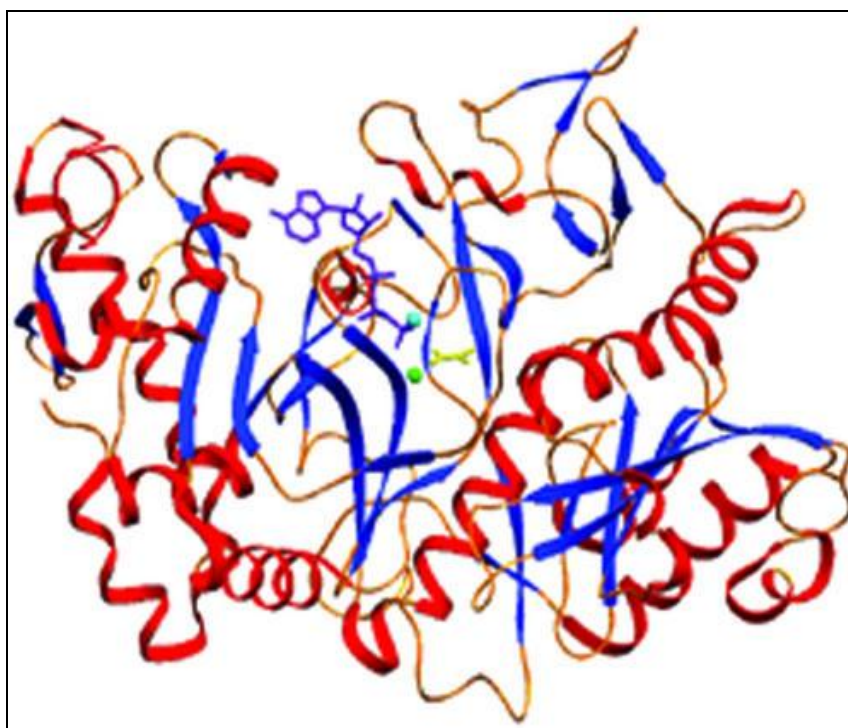
Η PEPCK, όπως προαναφέρθηκε, εμπλέκεται στη γλυκονεογένεση και σε αναπληρωτικές δράσεις μεγάλου εύρους διαφορετικών οργανισμών. Επιπλέον είναι ευνόητο ότι τα ένζυμα PEPCK και PEPC σχηματίζουν μεταβολικό κόμβο μεταξύ του οξαλοξικού και της οικογένειας των αμινοξέων που παράγονται από το ασπαραγινικό δηλαδή την ασπαραγίνη, τη λυσίνη, τη θρεονίνη, τη μεθειονίνη και την ισολευκίνη (Azevedo *et al.*, 1997), όπως επίσης και της οικογένεια των αμινοξέων που προέρχονται από το PEP δηλαδή της φαινυλαλανίνης, της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης (Schmid & Amrhein, 1999).

Κατά τη βλάστηση των ελαιούχων τα λιπίδια μεταβολίζονται μέσω β-οξειδωσης και του κύκλου του γλυοξυλικού οξέος, και σχηματίζεται μηλικό και οξαλοξικό οξύ. Η σακχαρόζη συντίθεται από PEP με τα ένζυμα της γλυκονεογένεσης που βρίσκονται στο κυτόπλασμα των σπερμάτων (Leegood & ap Rees, 1978; Nishimura & Beevers, 1979). Χρησιμοποιώντας 3-μερκαπτοπικολινικό οξύ ως παρεμποδιστή της PEPCK, οι Trevanion *et al.* (1995) ακολούθησαν την ενσωμάτωση του σημασμένου <sup>14</sup>C-οξικού στα διαλυτά σάκχαρα του βλαστάνοντος σπέρματος. Έδειξαν λοιπόν ότι ο παρεμποδιστής μείωνε τη γλυκονεογένεση από 37 έως 95%.

### 1.4.1 Δομή του ενζύμου

Ο Burnell (1986) έδειξε ότι το ένζυμο είναι εξαμερής πρωτεΐνη με υπομονάδες μοριακού βάρους 64 kD, που είναι μικρότερο από εκείνο της ζωϊκής πρωτεΐνης, αλλά είναι παρόμοιο ή ελάχιστα μεγαλύτερο από την PEPCK των ζυμών (Tortora *et al.*, 1985), του *Escherichia coli* (50-55kD) (Goldie & Sanwal, 1980), του *Rhizobium* (58kD) (Ostergts *et al.*, 1991) και του *Trypanosoma brucei* (60kD) (Kueng *et al.*, 1989).

Οι Trapani *et al.* (2001) ανέλυσαν την κρυσταλλική δομή του ανασυνδυασμένου ενζύμου PEPCK του παρασίτου *Trypanosoma cruzi* σε ανάλυση 2.0Å και σύγκριναν τη δομή του ενζύμου με την ήδη γνωστή κρυσταλλική δομή του μονομερούς ενζύμου PEPCK του βακτηρίου *Escherichia coli*. Η διμερής δομή έχει 2 συμμετρικές αναδιπλώσεις, με το κάθε μονομερές να έχει σε μεγάλο βαθμό ομοιότητα με τη μονομερή δομή του PEPCK του *E. coli*. Κάθε μονομερές αναδιπλώνεται σε δύο πεδία και το ενεργό κέντρο βρίσκεται σε βαθιά σχισμή μεταξύ των πεδίων. Τα δύο ενεργά κέντρα του διμερούς ενζύμου βρίσκονται απομακρυσμένα και φαίνεται ότι επιτρέπουν ανεξάρτητη πρόσβαση του υποστρώματος.



**Εικόνα 1-4:** Η δευτεροταγής και τριτοταγής δομή της PEPCK του *E.coli*. Οι έλικες είναι κόκκινες, οι δομές πτυχωτής διάταξης μπλε, η μικρή γαλάζια σφαίρα είναι ιόν  $Mg^{2+}$  και η πράσινη ιόν  $Ca^{2+}$ , το ATP είναι μωβ και το πυροσταφυλικό οξύ κίτρινο (Sudom *et al.*, 2003).

#### 1.4.2 Η Φωσφορυλίωση του ενζύμου.

Από κοτυληδόνες αγγουριού απομονώθηκε κλώνος cDNA που κωδικοποιεί πεπτιδίο PEPCK μοριακού βάρους 74kD, της οποίας η ακολουθία αμινοξέων ήταν κατά 43%, 49% και 57% όμοια με το ένζυμο βακτηρίου, ζύμης και τρυπανοσώματος. Η έκφραση του ενζύμου αυξήθηκε 2–3 μέρες μετά την εκκίνηση της βλάστησης μαζί με τα ένζυμα του κύκλου του γλυκοζυλικού οξέος (Kim & Smith, 1994). Το περίεργο ήταν ότι το πεπτιδίο ήταν πολύ μεγαλύτερο από τα άλλα ένζυμα που είχαν καθαριστεί από φυτικούς ιστούς λόγω της παρουσίας ενός αμινοτελικού άκρου μοριακού βάρους 12 kD (Kim & Smith, 1994). Όταν οι Walker & Leegood (1995) καθάρισαν PEPCK από κοτυληδόνες αγγουριού το μοριακό βάρος βρέθηκε 62kD. Εάν οι κοτυληδόνες του αγγουριού εκχυλίζονταν παρουσία SDS και υψηλό pH, απομονωνόταν μια πρωτεΐνη 74kD. Η πρωτεΐνη μετά από την ηλεκτρομεταφορά της σε νιτροκυτταρίνη, βρέθηκε ότι είχε μοριακό βάρος 62kD εξαιτίας γρήγορης πρωτεόλυσης, γεγονός που δεν είχε επίδραση στην ενζυμική δραστηριότητα. Επινόησαν λοιπόν μια γρήγορη διαδικασία καθαρισμού για το ένζυμο PEPCK του αγγουριού που επέτρεψε την απομόνωση ενός φυσικού ενζύμου με υπομονάδες μοριακού βάρους 74 kDa. Επώαση του καθαρισμένου ενζύμου με την cAMP εξαρτώμενη κινάση θηλαστικού, ή την PEP καρβοξυλάση κινάση καλαμποκιού και [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP οδήγησε σε ενσωμάτωση  $^{32}$ P σε ένα τμήμα του πολυπεπτιδίου που είχε διαχωριστεί κατά την πρωτεόλυση. Αυτή η φωσφορυλίωση αντιστράφηκε με επώαση με την πρωτεΐνη φωσφατάση 2A. Όταν τροφοδότησαν τις κοτυληδόνες αγγουριού με  $^{32}$ P in vitro στο σκοτάδι, η PEPCK ήταν ένα από τα πέντε βασικά πολυπεπτιδία που περιείχαν  $^{32}$ P και αυτό αντιστρεφόταν μετά από φωτισμό. Οι Walker & Leegood (1996) κατέδειξαν ότι η PEPCK από διάφορα φυτικά είδη φωσφορυλιώνεται επίσης στο σκοτάδι.

Έρευνα της ακολουθίας της PEPCK αγγουριού (Kim & Smith, 1994), αποκάλυψε δύο πιθανά σημεία φωσφορυλίωσης στην αμινοτελική περιοχή. Το πρώτο (κατάλοιπα 42–51, ICHDDSTTPM) σχηματίζει μια ακολουθία που αναγνωρίζεται από τις κινάσες SNF-1. Αυτές οι κινάσες θεωρούνται ρυθμιστές ενζύμων–κλειδιών των φυτών, συμπεριλαμβανομένων της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης και της νιτρικής αναγωγής (Halford & Hardie, 1998). Το δεύτερο πιθανό σημείο φωσφορυλίωσης (κατάλοιπα 64–69, KKRSTP) εμφανίζει ομολογία με τα σημεία πρόσδεσης με ρυθμιστικές πρωτεΐνες της οικογένειας 14-3-3 (Muslin *et al.*, 1996). Οι 14-3-3 ρυθμιστικές πρωτεΐνες ρυθμίζουν ένα εύρος φυτικών ενζύμων,

συμπεριλαμβανομένων της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης, της νιτρικής αναγωγής και συνθετάση του γλουταμινικού (Moorhead *et al.*, 1999). Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η φωσφορυλίωση της PEPCK παρατηρείται μόνο σε φυτά και η πρόσθετη αμινοτελική ακολουθία δεν βρέθηκε στην πρωτεΐνη που απομονώθηκε από άλλους οργανισμούς. Η PEPCK έχει απαιτεί την παρουσία  $Mn^{2+}$  και έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζεται από συγκεντρώσεις  $Mg^{2+}$  της τάξεως του mM (Burnell, 1986).

Οι Walker *et al.* (2000), βελτιστοποίησαν τις συνθήκες δοκιμών ώστε για πρώτη φορά μετρήθηκε η δραστικότητα της PEPCK σε συνθήκες όμοιες περίπου του κυτταροπλάσματος. Αυτές οι συνθήκες επέτρεψαν την ανίχνευση νέων τροποποιητών της ενζυμικής δραστικότητας καθώς και την επίδραση της φωσφορυλίωσης και αποφωσφορυλίωσης στην κινητική του ενζύμου. Η απόκριση της PEPCK στα υποστρώματα της PEP και OAA, εξαρτάται ισχυρά από την αδενυλική αναλογία και αλλάζει με την κατάσταση φωσφορυλίωσης. Η δραστικότητα του ενζύμου σε συνθήκες φωτός ή σκότους μεγιστοποιείται όταν ο λόγος ATP/ADP είναι υψηλός, ακόμα και προς στην κατεύθυνση της καρβοξυλίωσης. Αυτές οι αλλαγές στις ιδιότητες της PEPCK έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση της κατάστασης δραστικότητας του ενζύμου σε ακατέργαστα εκχυλίσματα φύλλων C4 και CAM φυτών.

### 1.4.3 Ο ρόλος της PEPCK στη Φωτοσύνθεση

Σημαντικό στοιχείο της C4 φωτοσύνθεσης είναι η αποκαρβοξυλίωση ενός οξέος C4 στον παρεγχυματικό κολεό των ηθμαγγειωδών δεσμίδων όπου υπάρχει η Rubisco, με σκοπό να αυξηθεί η συγκέντρωση  $CO_2$  (Leegood, 1997). Μέχρι πρόσφατα τα C4 φυτά θα μπορούσαν να διαχωριστούν σε τρεις τύπους βάσει της αντίδρασης αποκαρβοξυλίωσης, (1) ένζυμο μηλική NADP, (2) ένζυμο μηλική NAD και (3) PEPCK (Agostino *et al.*, 1996; Leegood, 1997).

Η PEPCK καθарίστηκε σε ομοιογενές ένζυμο σε μια ποικιλία φυτών C4 (Burnell, 1986; Arnelle & O'Leary, 1992). Η σταθερά Michaelis- Menten Km για το OAA είναι 12–25μM και για το ATP, 16–25μM. Η ενζυμική δραστικότητα της πρωτεΐνης PEPCK που προϋποθέτει μερική πρωτεόλυση, παρεμποδίστηκε από 3-φωσφορογλυκερικό, από την 6-φωσφοροφρουκτόζη, από την 1,6-διφωσφοροφρουκτόζη και από την φωσφορική διυδροξυακετόνη σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1–5mM (Burnell 1986).

Αρχικές μελέτες με PEPCK απομονωμένη από C4 φυτά έδειξε ότι τα καθαρά ένζυμα είχαν μια υπομονάδα μοριακού βάρους 62–64 kD (Burnell, 1986). Σε μια σειρά πειραμάτων, όμως, με χρήση υψηλού pH, με παρεμποδιστές πρωτεασών και 1% SDS στο διάλυμα εκχύλισης, οι Walker *et al.* (1997) έδειξαν ότι η υπομονάδα του ενζύμου PEPCK που απομονώθηκε από είδη C4 είχε μοριακό βάρος 67–71 kD και μία αμινοτελική ακολουθία χανόταν κατά την απομόνωση και τον καθαρισμό του ενζύμου. Η παρουσία αυτής της αμινοτελικής ακολουθίας επέτρεπε στο ένζυμο που απομονώθηκε στα δύο από τα πέντε είδη φυτών C4, να φωσφορυλιώνονται στο σκοτάδι αλλά όχι στο φως (Walker & Leegood, 1996). Ο λόγος για τις διαφορές στη φωσφορυλίωση της PEPCK στα φυτά που έχουν τους ίδιους μηχανισμούς C4 φωτοσύνθεσης δεν είναι ξεκάθαρος, παρόλα αυτά μη φωσφορυλιωμένα ένζυμα στερούνται το υποθετικό μοτίβο φωσφορυλίωσης KKRST. Είναι πιθανό τα ένζυμα PEPCK και PEPC να βρίσκονται σε διαφορετικά είδη κυττάρων στα φυτά C4, και δεν υπάρχει εξελικτική πίεση να διατηρήσουν τη θέση φωσφορυλίωσης (Walker & Leegood, 1996; Leegood *et al.*, 1999).

Η ταξινόμηση των τριών τύπων C4 φωτοσύνθεσης δεν είναι αυστηρή. Αρχικά θεωρούνταν ότι ο αραβόσιτος δεν περιείχε PEPCK, και ότι όλα τα C4 οξέα αποκαρβοξυλιώνονταν μέσω της μηλικής αφυδρογονάσης που εξαρτάται από το NADP. Οι Walker *et al.* (1997) όμως ανίχνευσαν το ένζυμο PEPCK σε αραβόσιτο και στο *Digitaria sanguinalis*, που είχε μοριακό βάρος 74 kD, αλλά δεν ήταν φωσφορυλιωμένο. Αντίθετα, η πρωτεΐνη PEPCK δεν ανιχνεύθηκε σε κάποια άλλα C4 φυτά όπως το σόργο και το ζαχαροκάλαμο. Σε μια πιο λεπτομερή ανάλυση, οι Wingler *et al.* (1999) επιβεβαίωσαν την παρουσία της PEPCK στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού του αραβοσίτου και έδειξαν ότι η PEPCK καταλύει την αποκαρβοξυλίωση του οξαλοξικού οξέος που προέρχεται από το ασπαραγγινικό. Ο Kellog (1999), σε μία ενδιαφέρουσα αναφορά για την εξέλιξη της φωτοσύνθεσης διατείνεται ότι υπάρχουν μόνο δύο βιοχημικά μονοπάτια φωτοσύνθεσης C4 που απαιτούν είτε το ένζυμο μηλικό NAD είτε το ένζυμο μηλικό NADP. Και των δύο αυτών ενζύμων οι δράσεις μπορούν να συμπληρωθούν από την παρουσία της PEPCK.

Η πλήρης cDNA ακολουθία του γονιδίου που κωδικοποιεί την PEPCK του C4 φυτού *Urochloa panicoides* δημοσιεύθηκε από τους Finnegan & Burnell (1995) και παρουσιάστηκαν αποδείξεις για την ύπαρξη μιας πολυγονιδιακής οικογένειας. Σε

επόμενη μελέτη τους, οι Finnegan *et al.* (1999) έδειξαν ότι υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα γονίδια που κωδικοποιούν την PEPCK στο είδος *Urochloa panicoides*. Δύο από τα γονίδια PCK1 και PCK2 κωδικοποιούν υπομονάδες με αμινοξική ακολουθία κατά 96% ταυτόσημη και εκφράστηκαν με έναν φωτοεξαρτώμενο τρόπο στα φύλλα, προτείνοντας ότι εμπλέκονται στην φωτοσύνθεση C4. Τα δύο άλλα γονίδια PCK3 και PCK4 εκφράστηκαν κυρίως στις ρίζες (Finnegan *et al.*, 1999). Στο αγγούρι φαίνεται να υπάρχει μόνο ένα γονίδιο που κωδικοποιεί την PEPCK (Kim & Smith, 1994). Επίσης ένας κλώνος cDNA που κωδικοποιεί την PEPCK απομονώθηκε και στον αραβόσιτο (Furomoto *et al.*, 1999). Το γονίδιο εκφράστηκε στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού, επιβεβαιώνοντας την παρουσία της πρωτεΐνης (Walker *et al.*, 1997; Wingler *et al.*, 1999). Τα επίπεδα των μεταγραφημάτων mRNA ήταν υψηλότερα κατά τη διάρκεια της ημέρας σε νεαρούς σπόρους, αλλά κατά την ημέρα μειωνόταν σε φυτά μεγαλύτερης ηλικίας. Από την ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της PEPCK από τον αραβόσιτο στο *E. coli*, απομονώθηκαν μερικά υδρολυμένα και άθικτα πολυπεπτίδια. Τα άθικτα πολυπεπτίδια είχαν υποστεί φωσφορυλίωση από μια κίνηση cAMP θηλαστικού και ήταν λιγότερο ευαίσθητα σε παρεμπόδιση από το 3-φωσφορογλυκερινικό (Furomoto *et al.*, 1999).

#### 1.4.4 Μεταβολισμός CAM

Ο μεταβολισμός CAM προϋποθέτει την πρόσληψη CO<sub>2</sub> μέσω των στοματίων κατά τη διάρκεια της νύχτας και αφομοίωση μέσω της δράσης της καρβοξυλάσης του PEP σε οργανικά οξέα C<sub>4</sub>, από τα οποία το μηλικό κυριαρχεί. Το φωτοσυνθετικό μονοπάτι συχνά προκαλείται από καταπόνηση ξηρασίας (Cushman & Bohnert, 1997). Κατά τη διάρκεια της ημέρας τα οξέα C<sub>4</sub> αποκαρβοξυλιώνονται και δίνουν CO<sub>2</sub> που αφομοιώνεται από τη Rubisco και το φωτοσυνθετικό κύκλο του Calvin (Osmond *et al.*, 1999). Τα φυτά CAM μπορούν να διαχωριστούν με ανάλογο τρόπο των φυτών C<sub>4</sub>, εξαρτώμενα από το εάν χρησιμοποιούν PEPCK ή μηλικά ένζυμα στην αντίδραση αποκαρβοξυλίωσης. Περαιτέρω διαχωρισμός εξαρτάται από τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την αποθήκευση υδατανθράκων κατά τη διάρκεια της ημέρας, που μπορεί να είναι άμυλο και πολυσακχαρίτες στους χλωροπλάστες, ή διαλυτά σάκχαρα και πολυσακχαρίτες στα εξωχλωροπλαστικά κυτταρικά διαμερίσματα (Christopher & Holtum, 1996; 1998; Osmond *et al.*, 1999). Σε διάφορα είδη του γένους *Clusia*, η δραστηριότητα της PEPCK αυξανόταν ως απόκριση σε καταπόνηση

ξηρασίας σε νεαρά και ώριμα φύλλα. Τεχνικές ανοσοεντοπισμού έδειξαν ότι σε φύλλα καλά ποτισμένων *Clusia aripoensis*, η ΡΕΡСK εντοπίστηκε μόνο γύρω από τους γαλακτοφόρους αγωγούς. Ενώ στα CAM είδη, το ένζυμο ΡΕΡСK εντοπίστηκε, μαζί με τη Rubisco και την καρβοξυλάση του ΡΕΡ, στο πασσαλώδες και σπογγώδες παρέγχυμα (Borland *et al.*, 1998).

Η ΡΕΡСK που απομονώθηκε από φύλλα φυτικών ειδών CAM φαίνεται ότι φωσφορυλιώνεται (Walker & Leegood, 1996), κάτι το οποίο, όπως προαναφέρθηκε, δεν συμβαίνει στα C4 φυτά. Τα φυτά CAM στα οποία η ΡΕΡСK και η καρβοξυλάση του ΡΕΡ εντοπίζονται στο κυτόπλασμα των ίδιων κυττάρων (Borland *et al.*, 1998) έχουν διατηρήσει τις απαιτήσεις για μια σειρά φωσφορυλιώσεων, που πάλι εντοπίζονται στο αμινοτελικό πρωτεολυτικά διαχωριζόμενο τμήμα της πρωτεΐνης. Στα φύλλα του είδους *Tillandsia fasciculata*, η ΡΕΡСK αποφωσφορυλιώνεται το απόγευμα και φωσφορυλιώνεται ξανά τη νύχτα, με έναν παρόμοιο τρόπο των φυτών C4 (Walker & Leegood, 1996), κάτι το οποίο συμφωνεί με τη δράση του ενζύμου ως αποκαρβοξυλάση κατά τη διάρκεια της ημέρας.

Και στους δύο τύπους φωτοσύνθεσης C4 και CAM, το υπεύθυνο ένζυμο για την αρχική αφομοίωση του CO<sub>2</sub> είναι η ΡΕΡСK. Οι Reiskind & Bowes (1991) έδειξαν ότι στο θαλάσσιο πράσινο φύκος *Udotea flabellum*, όταν η ΡΕΡСK παρεμποδίστηκε από 3-μερκαπτοπικολινικό οξύ, παρατηρήθηκε δραματική μείωση της φωτοσύνθεσης.

#### 1.4.5 Γονίδια που κωδικοποιούν την ΡΕΡСK

Ένα μόνο γονίδιο έχει χαρακτηριστεί στο αγγούρι (Kim & Smith, 1994) στα είδη *Spartina anglica*, *Zoysia japonica* και στον αραβόσιτο (Furomoto *et al.*, 1999). Αντίθετα, μια μικρή πολυγονιδιακή οικογένεια έχει αναφερθεί σε διάφορα είδη. Στο *Urochloa panicoides* δύο ισότυποι του γονιδίου εκφράζονται κυρίως στα φύλλα και δύο ισότυποι κυρίως στη ρίζα (Finnegan & Burnell, 1995). Το είδος *Brassica napus* και τα γονεϊκά τους γονιδιώματα *B.oleraceae* και *B.campestris* περιέχουν ισότυπους του γονιδίου με υψηλή ομολογία (Saez-Vasquez *et al.*, 1995). Τέλος στο *Arabidopsis* από την ανάλυση του γονιδιώματος έχουν βρεθεί τρία πυρηνικά γονίδια που παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με γονίδια που κωδικοποιούν την ΡΕΡСK (Mayer *et al.*, 1999), δύο εκ των οποίων εκφράζονται.

Στην τομάτα μέχρι τώρα έχει χαρακτηριστεί ένας μόνο κλώνος της PEPCK (Walker *et al.*, 1999; Leegood & Walker, 2003) που κωδικοποιεί ένζυμο το οποίο εντοπίζεται στο κυτταρόπλασμα.

### **1.5. Εντοπισμός του ενζύμου**

Η PEPCK έχει εντοπιστεί στα τριχώματα του φύλλου του καπνού και του αγγουριού και αναφέρεται ότι συμμετέχει και σε αντιδράσεις άμυνας του φυτού (Hausler *et al.*, 2002). Επίσης έχει απομονωθεί ένας κλώνος cDNA που κωδικοποιεί την PEPCK, από τα φύλλα του αραβοσίτου και εντοπίζεται στα κύτταρα του περιδεσμικού κολεού (Furumoto *et al.*, 1999).

Παρόλο που ο ρόλος της PEPCK στην κατάλυση της γλυκονογένεσης από λιπίδια σε σάκχαρα κατά τη διάρκεια της βλάστησης των ελαιούχων σπερμάτων είναι γνωστή εδώ και χρόνια (Benedict & Beevers 1961; Leegood & ap Rees 1978), οι Walker *et al.* (1999) κατέδειξαν ότι την παρουσία της PEPCK σε εκχυλίσματα αναπτυσσόμενων σπερμάτων της τομάτας, ίριδας, του μπιζελιού και του σταφυλιού. Στο σταφύλι η μέγιστη ποσότητα της πρωτεΐνης συμπίπτει με την αφθονία των ενζύμων που συμμετέχουν στην εναπόθεση αποθησαυριστικών ουσιών όπως λιπίδια και αποθησαυριστικές πρωτεΐνες. Ακολουθούνται από διάφορα ένζυμα όπως οι αμινιτρανσφεράσες και αφυδρογονάση του γλουταμινικού που είναι πιθανό να συμμετέχουν στο μεταβολισμό των εισερχόμενων αμινοξέων για την πρωτεϊνική σύνθεση.

Στους κλιμακτηριακούς καρπούς, η δραστηριότητα της PEPCK μπορεί να ανιχνευθεί μόνο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, και στην τομάτα εντοπίζεται στο παρεγγύμα του περικαρπίου (Bahrami *et al.*, 2001).

Στους μη κλιμακτηριακούς καρπούς, όπως το σταφύλι και το κεράσι, η δραστηριότητα της PEPCK ήταν παρούσα καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης. Καθώς πολλοί καρποί συσσωρεύουν υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών οξέων, που μειώνονται κατά τη διαδικασία της ωρίμανσης, είναι πιθανό η PEPCK μαζί με το μηλικό ένζυμο να εμπλέκεται στον καταβολισμό τους (Knee & Finger, 1992; Kanellis & Roubelakis-Angelakis, 1993). Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του σταφυλιού, όλα τα παρεγγυματικά κύτταρα του περικαρπίου περιέχουν κρυσταλλικές ουσίες (πιθανόν οργανικά οξέα), που σταδιακά εξαφανίζονται καθώς τα σταφύλια



αναπτύσσονται (Fillion *et al.*, 1999; Famiani *et al.*, 2000), ενώ η δραστηριότητα των PEPCK και της μηλικής NADP αυξάνεται. Καθώς η δραστηριότητα της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης επίσης αυξάνεται κατά την ωρίμανση του σταφυλιού (Hawker, 1969) και της τομάτας (Dali *et al.*, 1992), είναι πιθανόν άνθρακας να μεταφέρεται από τα οργανικά οξέα μέσω της γλυκονεογένεσης και να παράγει φωσφοεξόζη που απαιτείται για τη σύνθεση σακχαρόζης (Leegood & Walker, 1999).

Οι Walker *et al.* (1999) ήταν σε θέση να ανιχνεύσουν τη δραστηριότητα της PEPCK και την πρωτεΐνη της σε ένα εύρος αναπτυσσόμενων σπερμάτων συμπεριλαμβανομένων του σταφυλιού, του *Lilium*, του αρακά και της τομάτας. Στο σταφύλι, η ποσότητα της πρωτεΐνης της PEPCK αυξήθηκε σταδιακά με τη μέγιστη δραστηριότητά της να συμπίπτει με τη μέγιστη δραστηριότητα των ενζύμων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό των αμινοξέων και τη συσσώρευση των πρωτεϊνών στο σπέρμα. Ο ανοσοεντοπισμός της PEPCK στο σταφύλι έδειξε ότι το ένζυμο βρίσκεται σε ιστούς που συμμετέχουν στη μεταφορά αφομοιώσιμων ουσιών στο αναπτυσσόμενο σπέρμα. Η πρωτεΐνη PEPCK εντοπίστηκε έντονα στην περιοχή της χάλαζας και στα πασσαλώδη κύτταρα του περισπερμίου. Παρόλο που η σημασία της χάλαζας και του πασσαλώδους παρεγχύματος δεν είναι προφανής, η μείωση της δραστηριότητας της PEPCK συμπίπτει με την μείωση της παρουσίας της πρωτεΐνης στη χάλαζα. Οι Walker *et al.* (1999) πρότειναν ότι οι αφομοιώσιμες ουσίες διαχέονται από τα πασσαλώδη κύτταρα μέσω των πλασμοδεσμάτων και μετά μπαίνουν στο νούκελλο μέσω των κυττάρων μεταφοράς, πραγματοποιώντας τη συντονισμένη διανομή που απαντά στη ζήτηση του αναπτυσσόμενου ενδοσπερμίου. Ο εμπλουτισμός της PEPCK και άλλων ενζύμων του μεταβολισμού των σακχάρων και των αμινοξέων, καθώς και των αμινοξέων στο πασσαλώδες στρώμα μπορεί να σημαίνει ότι λαμβάνει χώρα αξιοσημείωτος μεταβολισμός σε αυτή τη στρώση κυττάρων. Η δραστηριότητα της PEPCK και η ποσότητα της πρωτεΐνης σε 20 ημερών σπέρματα σταφυλιών αυξήθηκε 100 φορές μετά από την επώασή τους σε ασπαραγίνη μόνο επτά φορές μετά από την επώαση με αμμωνιακά διαλύματα και μόνο τρεις φορές με γλουταμίνη. Σε αντίθεση δεν υπήρχε αλλαγή στην αφθονία της καρβοξυλάσης του PEP, της μηλικής NADP, της συνθετάσης της γλουταμίνης ή της κυτταροπλασματικής αμινοτρανσφεράσης του ασπαρτικού. Η μεγάλη επαγωγή της PEPCK από την ασπαραγίνη συμπίπτει με αύξηση της δραστηριότητας της ασπαραγινάσης όπως ανιχνεύτηκε σε κοτυληδόνες σόγιας (Tonin & Sodek, 1990).

Η ερώτηση κλειδί είναι ποιά είναι η σχέση μεταξύ του μεταβολισμού της ασπαραγίνης και της PEPCK. Τα αμιδιά της ασπαραγίνης μεταβολίζονται σε αμμωνία, που πρέπει να αφομοιώνονται μέσω του κύκλου σύνθεσης του γλουταμινικού, που προϋποθέτει την καθαρή σύνθεση 2-οξογλουταρικό (Ireland & Lea, 1999; Lea & Ireland, 1999). Η αμινομάδα του ασπαραγινικού θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση της λυσίνης, θρεονίνης, μεθειονίνης ή ισολευκίνης (Azevedo *et al.*, 1997) ή θα μπορούσε να τρανσαμινωθεί σε 2-οξογλουταρικό να αποδώσει γλουταμινικό και οξαλοξικό οξύ ΟΑΑ. Υπάρχει λοιπόν απαίτηση για 2-οξογλουταρικό, που μπορεί να συντεθεί από κιτρικό στον τρικαρβοξυλικό κύκλο δεδομένου του εφοδιασμού με πυροσταφυλικό ή ακέτυλο-CoA. Είναι λοιπόν πιθανό η πρωτεΐνη PEPCK να έχει έναν αναπληρωτικό ρόλο να εφοδιάζει με φωσφοροενολο-πυροσταφυλικό (PEP) και επομένως πυροσταφυλικό.

Είναι επίσης πιθανό η PEPCK να παίζει ρόλο στη διατήρηση του pH στο κυτόπλασμα ακολουθώντας την αφομοίωση της αμμωνίας που ελευθερώνεται από την ασπαραγίνη (Raven, 1988).

### **Ηθμός**

Το ένζυμο PEPCK συχνά φαίνεται να σχετίζεται με τον ηθμό. Στα σταφύλια και στα σπέρματα αμπέλου η πρωτεΐνη είναι παρούσα σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης (Walker *et al.*, 1999). Η PEPCK είναι επίσης παρούσα στον ηθμό αγγουριού, *Coleus blumei*, και *Clusia minor* (Borland *et al.*, 1998), πού όπως το σταφύλι, αποθηκεύουν αφομοιώσιμες ουσίες που διακινούνται μέσω του ηθμού. Σε αντίθεση, η PEPCK δεν ανιχνεύθηκε στον ηθμό της τομάτας, κριθαριού, καλαμποκιού, *Panicum maximum*, και αρακά, είδη που είναι γνωστά για την αποπλαστική μεταφορά των ουσιών (Leegood & Walker, 1999).

Στο αγγούρι, η κατάσταση είναι πολύπλοκη καθώς υπάρχουν τρία είδη ηθμού (Esau, 1965). Οι αγγειακές δέσμες αλληλοσυμπληρώνονται με εσωτερικά και εξωτερικά στοιχεία ηθμού. Στον εσωτερικό ηθμό υπάρχουν συμπλαστικές συνδέσεις, ενώ στον εξωτερικό αποπλαστικές. Υπάρχει επίσης ένας τρίτος τύπος ηθμού, ένα δίκτυο ηθμού στα φύλλα, στο μίσχο και τα στελέχη, που βρίσκεται έξω από το ηθμαγγειώδες σύστημα.

Ανοσοεντοπισμός της PEPCK στο αγγούρι σε φύλλα και στελέχη έδειξε ότι σχετίζεται με το εξωτερικό ηθμό των δευτερευόντων ηθμοσωλήνων, στον εσωτερικό ηθμό ενδιάμεσων ηθμοσωλήνων και σε ολόκληρο το δεσμιδωτό ηθμό (Leegood *et al.*,

1999). Αμινοξέα όπως το γλουταμινικό και το ασπαραγινικό επίσης εντοπίστηκαν στον εξωτερικό ηθμό και στο δεσμιδωτό ηθμό φύλλων και μίσχων (Leegood *et al.*, 1999). Σε ένα συγγενικό είδος το πεπόνι, ο χυμός του μεσόφυλλου είναι εμπλουτισμένος σε ασπαραγινικό, ενώ ο χυμός του ηθμού είναι εμπλουτισμένος σε γλουταμίνη (Mitchell *et al.*, 1992). Τέτοια διαφορά προτείνει ότι υπάρχει έντονος μεταβολισμός αμινοξέων στα κύτταρα που εμπλέκονται με το ηθμό. Επιπλέον, τα κολοκυνθοειδή συνθέτουν συστατικά που συμμετέχουν στη μεταφορά, αργινίνης, κιτρουλίνης, που προέρχονται από το γλουταμινικό οξύ και τη γλουταμίνη. Υπάρχει η άποψη ότι τα συστατικά αυτά συντίθενται μέσα ή γύρω από το ηθμαγγειώδες σύστημα, σε κύτταρα παρακείμενα στο σημείο εξαγωγής του φύλλου.

Η πρωτεΐνη PEPCK βρίσκεται σε ένα σταυροδρόμι του μεταβολισμού του φυτού, μεταξύ οργανικών οξέων, αμινοξέων, λιπιδίων και σακχάρων. Το ένζυμο ρυθμίζεται από μεταβολίτες και από φωσφορυλίωση και έχει πιο εκτεταμένο ρόλο από αυτόν που αρχικά πιστεύαμε.

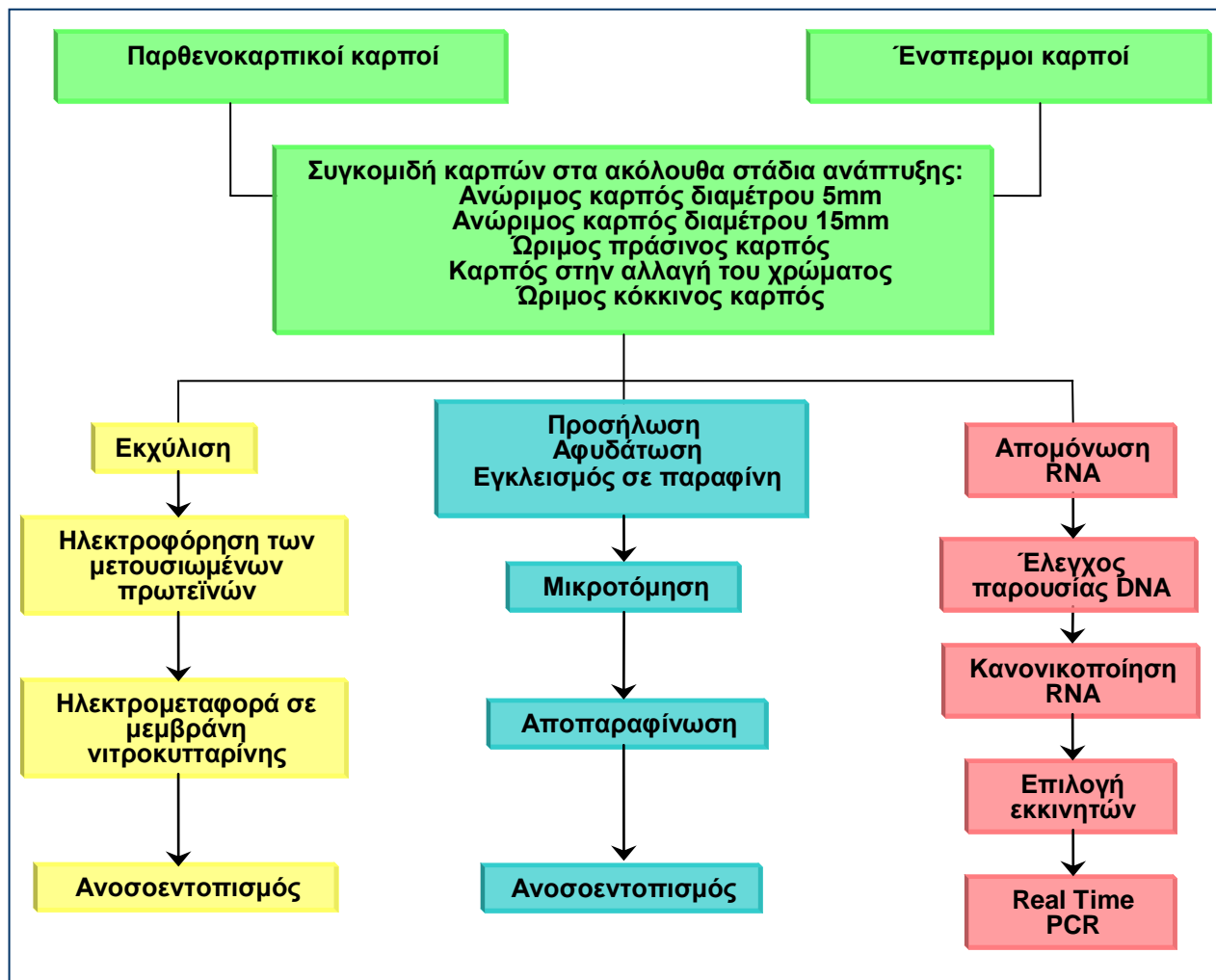
Σε ποικίλους ιστούς, η PEPCK είναι παρούσα σε ειδικά στάδια ανάπτυξης και σε ειδικούς τύπους κυττάρων. Η σύνθεση της πρωτεΐνης PEPCK μπορεί να προκληθεί ως απάντηση σε μεταβολικά σήματα, όπως τα αμινοξέα, κάτι που αποτελεί κοινό στοιχείο με την καρβοξυλάση PEP (Suzuki *et al.*, 1994).

## **1.6. Σκοπός της εργασίας**

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της συνθάσης της καρβοξικινάσης του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού (PEPCK), του ενζύμου που σχετίζεται με τη γλυκονογένεση στους αναπτυσσόμενους καρπούς τομάτας. Η μελέτη του ενζύμου αποσκοπεί στον εντοπισμό διαφορών μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών όσον αφορά την έκφραση του ενζύμου και τον εντοπισμό του.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1. Η διαδικασία του πειράματος.

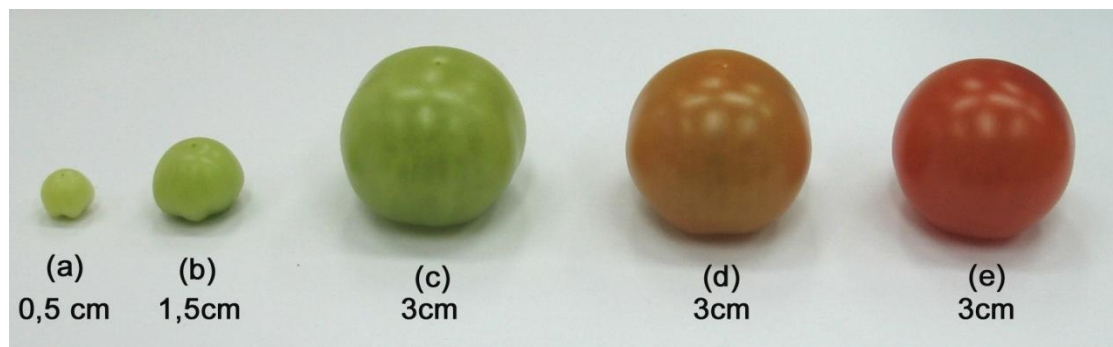


Εικόνα 2-1: Σχηματική παράσταση των διαδικασιών του πειράματος.

### 2.2. Το φυτικό υλικό.

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ένσπερμοι και άσπερμοι καρποί τομάτας τύπου cherry του υβριδίου Conchita. Πρόκειται για πρώιμο υβρίδιο 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-ναφθόξυλοξικό οξύ σε συγκέντρωση 50ppm. Οι ένσπερμοι καρποί προήλθαν από φυσιολογική καρπόδεση χωρίς καμία επέμβαση υποβοήθησης της καρπόδεσης. Οι άσπερμοι και ένσπερμοι καρποί συγκομίστηκαν σε 5 διαφορετικά στάδια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξή τους: ανώριμοι καρποί διαμέτρου 0,5cm και 1,5cm, ώριμοι πράσινοι, καρποί στην αλλαγή του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι (Εικόνα 2-2). 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 2-2:** Τα 5 στάδια ανάπτυξης του καρπού τομάτας τύπου cherry βάσει 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 ένσπερμων και τα αντίστοιχα 5 των άσπερμων καρπών ακολούθησε η εκχύλιση των πρωτεϊνών και οι μετρήσεις των ολικών τους πρωτεϊνών. Για την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών τα δείγματα αφού τεμαχίστηκαν, τοποθετήθηκαν σε γουδί μαζί με υγρό άζωτο. Ακολούθως, τα δείγματα λειοτριβήθηκαν. Για κάθε στάδιο αναμιγνυόταν συγκεκριμένη ποσότητα (σε νωπό βάρος) καρπού με αντίστοιχο όγκο μέσου εκχύλισης (αναλογία 1:1). Η όλη διαδικασία διαρκούσε έως ότου προκύψουν ομοιογενή εκχυλίσματα. Τελικά, τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν μέσα σε eppendorf 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% γλυκερίνη

0,02% BSA

2mM Ανηγμένη 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 (dH<sub>2</sub>O).

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών έγινε 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 dH<sub>2</sub>O, 100μl εκχυλίσματος και 1,5ml διαλύματος Bearden. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένας σωλήνας που περιείχε 1,5ml dH<sub>2</sub>O και 1,5ml διαλύματος Bearden. Ακολούθως έγινε φωτομέτρηση στα 595nm. Μετά τις επαναληπτικές μετρήσεις για κάθε δείγμα υπολογίζεται η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης.

### **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 φυγοκέντρωσή 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 Υπερθειικό Αμμώνιο (10%)

10μl TEMED

100μl SDS (10%)

### **Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης**

378mM Tris-HCl pH 8.9

### **B. Πηκτική 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 Υπερθειϊκό 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 πηκτική ανάλυση 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 - πηκτική - 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 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 της ταινίας νιτροκυτταρίνης με πολυκλωνικά αντισώματα παρασκευασθέντα εναντίον συντηρημένων περιοχών της PEPCK (Agrisera AS07 241, rabbit anti PEPCK) και σε αραιώση 1:1000 σε TBST-1% BSA για 12h στους 25°C.

Την επόμενη ημέρα, η ταινία νιτροκυτταρίνης ξεπλύθηκε 3φορές επί 5min 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 ξεπλύματα επί 5min με TBST 1% ζελατίνης.

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

Η ταινία νιτροκυτταρίνης αφυδατώθηκε και φυλάχτηκε 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 MgCl<sub>2</sub>

#### **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 εμβάπτισή 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 εμβάπτισεις 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 PEPCK, σε 1:1000 αραίωση του αντισώματος (Agrisera AS07 241, rabbit anti PEPCK) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST με 1% BSA (πρωτεΐνη του ορού του βοδιού), και οι αντικειμενοφόροι αφέθηκαν για τουλάχιστον 12h σε θερμοκρασία 4°C. 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 αραίωση (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**

10mM Tris-HCl pH 9.5

100mM NaCl

50mM MgCl<sub>2</sub>

#### **Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης**

10ml ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης

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

66μl Νιτρομπλέ του τετραζολίου (NBT)

## **2.5. Έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την PEPCK στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού.**

### **2.5.1 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 μικροφυγοκέντρωσης 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 μικροφυγοκέντρωσης χωρίς να διαταραχθούν τα κυτταρικά υπολείμματα στο σωλήνα συλλογής. Η φυγοκέντρωση 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 φυγοκέντρηση 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 φυγοκέντρηση 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.

### **2.5.2 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 κρυσταλλώσει 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 H<sub>2</sub>O

100μl 10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης του Δείγματος

### **2.5.3 Υδρόλυση του 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 H<sub>2</sub>O 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<sub>2</sub>O. Μετά την αντίδραση PCR και την ηλεκτροφόρηση TAE, η παρουσία μόνο των εκκινητών της ουμπικουτίνης δείχνει εάν έχει υδρολυθεί πλήρως το DNA.

#### **10X Ρυθμιστικό Διάλυμα DNάσης**

400mM Tris-HCl (pH 8.0)

100mM MgSO<sub>4</sub>

10mM CaCl<sub>2</sub>.

#### **2.5.4 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<sub>2</sub>O 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.

#### **2.5.5 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης .**

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<sup>+2</sup>.

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 Kara Biosystems. Κάθε σωλήνας περιείχε 2μl cDNA, ποσοτικοποιημένο και αραιωμένο (περίπου 100ng), ενώ προστίθενται και τα αντιδραστήρια με τις αναλογίες που προτείνονται από την εταιρία Kara Biosystems. Κάθε σωλήνας περιείχε:

- Ορθόδρομος εκκινητής 1μl (10μM)
- Οπισθόδρομος εκκινητής 1μl (10μM)
- Kara RYBR Fast qPCR Master mix (2X) 10μl
- KSF Rox Low (χρωστική) 0,4μl
- cDNA (100ng/μl) 1,5μl
- RNAse free H<sub>2</sub>O 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:

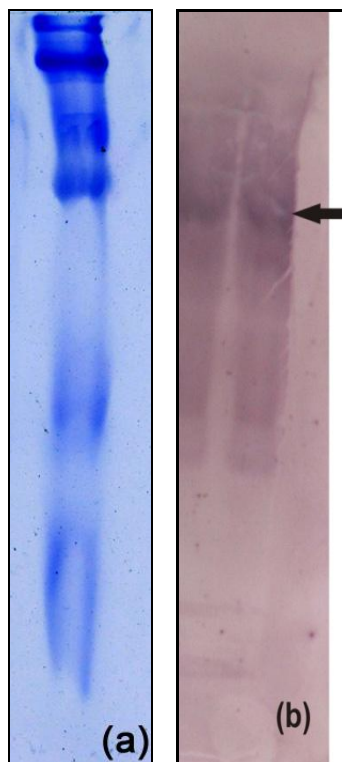
*Πίνακας 2-1: Εκκινητές PCR*

| Ένζυμο                     | Ορθόδρομος εκκινητής | Οπισθόδρομος Εκκινητής |
|----------------------------|----------------------|------------------------|
| <b>PEPCK</b><br>(AY007226) | GGCTGCAATATGGGAAAAGA | AAAACCACGTTTTCCAGCAC   |
| <b>Ubiquitin</b>           | AGGATGGAAGGACTCTGGCG | TCACAACACATCACAAGGTG   |

### 3. Αποτελέσματα

#### 3.1. Έλεγχος καταλληλότητας αντισωμάτων PEPCK

Για τον ανοσοεντοπισμό της PEPCK χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα που είχαν παραχθεί εναντίον συντηρημένης περιοχής της PEPCK του *Arabidopsis thaliana*. Για αυτό το λόγο θεωρήσαμε σκόπιμο να εξεταστεί η καταλληλότητα των αντισωμάτων εναντίον του αντίστοιχου ενζύμου της τομάτας cherry. 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 PEPCK αναγνώρισαν μια ηλεκτροφορητική ζώνη (βέλος).



**Εικόνα 3-1:** Έλεγχος καταλληλότητας των αντισωμάτων. Ταινία (a) χρώση ολικών πρωτεϊνών με *Coomassie Brilliant Blue R 250*, ταινία (b) ανοσοεντοπισμός της PEPCK μετά την ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

#### 3.2. Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου PEPCK

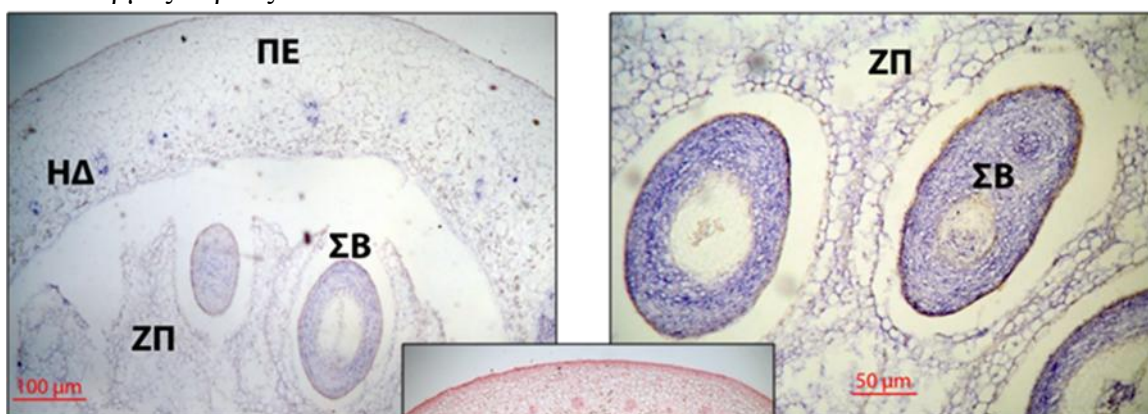
Η παρουσία της πρωτεΐνης PEPCK εντοπίστηκε στους ιστούς παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας τύπου cherry, σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Ο

μπλε-μοβ χρωματισμός δηλώνει την παρουσία του ενζύμου κατά τη στιγμή της προσήλωσης. Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού του ενζύμου και οι αντίστοιχοι μάρτυρες, αναλυτικά για κάθε στάδιο ανάπτυξης.

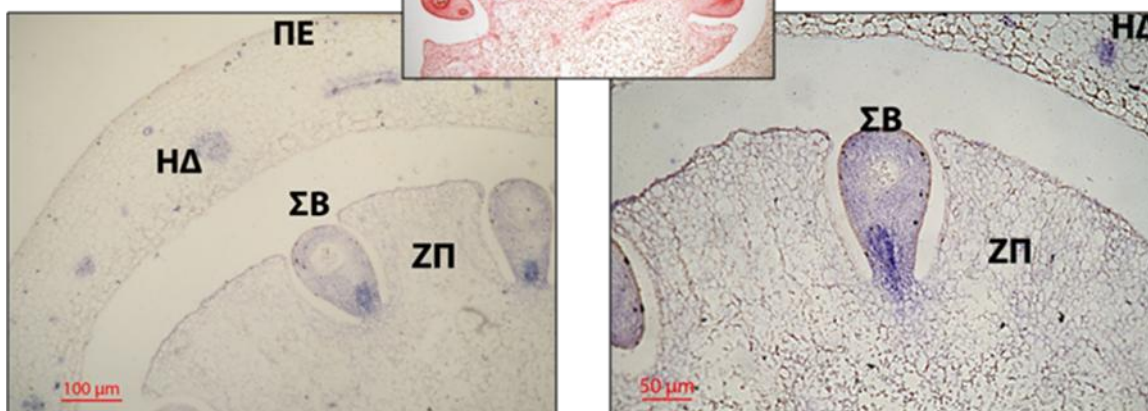
### 3.2.1 Ανώριμος καρπός διαμέτρου 0,5cm.

Στην **Εικόνα 3-2** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ανώριμων καρπών διαμέτρου 0,5cm, όπου διακρίνουμε ότι το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Έντονο ήταν το σήμα και στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος, τόσο στους παρθενοκαρπικούς όσο και στους ένσπερμους καρπούς.

#### Ένσπερμος καρπός



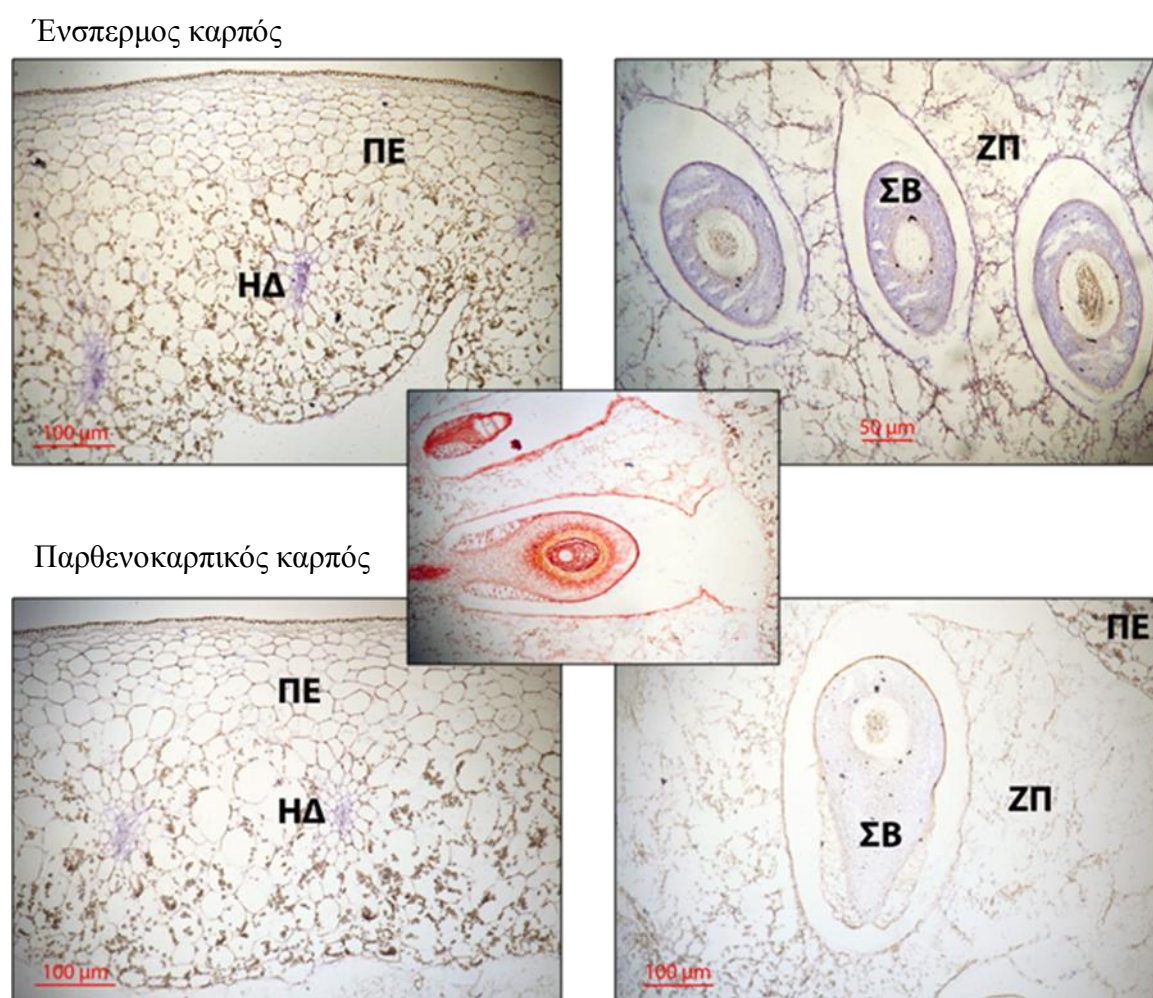
#### Παρθενοκαρπικός καρπός



**Εικόνα 3-2:** Ανοσοεντοπισμός στο στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 0,5cm. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρας χρωματισμένος με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΕ, περικάρπιο, ΣΒ, σπερματική βλάστη.

### 3.2.2 Ανώριμος καρπός διαμέτρου 1,5cm.

Στην **Εικόνα 3-3** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ανώριμων καρπών διαμέτρου 1,5cm, στην περιοχή του περικαρπίου και του ζελατινώδους παρεγγύματος. Διακρίνουμε ότι το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στις σπερματικές βλάστες. Ειδικότερα στους ένσπερμους καρπούς, το ένζυμο εντοπίζεται και στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγγύματος.

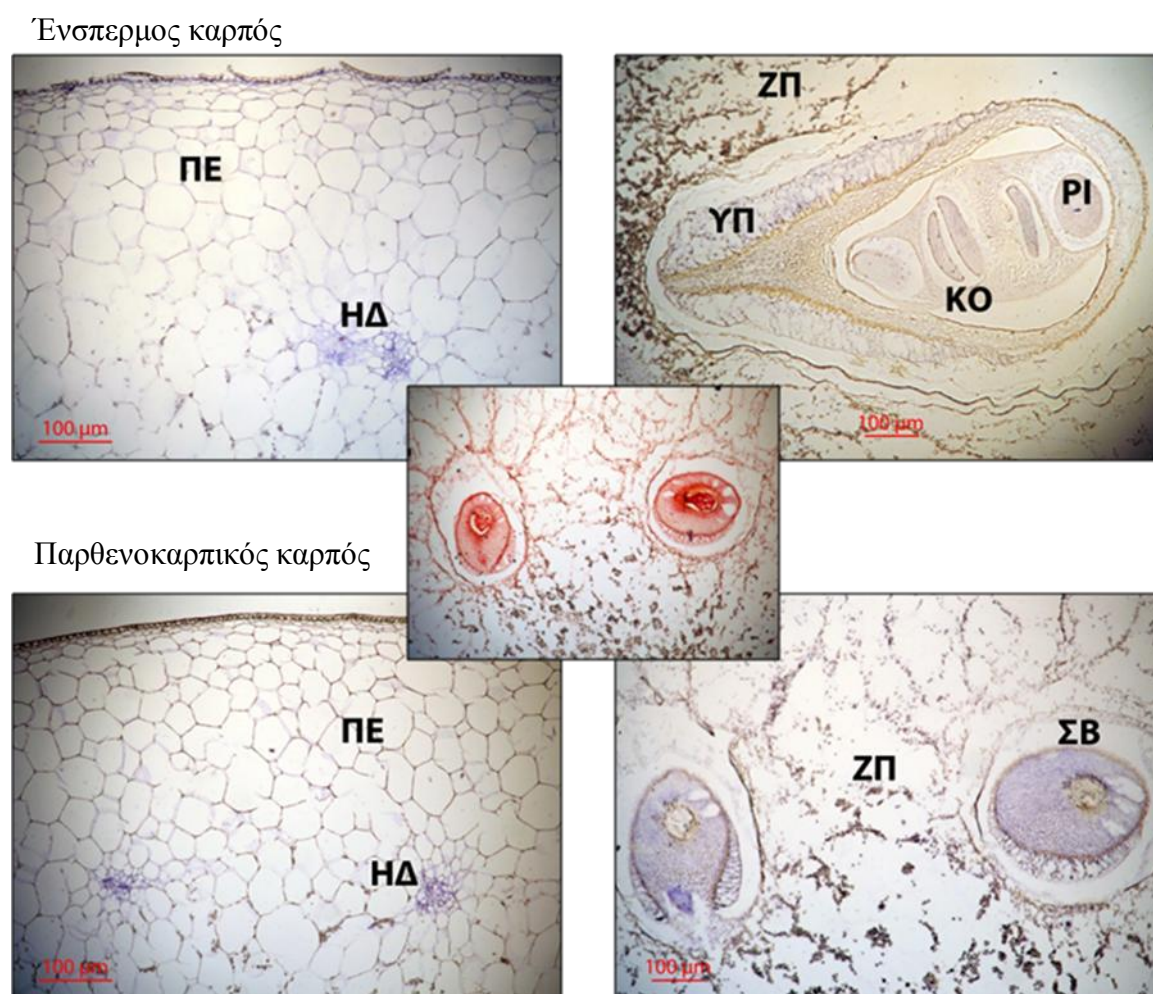


**Εικόνα 3-3:** *Ανοσοεντοπισμός στο στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 1,5cm. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρας χρωματισμένος με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδες παρέγγυμα, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΕ, περικάρπιο, ΣΒ, σπερματική βλάστη.*



### 3.2.3 Ωριμος πράσινος καρπός

Στην **Εικόνα 3-4** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ώριμων πράσινων καρπών, όπου διακρίνουμε ότι το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες και στους ιστούς των αναπτυσσόμενων σπερμάτων, αντίστοιχα. Πολύ έντονο εμφανίζεται το σήμα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, ενώ ασθενέστερο στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος και του περικαρπίου.

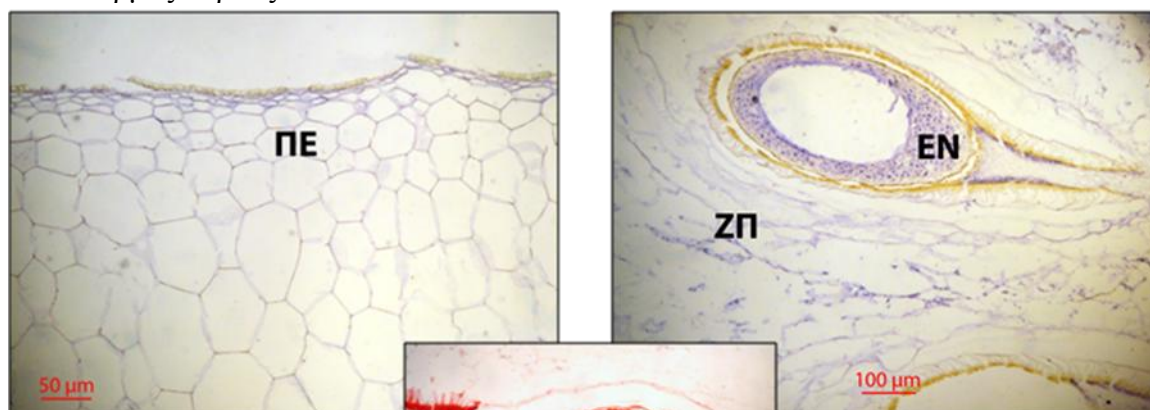


**Εικόνα 3-4:** Ανοσοεντοπισμός στο στάδιο ώριμου πράσινου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρας χρωματισμένος με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΕ, περικάρπιο, ΚΟ, κοτυληδόνες, ΡΙ, ριζίδιο, ΥΠ, βαλώδες παρέγχυμα, ΣΒ, σπερματική βλάστη.

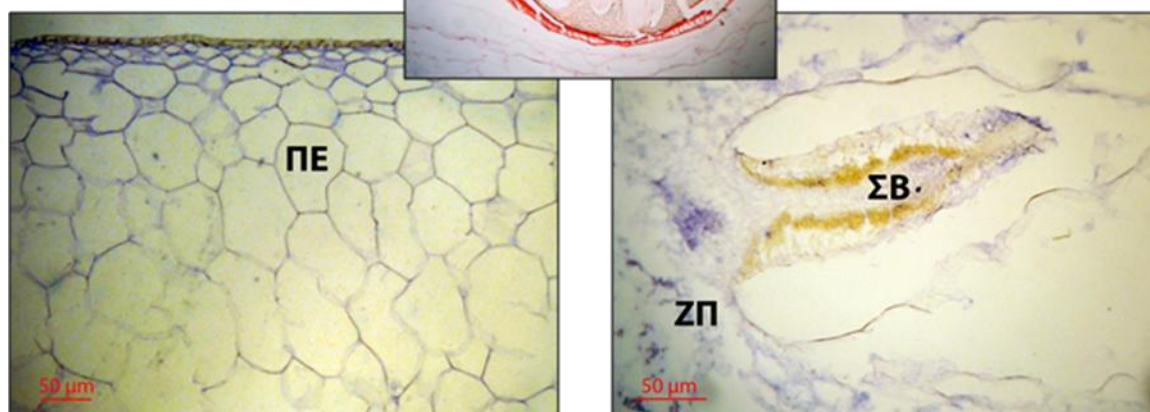
### 3.2.4 Ωριμος καρπός στο στάδιο αλλαγής χρώματος.

Στην **Εικόνα 3-5** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ώριμων καρπών στην αλλαγή χρώματος, όπου διακρίνουμε ότι το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες και στους ιστούς των αναπτυσσόμενων σπερμάτων, αντίστοιχα. Πολύ έντονο εμφανίζεται το σήμα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγγύματος, ενώ ασθενέστερο στα κύτταρα του περικαρπίου.

Ένσπερμος καρπός



Παρθενοκαρπικός καρπός

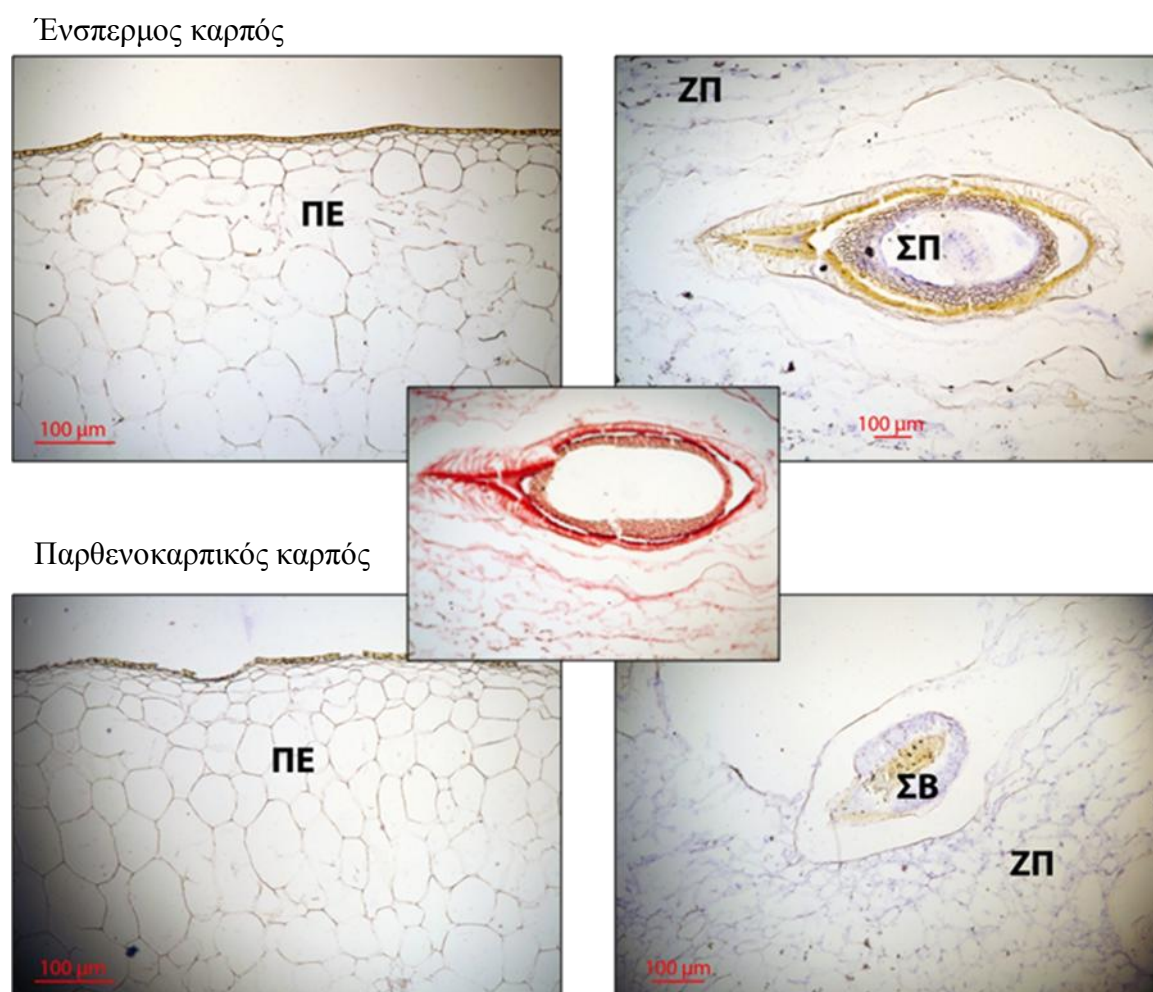


**Εικόνα 3-5:** *Ανοσοεντοπισμός στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρας χρωματισμένος με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΠΕ, περικάρπιο, ΕΝ, ενδοσπέρμιο, ΣΒ, σπερματική βλάστη.*



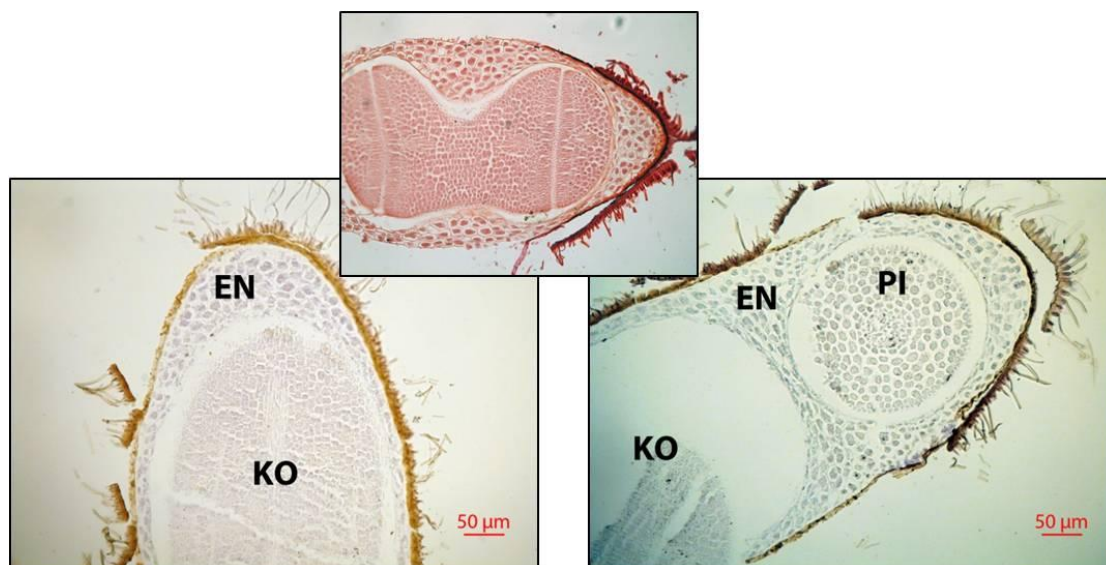
### 3.2.5 Ωριμος κόκκινος καρπός.

Στην **Εικόνα 3-56** παρουσιάζονται εγκάρσιες τομές παρθενοκαρπικών και ένσπερμων ώριμων κόκκινων καρπών, όπου διακρίνουμε ότι το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες και στους ιστούς των σχηματισμένων σπερμάτων, αντίστοιχα. Έντονο εμφανίζεται το σήμα, επίσης, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος.



**Εικόνα 3-6:** *Ανοσοεντοπισμός στο στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρας χρωματισμένος με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΠΕ, περικάρπιο, ΣΠ, σπέρμα, ΣΒ, σπερματική βλάστη.*

Στην **Εικόνα 3-7** φαίνεται με μεγαλύτερη λεπτομέρεια η παρουσία του ενζύμου στους ιστούς των σπερμάτων των ώριμων κόκκινων καρπών.

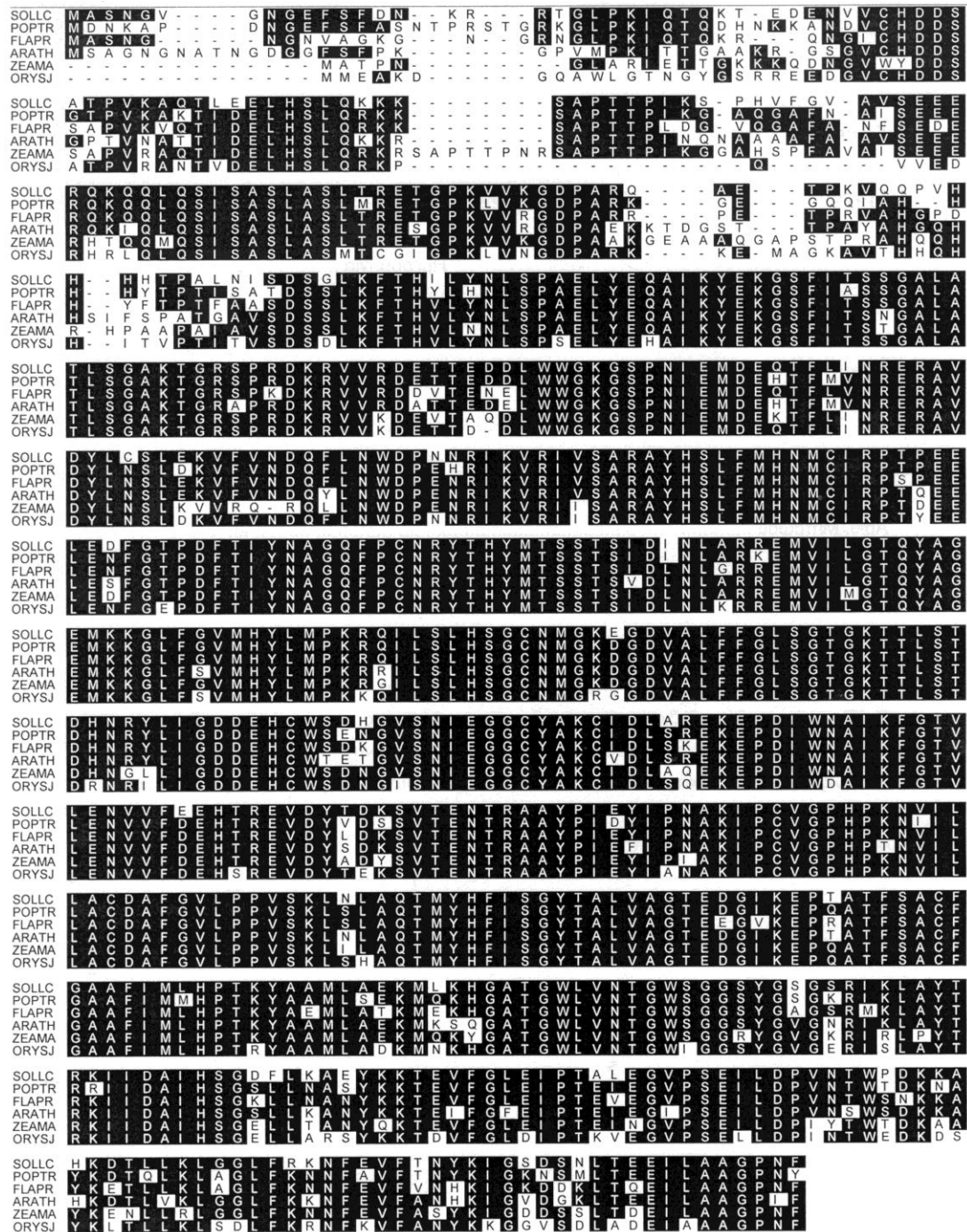


**Εικόνα 3-7:** Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού σε σπέρματα ώριμων κόκκινου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται με μπλε-μοβ χρωματισμό. Ένθετα, μάρτυρας χρωματισμένος με σαφρανίνη. EN, ενδοσπέρμιο, ΚΟ, κοτυληδόνες, ΡΙ, ριζίδιο.

### 3.3. Έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την PEPCK στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού.

Από έρευνα στο NCBI (National Center for Biotechnology Information) εντοπίστηκε η PEPCK της τομάτας (Bahrami *et al.*, 2001).

Η αμινοξική ακολουθία που προέκυψε από τη μετάφραση του γονιδίου εξετάστηκε σε σχέση με άλλες ήδη χαρακτηρισμένες αμινοξικές ακολουθίες του ενζύμου σε άλλα φυτικά είδη (**Εικόνα 3-8**). Η σύγκριση της πρωτεϊνικής αλληλουχίας της PEPCK στην τομάτα (*Solanum lycopersicon*), έδειξε 86,1%, 85,8%, 83,5%, 82,4%, και 80,4% ομολογία με τις αμινοξικές ακολουθίες των *Populus trichocarpa*, *Flaveria pringlei*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* και *Oryza sativa japonica* αντίστοιχα (**Πίνακας 3-1**). Ο υψηλός βαθμός ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών υποδεικνύει ότι το γονίδιο όντως κωδικοποιεί την PEPCK στην τομάτα.



**Εικόνα 3-8:** Η προσδιορισμένη αμινοξική ακολουθία της PEPCK της τομάτας (SOLLC) ευθυγραμμίστηκε με τις ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες της PEPCK των *Populus trichocarpa*, *Flaveria pringlei*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* και *Oryza sativa japonica*. Τα μαύρα πλαίσια υποδηλώνουν συντηρημένα αμινοξέα στην πλειοψηφία των αμινοξικών αλληλουχιών.

|          |   | Εκατοστιαία ομοιότητα |      |      |      |      |      |   |       |
|----------|---|-----------------------|------|------|------|------|------|---|-------|
|          |   | 1                     | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |   |       |
| Απόκλιση | 1 |                       | 86.1 | 85.8 | 83.5 | 82.4 | 80.4 | 1 | SOLLC |
|          | 2 | 15.5                  |      | 85.7 | 82.8 | 82.8 | 80.3 | 2 | POPTR |
|          | 3 | 15.7                  | 15.9 |      | 83.4 | 82.5 | 79.9 | 3 | FLAPR |
|          | 4 | 18.7                  | 19.6 | 18.8 |      | 80.4 | 78.2 | 4 | ARATH |
|          | 5 | 20.1                  | 19.6 | 20.0 | 22.8 |      | 79.3 | 5 | ZEAMA |
|          | 6 | 22.8                  | 23.0 | 23.5 | 25.8 | 24.3 |      | 6 | ORYSJ |
|          |   | 1                     | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    |   |       |

**Πίνακας 3-1:** Το ποσοστό ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών που προκύπτουν από τη σύγκριση της PEPCK μεταξύ των φυτών της τομάτας (SOLLC) και των *Populus trichocarpa* (POPTR), *Flaveria pringlei* (FLAPR) *Arabidopsis thaliana* (ARATH), *Zea mays* (ZEAMA), και *Oryza sativa japonica* (ORYSJ).

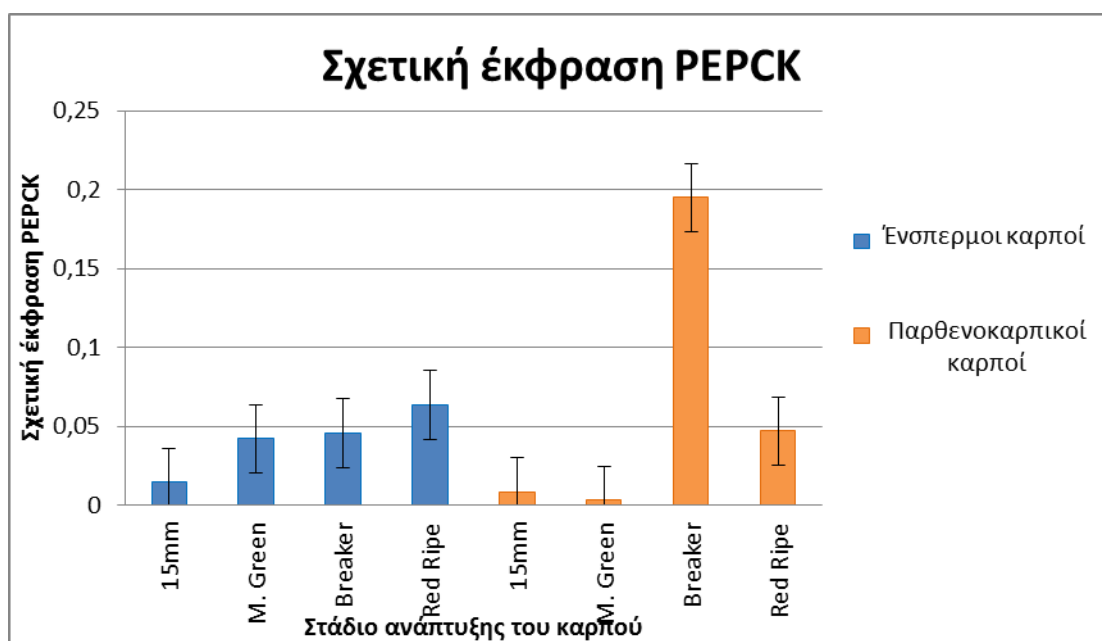
Μετά την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας, σχεδιάστηκαν εκκινητές στο ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο της αλληλουχίας αυτής, έτσι ώστε να υβριδίσουν με το γονίδιο της PEPCK στη τομάτα (Πίνακας 2-1).

Το ζευγάρι των εκκινητών χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή real time-PCR, με σκοπό τη μελέτη έκφρασης του γονιδίου της PEPCK και τον προσδιορισμό της συσσώρευσης των μεταγραφημάτων του, 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.

Τα αποτελέσματα της PCR (Πίνακας 3-2) δείχνουν ότι σημαντική διαφοροποίηση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου ανάμεσα σε ένσπερους και παρθενοκαρπικούς καρπούς, παρατηρείται μόνο στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Στο στάδιο αυτό η σχετική έκφραση της PEPCK ήταν πολύ υψηλότερη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, όπου σημειώνεται και η μέγιστη τιμή των μετρήσεων. Στα υπόλοιπα στάδια ανάπτυξης του καρπού δεν παρουσιάζεται στατιστική διαφορά ανάμεσα σε ένσπερους και παρθενοκαρπικούς καρπούς, ωστόσο οι τιμές είναι ελαφρώς μεγαλύτερες στους ένσπερους καρπούς.

Στους ένσπερμους καρπούς, τα αποτελέσματα της PCR έδειξαν μια ανοδική τάση της σχετικής έκφρασης του γονιδίου με ελάχιστη τιμή στο στάδιο του ανώριμου καρπού 15mm και μέγιστη τιμή στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού. Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, το μέγιστο πλήθος μεταγραφημάτων παρατηρήθηκε στο στάδιο της αλλαγής χρώματος, ενώ στα πρώτα στάδια ανάπτυξης, η σχετική έκφραση της PEPCK δεν ήταν αξιόλογη.



**Πίνακας 3-2:** Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων (σχετική έκφραση) του γονιδίου της PEPCK (AY007226) 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.

## 4. Συζήτηση

Η καρβοξυκινάση του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού (PEPCK) είναι ένζυμο που συμμετέχει στην γλυκονεογένεση, καταλύοντας την αποκαρβοξυλίωση του οξαλοξικού οξέος (OAA) προς τον σχηματισμό φωσφοροενολοπυροσταφυλικού οξέος (PEP). Η συγκέντρωση του υποστρώματος (OAA) της παραπάνω αντίδρασης επηρεάζεται άμεσα από τον μεταβολισμό οργανικών οξέων, πιο συγκεκριμένα του μηλικού και του κιτρικού οξέος.

Στον καρπό της τομάτας η συγκέντρωση των οργανικών οξέων αυξάνεται έως το στάδιο της αλλαγής του χρώματος του καρπού και μετά μειώνεται (**Εικόνα 1-3**). Ταυτόχρονα, στα τελευταία στάδια της ωρίμανσης της τομάτας, αυξάνεται η περιεκτικότητα των καρπών σε σάκχαρα. Η αναλογία αυτή, σακχάρων προς οξέα, είναι ένας σημαντικός ποιοτικός παράγοντας που καθορίζει τη γεύση ενός ώριμου σαρκώδους καρπού.

Στους ένσπερμους καρπούς τομάτας, η συγκέντρωση των οργανικών οξέων είναι υψηλότερη στο ζελατινώδες παρέγχυμα σε σχέση με άλλους ιστούς. Παράλληλα, οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσιάζουν αφενός μειωμένη αύξηση του ζελατινώδους παρεγχύματος, και αφετέρου μειωμένη συγκέντρωση οργανικών οξέων.

Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, θεωρήθηκε σκόπιμη η μελέτη της PEPCK στα διάφορα στάδια ανάπτυξης ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας cherry, έτσι ώστε να εξεταστεί η πιθανή συμμετοχή του ενζύμου στη μετατροπή των οργανικών οξέων σε σάκχαρα ιδιαίτερα στα τελευταία στάδια ανάπτυξης του καρπού.

### 4.1. Η PEPCK στους ένσπερμους καρπούς

Η παρουσία του ενζύμου σε ανώριμους καρπούς διαμέτρου 0,5cm και 1,5cm και στον ώριμο καρπό πράσινου χρώματος ήταν ιδιαίτερα έντονη στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στις σπερματικές βλάστες/αναπτυσσόμενα σπέρματα. Λιγότερο έντονο εμφανίστηκε το σήμα στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος. Ειδικότερα στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού είχαμε σήμα και στα κύτταρα του περικαρπίου (**Εικόνες 3-2, 3-3, 3-4**).



Παρόμοια εικόνα έδειξε και ο εντοπισμός της PEPCK στα στάδια ώριμου καρπού στην αλλαγή χρώματος, και ώριμου καρπού κόκκινου χρώματος (**Εικόνες 3-5, 3-6**). Το ένζυμο εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στους ιστούς των αναπτυσσόμενων σπερμάτων και σε μικρότερο βαθμό στην περιοχή του περικαρπίου. Χαρακτηριστικό είναι, ωστόσο, ότι η ένταση του σήματος στο ζελατινώδες παρέγχυμα ήταν αξιοσημείωτα υψηλή και στα δύο αυτά στάδια ανάπτυξης.

Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με προηγούμενες εργασίες που εντοπίζουν την PEPCK σε ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Walker *et al.*, 1999; Borland *et al.*, 1998) και αναπτυσσόμενα σπέρματα (Walker *et al.*, 1999; Malone *et al.*, 2007) σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του καρπού διάφορων φυτών, και στα κύτταρα του περικαρπίου κατά την διάρκεια της ωρίμανσης της τομάτας (Bahrami *et al.*, 2001). Οι μελέτες αυτές συσχετίζουν την παρουσία του ενζύμου σε ιστούς καταβόθρες, όπως καρποί και σπέρματα, με την συμμετοχή του στην λειτουργία της γλυκονεογένεσης. Φαίνεται ότι η νεογλυκογένεση μέσω της PEPCK σε ιστούς καταβόθρες είναι απαραίτητη αφενός για την διατήρηση της ισορροπίας του pH, χρησιμοποιώντας τα πρωτόνια που σχηματίζονται από τον μεταβολισμό των εισερχόμενων αμινοξέων, και αφετέρου για την κατανάλωση του συσσωρευόμενου οξαλοξικού οξέος, που προέρχεται από τον μεταβολισμό της ασπαραγίνης και του ασπαργανικού οξέος, και την μετατροπή του σε PEP (Walker & Chen, 2002; Delgado-Alvarado *et al.*, 2007).

Η μελέτη της έκφρασης του γονιδίου που κωδικοποιεί την PEPCK έδειξε μια αύξηση του πλήθους των μεταγραφημάτων κατά την ανάπτυξη του καρπού της τομάτας cherry. Η σχετική έκφραση ήταν ελάχιστη στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του καρπού, όταν ο καρπός έχει διάμετρο 1,5cm, και μέγιστη στο τελευταίο στάδιο της ωρίμανσης. Στα ενδιάμεσα στάδια δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφορά (**Πίνακας 3-2**). Η αύξηση της σχετικής έκφρασης της PEPCK κατά την εξέλιξη της ωρίμανσης μπορεί να συσχετιστεί με την πτώση της περιεκτικότητας του καρπού σε οργανικά οξέα (κιτρικό και μηλικό) μετά το στάδιο του πράσινου ώριμου καρπού. Προγενέστερες εργασίες έχουν ήδη συνδέσει την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου, κατά την ωρίμανση, με τη σημαντική μείωση της περιεκτικότητας του καρπού σε οργανικά οξέα (Bahrami *et al.*, 2001; Knee & Finger, 1992; Kanellis & Roubelakis-Angelakis, 1993). Η παρουσία του ενζύμου έχει συσχετιστεί, επίσης, με

την συγκέντρωση του κιτρικού και του μηλικού οξέος και σε άλλα φυτικά είδη (Famiani *et al.*,2005).

#### **4.2. Η PEPCK στους παρθενοκαρπικούς καρπούς**

Τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού της PEPCK στους παρθενοκαρπικούς καρπούς ήταν παρόμοια με τα αποτελέσματα στους ένσπερους καρπούς τομάτας cherry. Πράγματι, η παρουσία του ενζύμου στους παρθενοκαρπικούς καρπούς εντοπίστηκε σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στις σπερματικές βλάστες και τα αναπτυσσόμενα σπέρματα. Ιδιαίτερα έντονο σήμα εμφανίστηκε στην περιοχή του σχηματιζόμενου ζελατινώδους παρεγχύματος στα στάδια του ανώριμου καρπού 0,5cm και στα τελευταία στάδια της ωρίμανσης που ακολουθούν την αλλαγή χρώματος του καρπού. Σε μικρότερο βαθμό, το ένζυμο εντοπίστηκε και στην περιοχή του περικαρπίου (**Εικόνες 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6**).

Αναφορές σχετικές με τον εντοπισμό της PEPCK σε παρθενοκαρπικούς καρπούς δεν βρέθηκαν στην διεθνή βιβλιογραφία. Ωστόσο, η ομοιότητα των αποτελεσμάτων με τους ένσπερους καρπούς και το γεγονός ότι η οξύτητα εντοπίζεται σε μεγάλο βαθμό στο ζελατινώδες παρέγχυμα, υποδεικνύουν τον συσχετισμό του ενζύμου με τις μεταβολές των συγκεντρώσεων των οργανικών οξέων (μηλικό και κιτρικό) και τον ρόλο που πιθανότατα παίζει στην γλυκονεογένεση.

Η σχετική έκφραση του γονιδίου που κωδικοποιεί την PEPCK παρουσίασε μεγαλύτερες διακυμάνσεις στους παρθενοκαρπικούς καρπούς σε σχέση με τους ένσπερους καρπούς, εμφανίζοντας την μεγαλύτερη τιμή του συνόλου των μετρήσεων στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος και την μικρότερη τιμή του συνόλου των μετρήσεων στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού (**Πίνακας 3-2**). Οι πιο απότομες μεταβολές στο πλήθος των μεταγραφημάτων στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, θα μπορούσαν να αποδοθούν, πιθανόν, στην μειωμένη ανάπτυξη του ζελατινώδους παρεγχύματος που συνοδεύει την παρθενοκαρπία. Γνωρίζοντας ότι στο ζελατινώδες παρέγχυμα η συγκέντρωση των οξέων είναι πολλαπλάσια από ότι σε άλλους ιστούς, το γεγονός αυτό συνδέεται και με μειωμένη συγκέντρωση οργανικών οξέων στον παρθενοκαρπικό καρπό. Ανεξάρτητα από την διαπίστωση αυτή, ωστόσο, το συμπέρασμα είναι ότι, όπως στους ένσπερους καρπούς, έτσι και στους παρθενοκαρπικούς, η αύξηση της σχετικής έκφρασης της PEPCK στο στάδιο της



αλλαγής χρώματος, συμβαδίζει με την πτώση της συγκέντρωσης των οργανικών οξέων.

## 5. Συμπεράσματα

- Τα αποτελέσματα του ανσοσοεντοπισμού της PEPCK έδειξαν την παρουσία του ενζύμου στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, στις σπερματικές βλάστες/ σπέρματα και στο ζελατινώδες παρέγχυμα.
- Στους ένσπερμους καρπούς το ένζυμο εντοπίζεται στο ζελατινώδες παρέγχυμα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης του καρπού. Αντιθέτως, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς το ένζυμο εντοπίζεται στο ζελατινώδες παρέγχυμα κυρίως μετά το στάδιο της αλλαγής του χρώματος.
- Στα πρώιμα στάδια της ωρίμανσης των ένσπερμων καρπών η σχετική έκφραση του γονιδίου είναι χαμηλή και αυξάνεται καθώς οι καρποί ωριμάζουν, ενώ στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η σχετική έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει μέγιστη τιμή στο στάδιο της αλλαγής χρώματος.

## 6. Βιβλιογραφία

**Abdalla AA, Verkerk K (1968).** Growth, flowering and fruit set of the tomato at high temperature. *Neth J Agri Sci*, **16**, 71-76.

**Agostino A, Heldt HW, Hatch MD (1996).** Mitochondrial respiration in relation to photosynthetic C<sub>4</sub> acid decarboxylation in C<sub>4</sub> species. *Aust J Plant Physiol*, **23**, 1-7.

**Allaby M (1998).** Oxford dictionary of plant sciences. *Oxford University Press, New York*, pp. 262.

**Archbold DD, Jr Dennis FG, Fiore JA (1982).** Accumulation of <sup>14</sup>C labelled material from foliarapplied <sup>14</sup>C sucrose by tomato ovaries during fruit set and initial development. *J Am Soc Hort Sci*, **107**, 19-23.

**Arnelle DR, O'Leary MH (1992).** Binding of carbon dioxide to phosphoenolpyruvate carboxykinase deduced from carbon kinetic isotopic effects. *Biochemistry*, **31**, 4363-4368.

**Asahira T, Takagi H, Takeda Y, Tsukamoto Y (1968).** Αναφορά από **Atherton J, Rudich G (1986).**

**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.

**Atherton J, Rudich G (1986).** Tomato crop. A scientific basis for improvement. *Chapman and Hall, UK*.

**Azevedo RA, Arruda P, Turner WL, Lea PJ (1997).** The biosynthesis and metabolism of the aspartate derived amino acids in higher plants. *Phytochemistry*, **46**, 395-419.

**Bahrami AR, Chen ZH, Walker RP, Leegood RC, Gray JE (2001).** Ripening-related occurrence of phosphoenolpyruvate carboxykinase in tomato fruit. *Plant Mol Biol*, **47**, 499-506.

**Baxter CJ, Carrari F, Bauke A, Overy S, Hill SA, Quick PW, Fernie AR, Sweetlove LJ (2005).** Fruit carbohydrate metabolism in an introgression line of tomato with increased fruit soluble solids. *Plant and Cell Physiology*, **46**, 425-437.

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

**Benedict CR, Beevers H (1961).** Formation of sucrose from malate in germinating castor beans. I. Conversion of malate to phosphoenolpyruvate. *Plant Physiol*, **36**, 540-544.

**Borland AM, Técsi LI, Leegood RC, Walker RP (1998).** Inducibility of crassulacean acid metabolism (CAM) in *Clusia* species; physiological/biochemical characterisation and intercellular localization of carboxylation and decarboxylation processes in three species which exhibit different degrees of CAM. *Planta*, **205**, 342–351.

**Bunger-Kibler S, Bangerth F (1983).** Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicum esculentum* Mill) and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regul*, **1**, 143-154.

**Burnell JN (1986).** Purification and properties of phosphoenolpyruvate carboxykinase from C4 plants. *Aust J Plant Physiol*, **13**, 577-587.

**Carangal AR, Alban EK, Varner JE, Burrell RC (1954).** The Influence of Mineral Nutrition on the Organic Acids of the Tomato *Lycopersicum esculentum*. *Plant Physiol*, **29**, 355-360.

**Christopher JT, Holtum JAM (1996).** Patterns of carbon partitioning in leaves of crassulacean acid metabolism species during acidification. *Plant Physiol*, **112**, 393–399.

**Christopher JT, Holtum JAM (1998).** Carbohydrate partitioning in the leaves of Bromeliaceae performing C3 photosynthesis or Crassulacean acid metabolism. *Aust J Plant Physiol*, **25**, 371–376.

**Coombe B (1976).** Αναφορά από **Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W (1993).**

**Crookes PR, Grierson D (1983).** Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol*, **172**, 1088-1093.

**Cushman JC, Bohnert H (1997).** Molecular genetics of Crassulacean acid metabolism. *Plant Physiol*, **113**, 667–676.

**Dali N, Michaud D, Yelle S (1992).** Evidence for the involvement of sucrose phosphate synthase in the pathway of sugar accumulation in sucrose-accumulating tomato fruits. *Plant Physiol*, **99**, 788–792.

**Davies JN (1966).** Occurrence of sucrose in the fruit of some species of *Lycopersicon*. *Nature*, **209**, 640–641.

**Davies JW, Cocking EC (1965).** Αναφορά από **Atherton J, Rudich G (1986).**

Dooner HK, Robbins TP, Jorgensen R. 1991. Genetic and developmental control of anthocyanin biosynthesis. *Annual Review in Genetics* **25**, 173–199.

**Davies JN, Hobson GE (1981).** The constituents of tomato fruit-the influence of environment, nutrition and genotype. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **15**, 205-280.

**Delgado-Alvarado A, Walker RP, Leegood RC (2007).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in developing pea seeds is associated with tissues involved in solute transport and is nitrogen-responsive. *Plant Cell Environ*, **30**, 225–235.

**Esau K (1965).** Plant anatomy, 2nd (ed) John Wiley, New York.

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

**Famiani F, Walker RP, Tecsli LI, Chen Z-H, Proietti P, Leegood RC (2000).** An immunohistochemical study of the compartmentation of metabolism during the development and ripening of grape berries. *J Exp Bot*, **51**, 675–683.

**Famiani F, Cultrera NGM, Battistelli A (2005).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase and its potential role in the catabolism of organic acids in the flesh of soft fruit during ripening. *J Exp Bot*, **56**, 2959-2969.

**FAO (1985).** Αναφορά από **Wangdi PC (1992).**

**Fillion L, Ageorges A, Picaud S, Coutos-Thévenot P, Lemoine R, Romieu C, Delrot S (1999).** Cloning and expression of a hexose transporter gene expressed during the ripening of grape berry. *Plant Physiol*, **120**, 1083–1093.

**Finnegan PM, Burnell JN (1995).** Isolation and sequence analysis of cDNAs encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase from the PCK-type C4 grass *Urochloa panicoides*. *Plant Mol Biol*, **27**, 365–376.

**Finnegan PM, Suzuki S, Ludwig M, Burnell JN (1999).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in the C4 monocot *Urochloa panicoides* is encoded by four differentially expressed genes. *Plant Physiol*, **120**, 1033–1041.

**Furomoto T, Hata S, Izui K (1999).** cDNA cloning and characterization of maize phosphoenolpyruvate carboxykinase, a bundle sheath specific enzyme. *Plant Mol Biol*, **41**, 301–311.

**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

**Goldie AH, Sanwal RD (1980).** Allosteric control by calcium and mechanism of desensitization of phosphoenolpyruvate carboxykinase of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **255**, 1399-1405.

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

**Gough C, Hobson GE (1990).** A comparison of the productivity, quality, shelf life characteristics and consumer reaction to the crop from cherry tomato plants grown at different levels of salinity. *J Hort Sc*, **65**, 431-439.

**Gould WA (1983).** Tomato Production, Processing and Quality Evaluation. *AVI Publishing Company Inc, Westport, CO*, p 445.

**Grierson D, Kader AA (1986).** Fruit ripening and quality. *In The Tomato Crop*. (ed. Atherton JG & Rudich J). *Chapman and Hall Publication Company*, pp. 241-275.

**Guillet C, Just D, Bénard N, Destrac-Irvine A, Baldet P, Hernould M, Causse M, Raymond P, Rothan C (2002).** A fruit-specific phosphoenolpyruvate carboxylase is related to rapid growth of tomato fruit. *Planta*, **214**, 717–726.

**Gustafson FG (1936).** Inducement of fruit development by growth-promoting chemicals. *P Natl Acad Sci USA*, **22**, 628-636.

**Gustafson FG (1942).** Parthenocarpy: natural and artificial. *Bot Rev*, **8**, 599-654.

**Halford NG, Hardie DG (1998).** SNF1-related protein kinases: global regulators of carbon metabolism in plants? *Plant Mol Biol*, **37**, 735–748.

**Hallman E, Kobryń J (2003).** Yield and quality of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) cultivated on rockwool and cocofibre. *Acta Hort*, **614**, 693-697.

**Harris WM, Spurr AR (1969).** Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am J Bot*, **56**, 380–389.

**Hausler RE, Hirsch H-L, Kreuzaler F, Peterhansel C (2002).** Overexpression of C4-cycle enzymes in transgenic C3 plants: a biotechnological approach to improve C3-photosynthesis. *J Exp Bot*, **53**, 591-607.

**Hawker JS (1969).** Changes in the activities of malic enzyme, malate dehydrogenase, phosphopyruvate carboxylase and pyruvate decarboxylase during the development of a non-climacteric fruit (the grape). *Phytochemistry*, **8**, 19–23.

**Heiser C, Anderson G (1999).** Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G (2007).**

**Ho LC, Sjut V, Hoad GV (1983).** The effect of assimilate supply on fruit growth and hormone levels in tomato plants. *Plant Growth Regul*, **1**, 155-171.

**Ho LC, Hewitt JD (1986).** Fruit development. In *The Tomato Crop*. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company, 201-239

**Hobson GE, Davies JN (1971).** The Biochemistry of Fruits and Their Products. Academic Press, (ed. Hulme AC), New York, p 437.

**Hobson G (1988).** Cherry tomatoes. *The Garden*, 55-60.

**Houghtalin HB (1935).** Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD (1986).**

**Howlett FS (1939).** The modification of flower structure by environment in varieties of *Lycopersicon esculentum*. *J Agr Res*, **58**, 79-117.

**Ireland RJ, Lea PJ (1999).** The enzymes of glutamine, glutamate, asparagine and aspartate metabolism. In *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. (ed) Singh B, Marcel Dekker, New York, pp 49–109.

**Janes BE (1941).** Some chemical differences between artificially produced parthenocarpic fruits and normal seeded fruits of tomato. *Am J Bot*, **28**, 639-646.

**Kanellis AK, Roubelakis-Angelakis KA (1993).** Grape. In *Biochemistry of fruit ripening*. (ed) Seymour G, Taylor J, Tucker G, Chapman and Hall, London, pp 189–234.

**Kellog EA (1999).** Phylogenetic aspects of the evolution of C4 photosynthesis. In *The biology of C4 plants*. (ed) Sage RF, Monson RK, Academic Press, San Diego, pp 411–414.

**Kim DJ, Smith SM (1994).** Molecular cloning of cucumber phosphoenolpyruvate carboxykinase and developmental regulation of gene expression. *Plant Mol Biol*, **26**, 423-434.

**Knee M, Finger FL (1992).** NADP<sup>+</sup>-malic enzyme and organic acid levels in developing tomato fruits. *J Am Soc Hort Sci*, **117**, 799–801.

**Koltunow AM, Grossniklaus U (2003).** Apomixis: A developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol*, **54**, 547-574.

**Krautwurst H, Bazaes S, González FD, Jabalquinto AM, Frey PA, Cardemil E (1998).** The strongly conserved lysine 256 of *Saccharomyces cerevisiae* phosphoenolpyruvate carboxykinase is essential for phosphoryl transfer. *Biochemistry*, **37**, 6295–6302.

**Kueng V, Schlaeppli K, Schneider A, Seebeck T (1989).** A glycosomal protein (p60) which is predominantly expressed in procyclic *Trypanosoma brucei*. Characterization and DNA sequence. *J Biol Chem*, **264**, 5203-5209.

**Lea PJ, Ireland RJ (1999).** Nitrogen metabolism in higher plants. *In Plant amino acids: biochemistry and biotechnology.* (ed) Singh B, Marcel Dekker, New York, pp 1–47.

**Leegood RC (1997).** The regulation of C4 photosynthesis. *In Advances in botanical research, vol. 26.* (ed) Callow JA, Academic Press, San Diego, pp 251–316.

**Leegood RC, ap Rees T (1978).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase and gluconeogenesis in cotyledons of *Cucurbita pepo*. *Biochim Biophys Acta*, **524**, 207-218.

**Leegood RC, Walker RP (1999).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants: its role and regulation. *In Plant carbohydrate biochemistry.* (ed) Bryant JA, Burrell MM, Kruger NJ, BIOS, Oxford, pp 201–213.

**Leegood RC, Walker RP (2003).** Regulation and roles of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. *Arch Biochem Biophys*, **414**, 204–210.

**Long VH (1998).** Cherry tomato seed production. *AVRDC-ARC Research Report*.

**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.

**Malone S, Chen Z-H, Bahrami AR, Walker RP, Gray JE, Leegood RC (2007).** Phosphoenolpyruvate Carboxykinase in *Arabidopsis*: Changes in Gene Expression, Protein and Activity during Vegetative and Reproductive Development. *Plant Cell Physiol*, **48**, 441–450.



**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.

**Matte A, Tari LW, Goldie H, Delbaere LTJ (1997).** Structure and mechanism of phosphoenolpyruvate carboxykinase. *J Biol Chem*, **272**, 8105–8108.

**Mayer K, Schuller C, Wambutt R, Murphy G, Volckaert G, Pohl T, Dusterhoft A, Stiekema W, Entian KD, Terryn N (1999).** Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **402**, 769-777.

**Meredith FI, Purcell AE (1966).** Changes in the concentration of carotenes of ripening homestead tomatoes. *J Am Soc Hort Sci*, **89**, 544-548.

**Mitchell DE, Gadus MV, Madore MA (1992).** Patterns of assimilate production and translocation in muskmelon (*Cucumis melo* L.). *Plant Physiol*, **99**, 959–965.

**Mohr WP, Stein M (1969).** Fine structure of fruit development in tomato. *Can J Plant Sci*, **49**, 549–553.

**Moorhead G, Douglas P, Cotelle V, Harthill J, Morrice N, Meek S, Deiting U, Stitt M, Scarabel M, Aitken A, MacKintosh C (1999).** Phosphorylation-dependent interactions between enzymes of plant metabolism and 14-3-3 proteins. *Plant J*, **18**, 1–12.

**Muller CH (1940).** Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G (2007).**

**Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM and Shaw AS (1996).** Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell*, **84**, 889–897.

**Nishimura M, Beevers H (1979).** Subcellular distribution of gluconeogenic enzymes in germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol*, **64**, 31-37.

**Nitsch JP (1952).** Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P (2005).**

**Nogler GA (1984).** Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P (2005).**

**Obiadalla-Ali H, Fernie AR, Kossmann J, Lloyd JR (2004).** Developmental analysis of carbohydrate metabolism in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) fruits. *Physiologia Plantarum*, **120**, 1–9.

**Ολόμπιος ΧΜ (2001).** Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. *Σταμούλης, Αθήνα*, 40-44.

**Omidiji MO (1979).** Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD (1986).**

**Osborne DJ, Went FW (1953).** Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P (2005).**

**Osmond CB, Maxwell K, Popp M, Robinson S (1999).** On being thick: fathoming apparently futile pathways of photosynthesis and carbohydrate metabolism in succulent CAM plants. *In Plant carbohydrate biochemistry. (ed) Bryant JA, Burrell MM, Kruger NJ, BIOS, Oxford*, pp 183–200.

**Ostergts M, Finan TM, Stanley J (1991).** Site-directed mutagenesis and DNA sequence of pck A of *Rhizobium* NGR234, encoding phosphoenolpyruvate carboxykinase: gluconeogenesis and host-dependent symbiotic phenotype. *Mol Gen Genet*, **230**, 257-269.

**Petro-Turza M (1987).** Flavor of tomato and tomato products. *Food Rev Int*, **2**, 309-351.

**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 (1981).** Αναφορά από Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD (1986).**

**Preil W (1973).** Influence of temperature on the parthenocarpy of tomatoes. *Angew Bot*, **47**, 135-140.

**Quiros CF (1974).** Αναφορά από **Warnock SJ (1988).**

**Rabinowitch HD, Budowski P, Kedar N (1975).** Carotenoids and epoxide cycles in mature-green tomatoes. *Planta*, **122**, 91–97.

**Raffo A, Leopardi C, Fogliano V, Ambrosino P, Salucci M, Gennaro L, Bugianesi R, Giufridda F, Quaglia G (2002).** Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. *Naomi F1*) harvested at different ripening stages. *J Agr Food Chem*, **50**, 6550–6556.

**Raven JA (1988).** Acquisition of nitrogen by the shoots of land plants: its occurrence and implications for acid-base regulation. *New Phytol*, **109**, 1–20.

**Reiskind JB, Bowes G (1991).** The role of phosphoenolpyruvate carboxykinase in a marine macroalga with C4-like photosynthetic characteristics. *P Natl Acad Sci USA*, **88**, 2883–2887.

**Rhodes EE (1980).** The maturation and ripening of fruits. *In Senescence in Plants (ed.) Thimann KV*, pp 157–205.

**Rick CM (1976).** Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G (2007).**

**Rosso SW (1968).** Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD (1986).**

**Rick CM (1978).** The tomato. *Sci Amer*, **239**, 77-87

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

**Ruffner HP (1982).** Metabolism of tartaric and malic acids in *Vitis*: a review – Part B. *Vitis*, **21**, 346–358.

**Ruffner HP, Hawker JS (1977).** Control of glycolysis in ripening berries of *Vitis vinifera*. *Phytochemistry*, **16**, 1171–1175.

**Ruffner HP, Kliewer WM (1975).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase activity in grape berries. *Plant Physiol*, **56**, 67–71.

**Ruffner HP, Possner D, Brem S, Rast DM (1984).** The physiological role of malic enzyme in grape ripening. *Planta*, **160**, 444–448.

**Sáez-Vásquez J, Raynal M, Delseny M (1995).** A rapeseed cold-inducible transcript encodes a phosphoenolpyruvate carboxykinase. *Plant Physiol*, **109**, 611–618.

**Sawhney VK, Greyson RI (1971).** Induction of multilocular ovary in the tomato by gibberellic acid. *J Am Soc Hort*, **96**, 196-198.

**Schmid J, Amrhein N (1999).** The shikimate pathway. *In Plant amino acids: biochemistry and technology. (ed.) Singh B. Marcel Dekker, New York*, pp 147–169.

**Setha OE (1995).** Cherry tomato varietal trial. ARC Training report

**Simpson DJ, Baquar MR, McGlasson WB, Lee TH (1976).** Αναφορά από **Grierson D, Kader AA (1986).**

**Smith O (1935).** Αναφορά από **Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W (1993).**

**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.

**Sudom A, Walters R, Pastushok L, Goldie D, Prasad L, Delbaere LT, Goldie H (2003).** Mechanisms of activation of phosphoenolpyruvate carboxykinase

from *Escherichia coli* by  $\text{Ca}^{2+}$  and of desensitization by trypsin. *J Bacteriol*, **185**, 4233-4242.

**Suzuki I, Cretin C, Omata T, Sugiyama T (1994).** Transcriptional and post-transcriptional regulation of nitrogen-responding expression of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene in maize. *Plant Physiol*, **105**, 1223–1229.

**Taylor IB (1986).** Biosystematics of the tomato. In *The Tomato Crop*. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company, London, 1–34.

**Thomas TH (1982).** Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD (1986).**

**Tonin GS, Sodek L (1990).** Asparaginase, allantoinase and glutamine synthetase activities in soybean cotyledons grown in vitro. *Phytochemistry*, **29**, 2829–2831.

**Tortora P, Hanozet GM, Guerritore A (1985).** Purification of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Saccharomyces cerevisiae* and its use for bicarbonate assay. *Anal Biochem*, **144**, 179-185.

**Trapani S, Linss J, Goldenberg S, Fischer H, Craievich AF, Oliva G (2001).** Crystal structure of the dimeric phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) from *Trypanosoma cruzi* at 2 Å resolution. *J Mol Biol*, **313**, 1059-1072.

**Trevanion SJ, Brooks AL, Leegood RC (1995).** Control of gluconeogenesis by phosphoenolpyruvate carboxykinase in cotyledons of *Cucurbita pepo* L. *Planta*, **196**, 653–658.

**Tucker G, Walley P, Seymour G (2007).** Tomato. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Transgenic Crops 59* (ed. Pua EC, Davey MR) Springer-Verlag, 163-180.

**Varga A, Bruinsma J (1986).** Tomato. In: *CRC Handbook of Fruit Set and Development*. S.P. Monselise, ed (Boca Raton, FL: CRC Press), pp. 461-480.

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

**Vickery RS, Bruinsma J (1973).** Compartments and permeability for potassium in developing fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J Exp Bot*, **24**, 1261–1270

**Walker AJ (1975).** Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD (1986).**

**Walker RP, Leegood RC (1995).** Purification, and phosphorylation in vivo and in vitro, of phosphoenolpyruvate carboxykinase from cucumber cotyledons. *FEBS Lett*, **362**, 70-74.

**Walker RP, Leegood RC (1996).** Phosphorylation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. Studies in plants with C4 photosynthesis and Crassulacean acid metabolism and in germinating seeds. *Biochem J*, **317**, 653-658.

**Walker RP, Acheson RM, Técsi LI, Leegood RC (1997).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase in C4 plants: its role and regulation. *Aust J Plant Physiol*, **24**, 459-468.

**Walker RP, Chen Z-H, Técsi LI, Famiani F, Lea PJ, Leegood RC (1999).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase plays a role in interactions of carbon and nitrogen metabolism during grape seed development. *Planta*, **210**, 9-18.

**Walker RP, Chen Z-H, Acheson RM, Leegood RC (2000).** The regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in plants. *American Society of Plant Physiologists Annual Meeting, Abstracts*.

**Walker RP, Chen Z-H, Acheson RM, Leegood RC (2002).** Effects of phosphorylation on phosphoenolpyruvate carboxykinase from the C4 plant, Guinea grass. *Plant Physiol*, **128**, 165-172.

**Wangdi PC (1992).** Cherry tomato varietal trial. *In: Training report 1991. 10th Regional Training Course in Vegetable Production and Research. AVRDC-TOP Bangkok, Thailand*

**Warnock SJ (1988).** A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *Hortscience*, **23**, 669-673.

**Wingler A, Walker RP, Chen Z-H, Leegood RC (1999).** Phosphoenolpyruvate carboxykinase is involved in the carboxylation of aspartate in the bundle sheath of maize. *Plant Physiol*, **120**, 539-545.

**Wilson LA, Sterling C (1976).** Studies on the cuticle of tomato fruit. I. Fine structure of the cuticle. *Z Pflanzenphysiol*, **77**, 359 - 371.

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

## 7. Εικόνες

|  |    |
|--|----|
| ΕΙΚΟΝΑ 1-1: ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΠΕΝΤΑΧΩΡΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΤΟΜΑΤΑΣ.....  | 6  |
| ΕΙΚΟΝΑ 1-2: ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΔΙΧΩΡΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΤΟΜΑΤΑΣ .....  | 7  |
| ΕΙΚΟΝΑ 1-3: Η ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΜΗΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΚΙΤΡΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ.(ΑΠΟ DAVIES AND HOBSON, 1981).....  | 16 |
| ΕΙΚΟΝΑ 1-4: Η ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΗΣ ΚΑΙ ΤΡΙΤΟΤΑΓΗΣ ΔΟΜΗ ΤΗΣ ΡΕΡΣΚ ΤΟΥ E.COLI. ΟΙ ΕΛΙΚΕΣ ΕΙΝΑΙ ΚΟΚΚΙΝΕΣ, ΟΙ ΔΟΜΕΣ ΠΤΥΧΩΤΗΣ ΔΙΑΤΑΞΗΣ ΜΠΛΕ, Η ΜΙΚΡΗ ΓΑΛΑΖΙΑ ΣΦΑΙΡΑ ΕΙΝΑΙ ΙΟΝ $Mg^{2+}$ ΚΑΙ Η ΠΡΑΣΙΝΗ ΙΟΝ $Ca^{2+}$ , ΤΟ ΑΤΡ ΕΙΝΑΙ ΜΩΒ ΚΑΙ ΤΟ ΠΥΡΟΣΤΑΦΥΛΙΚΟ ΟΞΥ ΚΙΤΡΙΝΟ (SUDOM ET AL., 2003). .....                                     | 19 |
| ΕΙΚΟΝΑ 2-1: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΠΑΡΑΣΤΑΣΗ ΤΩΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΩΝ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ. ....   | 29 |
| ΕΙΚΟΝΑ 2-2: ΤΑ 5 ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΤΟΜΑΤΑΣ ΤΥΠΟΥ CHERRY ΒΑΣΗ ΤΩΝ ΟΠΟΙΩΝ ΕΓΙΝΕ Η ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ. (Α) ΑΝΩΡΙΜΟΣ ΚΑΡΠΟΣ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ 0,5CM ΚΑΙ (Β) 1,5CM, (C) ΩΡΙΜΟΣ ΠΡΑΣΙΝΟΣ ΚΑΡΠΟΣ, (D) ΚΑΡΠΟΣ ΣΤΗΝ ΑΛΛΑΓΗ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ (Ε) ΚΟΚΚΙΝΟΣ ΩΡΙΜΟΣ ΚΑΡΠΟΣ. ....   | 30 |
| ΕΙΚΟΝΑ 3-1: ΈΛΕΓΧΟΣ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΣΩΜΑΤΩΝ. ΤΑΙΝΙΑ (Α) ΧΡΩΣΗ ΟΛΙΚΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΜΕ COOMASSIE BRILLIANT BLUE R 250, ΤΑΙΝΙΑ (Β) ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΡΕΡΣΚ ΜΕΤΑ ΤΗΝ ΗΛΕΚΤΡΟΜΕΤΑΦΟΡΑ ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΜΕΜΒΡΑΝΗ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ. ....   | 45 |
| ΕΙΚΟΝΑ 3-2: ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΑΝΩΡΙΜΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ 0,5CM. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΑΚΡΙΝΕΤΑΙ ΜΕ ΜΠΛΕ-ΜΟΒ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟ. ΈΝΘΕΤΑ, ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΜΕ ΣΑΦΡΑΝΙΝΗ. ΖΠ, ΖΕΛΑΤΙΝΩΔΕΣ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑ, ΗΔ, ΗΘΑΓΓΕΙΩΔΗΣ ΔΕΣΜΙΔΑ, ΠΕ, ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟ, ΣΒ, ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΗ ΒΛΑΣΤΗ.....   | 46 |
| ΕΙΚΟΝΑ 3-3: ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΑΝΩΡΙΜΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ 1,5CM. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΑΚΡΙΝΕΤΑΙ ΜΕ ΜΠΛΕ-ΜΟΒ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟ. ΈΝΘΕΤΑ, ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΜΕ ΣΑΦΡΑΝΙΝΗ. ΖΠ, ΖΕΛΑΤΙΝΩΔΕΣ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑ, ΗΔ, ΗΘΑΓΓΕΙΩΔΗΣ ΔΕΣΜΙΔΑ, ΠΕ, ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟ, ΣΒ, ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΗ ΒΛΑΣΤΗ. ....  | 47 |
| ΕΙΚΟΝΑ 3-4: ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΩΡΙΜΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΚΑΡΠΟΥ. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΑΚΡΙΝΕΤΑΙ ΜΕ ΜΠΛΕ-ΜΟΒ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟ. ΈΝΘΕΤΑ, ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΜΕ ΣΑΦΡΑΝΙΝΗ. ΖΠ, ΖΕΛΑΤΙΝΩΔΕΣ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑ, ΗΔ, ΗΘΑΓΓΕΙΩΔΗΣ ΔΕΣΜΙΔΑ, ΠΕ, ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟ, ΚΟ, ΚΟΤΥΛΗΔΟΝΕΣ, ΡΙ, ΡΙΖΙΔΙΟ, ΥΠ, ΥΛΩΔΕΣ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑ, ΣΒ, ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΗ ΒΛΑΣΤΗ. .... | 48 |
| ΕΙΚΟΝΑ 3-5: ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΑΛΛΑΓΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΣ. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΑΚΡΙΝΕΤΑΙ ΜΕ ΜΠΛΕ-ΜΟΒ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟ. ΈΝΘΕΤΑ, ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΜΕ ΣΑΦΡΑΝΙΝΗ. ΖΠ, ΖΕΛΑΤΙΝΩΔΕΣ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑ, ΠΕ, ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟ, ΕΝ, ΕΝΔΟΣΠΕΡΜΙΟ, ΣΒ, ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΗ ΒΛΑΣΤΗ. ....   | 49 |
| ΕΙΚΟΝΑ 3-6: ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΩΡΙΜΟΥ ΚΟΚΚΙΝΟΥ ΚΑΡΠΟΥ. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΑΚΡΙΝΕΤΑΙ ΜΕ ΜΠΛΕ-ΜΟΒ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟ. ΈΝΘΕΤΑ, ΜΑΡΤΥΡΑΣ   |    |

|  |    |
|--|----|
| ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΜΕ ΣΑΦΡΑΝΙΝΗ. ΖΠ, ΖΕΛΑΤΙΝΩΔΕΣ ΠΑΡΕΓΧΥΜΑ, ΠΕ, ΠΕΡΙΚΑΡΠΙΟ, ΣΠ, ΣΠΕΡΜΑ, ΣΒ, ΣΠΕΡΜΑΤΙΚΗ ΒΛΑΣΤΗ. ....   | 50 |
| ΕΙΚΟΝΑ 3-7: ΛΕΠΤΟΜΕΡΕΙΑ ΑΝΟΣΟΕΝΤΟΠΙΣΜΟΥ ΣΕ ΣΠΕΡΜΑΤΑ ΩΡΙΜΟΥ ΚΟΚΚΙΝΟΥ ΚΑΡΠΟΥ. Η ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΔΙΑΚΡΙΝΕΤΑΙ ΜΕ ΜΠΛΕ-ΜΟΒ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΟ. ΈΝΘΕΤΑ, ΜΑΡΤΥΡΑΣ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΕΝΟΣ ΜΕ ΣΑΦΡΑΝΙΝΗ. ΕΝ, ΕΝΔΟΣΠΕΡΜΙΟ, ΚΟ, ΚΟΥΛΗΔΟΝΕΣ, ΡΙ, ΡΙΖΙΔΙΟ. ....   | 51 |
| ΕΙΚΟΝΑ 3-8: Η ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΕΝΗ ΑΜΙΝΟΞΙΚΗ ΑΚΟΛΟΥΘΙΑ ΤΗΣ ΡΕΡCK ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ (SOLLC) ΕΥΘΥΓΡΑΜΜΙΣΤΗΚΕ ΜΕ ΤΙΣ ΗΔΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΕΝΕΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΕΣ ΤΗΣ ΡΕΡCK ΤΩΝ POPULUS TRICHOCARPA, FLAVERIA PRINGLEI, ARABIDOPSIS THALIANA, ZEA MAYS ΚΑΙ ORYZA SATIVA ΙΑΡΟΝΙΣ ΤΑ ΜΑΥΡΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΥΠΟΔΗΛΩΝΟΥΝ ΣΥΝΤΗΡΗΜΕΝΑ ΑΜΙΝΟΞΕΑ ΣΤΗΝ ΠΛΕΙΟΨΗΦΙΑ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ. .... | 52 |

## 8. Πίνακες

|   |    |
|---|----|
| ΠΙΝΑΚΑΣ 1-1: Η ΠΟΣΟΣΤΙΑΙΑ ΣΥΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΞΗΡΗΣ ΟΥΣΙΑΣ ΤΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ.....  | 15 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 2-1: ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ PCR .....  | 44 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 3-1: ΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΩΝ ΑΜΙΝΟΞΙΚΩΝ ΑΚΟΛΟΥΘΙΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΚΥΠΤΟΥΝ ΑΠΟ ΤΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΡΕΡСК ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ (SOLLC) ΚΑΙ ΤΩΝ POPULUS TRICHOCARPA (POPTR), FLAVERIA PRINGLEI (FLAPR) ARABIDOPSIS THALIANA (ARATH), ZEA MAYS (ZEAMA), ΚΑΙ ORYZA SATIVA JAPONICA (ORYSJ).....        | 53 |
| ΠΙΝΑΚΑΣ 3-2: Η ΣΥΣΣΩΡΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ (ΣΧΕΤΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ) ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ ΤΗΣ ΡΕΡСК (AY007226) ΣΤΑ ΣΤΑΔΙΑ ΤΟΥ ΑΝΩΡΙΜΟΥ ΚΑΡΠΟΥ ΔΙΑΜΕΤΡΟΥ 15MM, ΤΟΥ ΠΡΑΣΙΝΟΥ ΚΑΡΠΟΥ (MATURE GREEN), ΑΛΛΑΓΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΣ (BREAKER) ΚΑΙ ΤΟΥ ΩΡΙΜΟΥ ΚΟΚΚΙΝΟΥ ΚΑΡΠΟΥ (RED RIPE), ΣΕ ΠΑΡΘΕΝΟΚΑΡΠΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΕΝΣΠΕΡΜΟΥΣ ΚΑΡΠΟΥΣ. . | 54 |