



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ



**Μελέτη της εναλλακτικής οξειδάσης (ΑΟΧ) σε παρθενοκαρπικούς και
ένσπερμους καρπούς τομάτας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Διαμαντής Χρυσόστομος

ΑΘΗΝΑ 2011

**Η ανάθεση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής έγινε με την υπ. αριθ. 4
18/11/2009 απόφαση της Γενικής Συνέλευσης του τμήματος Γεωπονικής
Βιοτεχνολογίας κατά την οποία εγκρίθηκαν το θέμα και η τριμελής εξεταστική
επιτροπή της μελέτης.**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Αν. Καθηγητής Γ. Αϊβαλάκις, Επιβλέπων

Καθηγητής Κ. Φασσέας, Μέλος

Καθηγητής Σ. Κίντζιος, Μέλος

Περίληψη

Η ΑΟ είναι ένα ένζυμο που προσφέρει εναλλακτική οδό μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνοής που δεν προσφέρει ενέργεια στο κύτταρο. Με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων ανοσοεντοπίστηκε το ένζυμο στους ιστούς παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας τύπου "cherry". Επίσης, μέσω RT-PCR μελετήθηκε το πλήθος των μεταγραφημάτων δύο ισοτύπων της ΑΟΧ στα ίδια δείγματα. Το ένζυμο ανιχνεύτηκε σε ιστούς αυξημένης μεταβολικής δραστηριότητας, ενώ η μελέτη του πλήθους των μεταγραφημάτων έδειξε διαφορές ανάμεσα στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς στα στάδια του ώριμου πράσινου καρπού και αλλαγής του χρώματος. Οι παραπάνω διαφορές οφείλονται κατά πάσα πιθανότητα στην μεταβολική δραστηριότητα του σπέρματος κατά την ωρίμανση του.

Λέξεις κλειδιά: εναλλακτική οξειδάση, ΑΟΧ, ανοσοεντοπισμός, RT-PCR, τομάτα, cherry, καρποί,

Abstract

AO is an enzyme that provides an alternative route of electron transport in the respiratory chain that do not provide power to the cell. By using polyclonal antibodies the enzyme was immunolocalized in tissues of seeded and seedless "cherry" tomato fruits during their development. Moreover using RT-PCR the levels of transcripts of two AOX isoforms was studied in the same samples. The enzyme was detected in tissues with high metabolic activity, while the study of of transcripts abundance showed differences among seeded and seedless fruits in the stages of mature green fruit and breaker (change of fruit color). These differences are probably due to the metabolic activity of the seeds.

key words: Alternative oxidase, AOX, immunolocalization, RT-PCR, tomato, cherry, fruits.

Περιεχόμενα

1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας	10
1.1.2 Φυλογένεση - βοτανική ταξινόμηση και καταγωγή της τομάτας τύπου cherry	10
1.1.3 Διαιτητική αξία του καρπού της τομάτας τύπου cherry	11
1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry	13
1.1.5 Μορφολογία και ανατομία του καρπού	14
1.1.6 Η ανάπτυξη του καρπού	17
1.1.6.1 Πρώιμη ανάπτυξη καρπού	17
1.1.6.2 Ώριμος πράσινος καρπός	20
1.1.6.3 Ωρίμανση του καρπού	21
1.2 Η Παρθενοκαρπία	22
1.2.1 Οι τρεις κύριες πηγές παρθενοκαρπίας στην τομάτα (<i>pat-1, pat-2 pat-3/pat-4</i>)	23
1.2.2 Μηχανισμός της παρθενοκαρπίας	24
1.2.3 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα	27
1.2.4 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία	28
1.2.5 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας	28
1.3.1 Η κυτταρική αναπνοή	30
1.3.2 Οι κύριοι μεταβολικοί οδοί	31
1.4.1 Η εναλλακτική Οξειδάση (Alternative Oxidase) (EC 1,-)	34
1.4.2 Έκφραση του γονιδίου	38
1.4.3 Ρύθμιση της δραστηρότητας του ενζύμου	38
2. Υλικά και μέθοδοι	40
2.1 Η διαδικασία του πειράματος	40
2.2 Το φυτικό υλικό	40
2.3 Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων	42
2.3.1. Εκχύλιση των ενζύμων	42
2.3.2. Ηλεκτροφορήσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών	43
2.3.3. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης	44
2.3.4. Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων	45
2.4 Ανοσοεντοπισμός	47
2.4.1. Προσήλωση	47
2.4.2. Αφυδάτωση	47
2.4.3. Διαφανοποίηση	47
2.4.4. Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη	48
2.4.5. Προετοιμασία αντικειμενοφόρων	48
2.4.6. Μικροτόμηση	48
2.4.6. Αποπαραφίνωση	49
2.4.7. Ανοσοεντοπισμός	49
2.5. Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την ΑΟΧ στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού	51
2.5.1. Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς	51
2.5.2. Έλεγχος της ποιότητας του παραλαμβανόμενου RNA	54
2.5.3. Υδρόλυση DNA των δειγμάτων	55
2.5.4. Παρασκευή cDNA	56

2.5.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (RT-PCR).....	57
3. Αποτελέσματα	60
3.1 Ανοσοεντοπισμός της ΑΟΧ.....	60
3.1.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm	60
3.1.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm	62
3.1.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού.....	64
3.1.4 Στάδιο αλλαγής χρώματος.....	65
3.1.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού.....	67
3.2 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων	69
3.3 Πληθώρα μεταγραφημάτων της ΑΟΧ κατά την ανάπτυξη των ένσπερων και παρθενοκαρπικών καρπών.	70
4. Συζήτηση/Συμπεράσματα	71
5. Βιβλιογραφία.....	73

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την άμεση επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι, στα πλαίσια του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών στην κατεύθυνση "Βιοδραστικά Προϊόντα & Πρωτεϊνική Τεχνολογία".

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον κ. Γ. Αϊβαλάκι για τη βοήθειά του σε όλα τα στάδια πραγματοποίησης αυτής της μελέτης και για την μεταφορά της εμπειρίας του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους Αν. Καθηγητές κ. Κ. Φασσέα και κ. Σ. Κίντζιο, για τον χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη και την αξιολόγηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω το προσωπικό του εργαστηρίου Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, τους συναδέλφους Γ. Τσανικλίδη, Γ. Τσιλικόχρυσο, Β. Ρούνη και Μ. Χριστάκη για την ομαλή συνεργασία και τη βοήθειά τους σε τρέχοντα ζητήματα της παρούσας μελέτης, καθώς και τον Γιάννη Καραπάνο και το Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών για την παροχή φυτικού υλικού.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου συμπαραστάση εκ μέρους τους και τη συμβολή τους στην ολοκλήρωση αυτής της μελέτης.

1.1 Η τομάτα cherry

1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας

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

Η οικογένεια Solanaceae περιλαμβάνει περίπου 90 γένη και 3000-4000 είδη. Το γένος *Solanum* τοποθετείται μέσα στην υποοικογένεια Solanoideae (Tucker et al., 2007).

Ο Muller (1940) διαχώρισε το γένος σε δύο κύρια υπογένη με βάση το χρώμα των καρπών: το *Eulycopersicon* (έγχρωμοι καρποί) και *Eriopersicon* (πράσινοι καρποί). Ο Rick (1976) πρότεινε έναν πιο αναλυτικό και αντικειμενικό διαχωρισμό, ο οποίος κατατάσσει τα είδη σε δύο κύρια συμπλέγματα: το *esculentum*, που περιλαμβάνει 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).

1.1.2 Φυλογένεση - βοτανική ταξινόμηση και καταγωγή της τομάτας τύπου cherry

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

Η τομάτα τύπου cherry (*S. lycopersicon* var. *cerasiforme*) είναι σχεδόν βέβαιο ότι, αποτελεί τον άμεσο πρόγονο των σύγχρονων καλλιεργούμενων 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 «Ρομί 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).

1.1.3 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 μεγαλόκαρπες τομάτες (Hallman and Kobryń, 2003). Εκτός αυτού, εμφανίζουν και υψηλότερη περιεκτικότητα σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και οργανικών οξέων (κιτρικό και μηλικό), τα οποία αποτελούν βασικούς παράγοντες στον προσδιορισμό της γλυκύτητας, της οξύτητας και γενικά της έντασης της γεύσης των καρπών της τομάτας (Raffo et al., 2002).

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

Ακόμη, η διαιτητική αξία των καρπών τύπου cherry είναι υψηλή, γιατί περιέχουν ικανοποιητικές ποσότητες βιταμινών, ιχνοστοιχείων, αλάτων και αντιοξειδωτικών, απαραίτητων για βασικές λειτουργίες του οργανισμού με χαμηλό θερμιδικό και ενεργειακό δυναμικό. Αναφέρεται ότι 100g ώριμης τομάτας τύπου cherry, παρέχουν 22 θερμίδες ενέργειας, 1,1g πρωτεΐνης, 0,2g λίπους, 4,7g υδατανθράκων, 13mg Ca, 27mg P, 0.5mg Fe, 3mg Na, 900 IU βιταμίνης A, 0,06mg βιταμίνης B1, 0,04mg βιταμίνης B2, 0,7mg νιασίνης και 23mg βιταμίνης C (FAO, 1985). Οι καρποί τομάτας τύπου cherry αποτελούν καλή πηγή βιταμινών και αλάτων, με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (Long, 1998), ενώ χαρακτηρίζονται από σχετικά υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών (ιδιαίτερα καροτενοειδών όπως το λυκοπένιο και το β-καροτένιο) που τους προσδίδει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Raffo et al., 2002).

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

1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry

Βλαστός

Το φυτό τομάτας τύπου cherry χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευρωστία και μπορεί να φτάσει σε ύψος τα 3,0-3,6m. Όσο 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 ημι-καθορισμένης (semi-determinate) και καθορισμένης (determinate) ανάπτυξης. Μάλιστα, στις ποικιλίες με απεριόριστη ανάπτυξη το μήκος του κεντρικού βλαστού μπορεί να φθάσει και 10 ή περισσότερα μέτρα όταν το φυτό κλαδεύεται σε μονοστέλεχο σύστημα (Ολύμπιος, 2001).

Φύλλα

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

Άνθη-ταξιανθίες

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

Σπέρματα

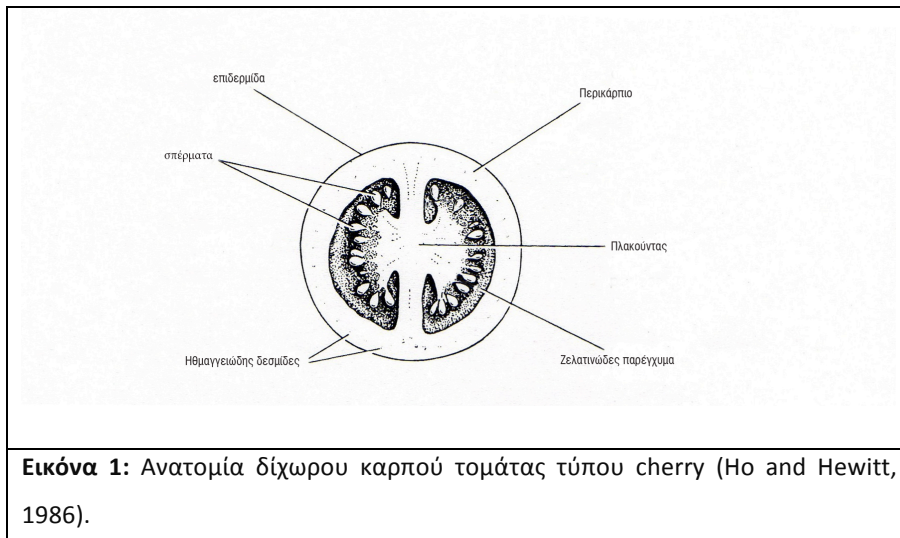
Το βάρος των σπερμάτων δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των ποικιλιών cherry και των μεγαλόκαρπων ποικιλιών. Το βάρος 1000 σπόρων της cherry είναι περίπου 2.1g ενώ στις μεγαλόκαρπες τομάτες είναι περίπου 2.2g (Xuan, 1999).

Καρπός

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 (Rubatzky 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.

1.1.5 Μορφολογία και ανατομία του καρπού

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



Περικάρπιο

Το περικάρπιο προέρχεται από τα τοιχώματα της ωθήκης και αποτελείται από το εξωκάρπιο, από το παρεγχυματικό μεσοκάρπιο με τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και από ένα

μονοκύτταρο στρώμα ενδοκαρπίου που επικαλύπτει χώρους που βρίσκονται οι σπερματικές βλάστες.

Τα κύτταρα του περικαρπίου υφίστανται ανατομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας σχηματισμού του καρπού. Μία έως δύο μέρες μετά τη γονιμοποίηση, τα μικρά χυμοτόπια μέσα σε κάθε κύτταρο ενώνονται ώστε να σχηματιστεί ένα κεντρικό χυμοτόπιο (Mohr and Stein, 1969). Στις ακόλουθες δύο εβδομάδες το κυτταρόπλασμα μειώνεται σε ένα λεπτό περιφερειακό στρώμα. 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 πλασμάλημμα και ο τονοπλάστης παραμένουν άθικτοι (Mohr and Stein, 1969) και φυσιολογικώς ενεργοί (Vickery and Bruinsma, 1973) στη διάρκεια ωρίμανσης του καρπού. Τα μιτοχόνδρια, οι χρωμοπλάστες και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, διατηρούνται και στους ώριμους καρπούς (Crookes and Grierson, 1983). Τα πλαστίδια περιέχουν άμυλο και διαθέτουν τυπικές περιοχές grana και θυλακοειδείς μεμβράνες στρώματος (Harris and Spurr, 1969). Στους πράσινους καρπούς τα επιδερμικά κύτταρα τείνουν να έχουν λιγότερο άμυλο σε σχέση με αυτά του εσωτερικού παρεγχύματος (Rosso, 1968). Ο κύριος όγκος της κυτταρικής διαίρεσης στο περικάρπιο πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά την άνθηση (Davies and Cocking, 1965) αν και οι Asahira et al. (1968) αναφέρουν πως κυτταρικές διαιρέσεις μπορεί να υπάρξουν και κατά τη δεύτερη εβδομάδα. Ωστόσο, στο *L. pimpinellifolium* κυτταρική διαίρεση παρατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού (Houghtalin, 1935).

Το εξωκάρπιο

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.

Το ζελατινώδες παρέγχυμα

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

Ο πλακούντας

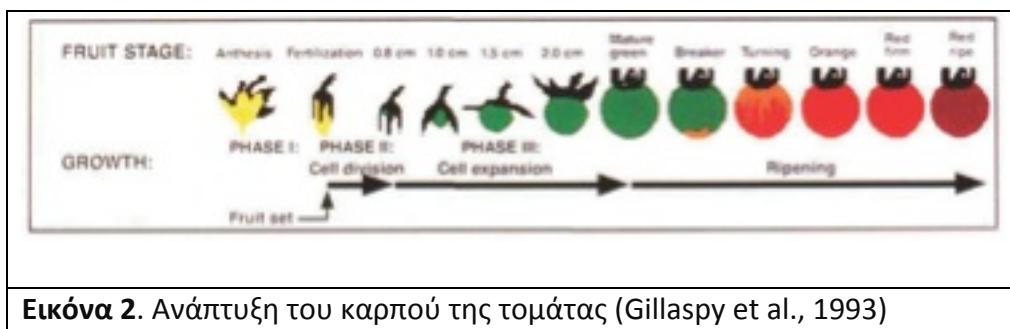
Ο πλακούντας είναι η περιοχή της ωοθήκης από την οποία εκφύονται οι σπερματικές βλάστες με τις οποίες συνδέονται μέσω του ομφαλικού ιμάντα. Μετά τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου εξελίσσονται σε σπέρματα. Ο πλακούντας θεωρείται ο ιστός που τροφοδοτεί τις σπερματικές βλάστες με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία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

Ηθμαγγειώδεις δεσμίδες

Στους καρπούς της τομάτας απαντούν δύο κύριες διακλαδώσεις του αγγειακού ιστού. Η μία επεκτείνεται από τον ποδίσκο διαμέσου των εξωτερικών 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).

1.1.6 Η ανάπτυξη του καρπού

Στις σύγχρονες ποικιλίες τομάτας η ανάπτυξη του καρπού αρχίζει με τη γονιμοποίηση. Το νωπό βάρος της ωθήκης 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 ωθήκης παύει κατά την άνθηση αλλά ξαναρχίζει μετά τη γονιμοποίηση. Η είσοδος προϊόντων αφομοίωσης από τα φύλλα στην ωθήκη 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 τη 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.



1.1.6.1 Πρώιμη ανάπτυξη καρπού

Σύμφωνα με τους Gillaspy et al. (1993) η πρώιμη ανάπτυξη του καρπού μπορεί επιπλέον να διαχωριστεί σε τρεις φάσεις (Εικόνα 2). 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:

1^η 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 Gillapsy 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 μέγεθος της. Στη φάση αυτή η δραστηριότητα των κυτταρικών διαιρέσεων παραμένει προσωρινά μειωμένη μέχρι να ολοκληρωθεί η γονιμοποίηση.

Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης η εξέλιξη της καρπόδεσης έπεται την επιτυχημένη ολοκλήρωση της επικονίασης και γονιμοποίησης. Η γονιμοποίηση που ακολουθεί την επικονίαση προϋποθέτει τη βλάστηση της γύρης, τη διείσδυση και 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.

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

Στον καρπό της τομάτας, αμέσως μετά τη γονιμοποίηση, ενεργοποιούνται οι κυτταροδιαιρέσεις στην ωοθήκη οι οποίες και διαρκούν περίπου επτά έως δέκα ημέρες (Bohner and Bangerth, 1988). Μετά την ολοκλήρωση της φάσης των κυτταρικών διαιρέσεων και για τις επόμενες έξι έως επτά εβδομάδες παρατηρείται μεγέθυνση των κυττάρων και συνεπώς του καρπού. Πριν την μεγέθυνση τους τα διαιρούμενα κύτταρα του καρπού είναι μικρά σε μέγεθος, σφικτά συμπιεσμένα και πλούσια σε κυτταροπλασματικές ουσίες, ενώ διαθέτουν και μικρά χυμοτόπια. Καθώς μεγαθύνονται τα κύτταρα, το αρχικό κυτταρικό τοίχωμα και το κυτόπλασμα γίνονται ολοένα και λεπτότερα, ενώ τα χυμοτόπια καταλαμβάνουν όλο και μεγαλύτερη αναλογία στον κυτταρικό χώρο (Gillaspay et al. 1993).

Κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης η κυτταρική διαίρεση είναι πιο έντονη στο περικάρπιο και στον πλακούντα (Varga and Bruinsma, 1986) (Εικόνα 3).

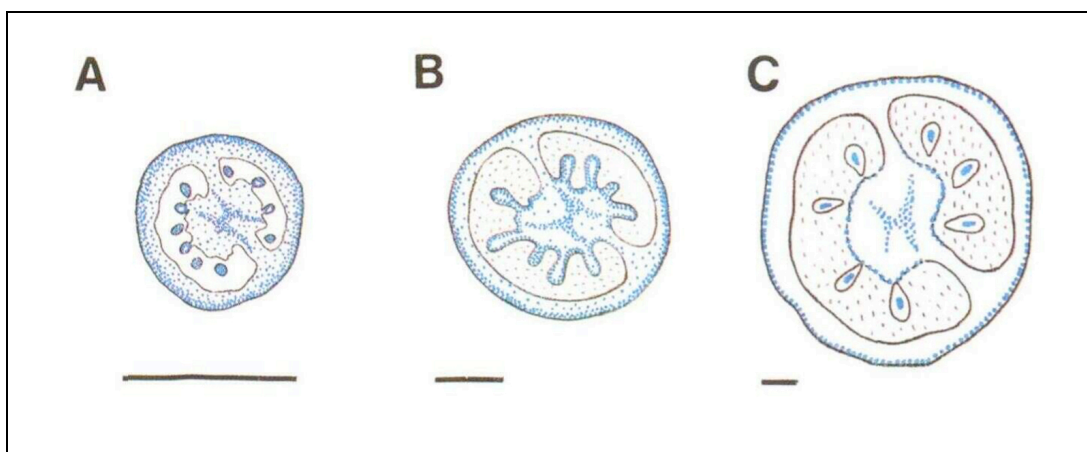
Στα πολύ πρώιμα στάδια της φάσης αυτής η μιτωτική δραστηριότητα είναι πιο έντονη στο εξωτερικό περικάρπιο σε σχέση με το εσωτερικό. Οι κυτταρικές διαιρέσεις στα αναπτυσσόμενα σπέρματα γίνονται κυρίως στις περιφερειακές στιβάδες των χιτώνων παρά στο έμβρυο.

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

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

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 (Gillaspy et al., 1993).



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

1.1.6.2 Ώριμος πράσινος καρπός

Στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού τα παρεγχυματικά κύτταρα του περικαρπίου έχουν διάμετρο μεταξύ 300-500 μ m 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 C_3 φυτού. Επίσης, στους χλωροπλάστες του ανώριμου καρπού μπορούν να διακριθούν και αμυλόκοκκοι αλλά μειώνονται όσο η ανάπτυξη πλησιάζει τον πράσινο ώριμο καρπό. Οι χλωροπλάστες επίσης περιέχουν τις χρωστικές του καρπού, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Οι επικρατέστερες χρωστικές στους πράσινους καρπούς

αποτελούνται από ένα μίγμα χλωροφύλλης α και β. Αντίθετα, τα καροτενοειδή απαντούν σε μικρές ποσότητες. Μάλιστα, περισσότερο από το μισό αυτών αποτελούν οι ξανθοφύλλες, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια του πράσινου ώριμου καρπού, ενώ καθώς ο καρπός ωριμάζει η αναλογία αυτή μειώνεται (Rabinowitch et al., 1975). Τέλος, υπάρχουν α- και β- καροτένια σε μικρές όμως συγκεντρώσεις (Meredith and Purcell, 1966).

1.1.6.3 Ωρίμανση του καρπού

Η μετατροπή του καρπού της τομάτας από το ώριμο πράσινο στάδιο στο πλήρως ώριμο κόκκινο περιλαμβάνει δραματικές αλλαγές στο χρώμα, στη σύνθεση, στο άρωμα, στη γεύση και στη δομή του. Η ωρίμανση αποτελεί μια ιδιαίτερη διαδικασία που περιλαμβάνει αντιδράσεις σύνθεσης αλλά και αποδόμησης. Μάλιστα, επιφέρει αλλαγές στο μεταβολισμό και στην έκφραση γονιδίων, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές διαφοροποιήσεις της ποιότητας του καρπού. Οι αλλαγές αυτές είναι συντονισμένες καθώς υφίστανται 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 χλωροπλάστων σε χρωμοπλάστες (Harris and Sprurr, 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 (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 (Gorguet et al., 2005), 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 (Gorguet et al., 2005). 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 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 (Tucker et al., 2007). 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 γήρανση 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 Οι τρεις κύριες πηγές παρθενοκαρπίας στην τομάτα (*pat-1*, *pat-2* *pat-3/pat-4*)

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

Το γονίδιο *pat-1*

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

συνθήκες για την παραγωγή σπόρων, τα μεταλλάγματα αυτά δίνουν χαμηλά ποσοστά καρπόδεσης (Mazzucato et al., 1998; Pecaut and Philouze, 1978).

Η μετάλλαξη *pat-1* παράγει καρπούς τομάτας με βάρος και μέγεθος που βρίσκεται περίπου στα δύο τρίτα ενός κανονικού καρπού (Philouze and Pecaut, 1986).

Το γονίδιο *pat-2*

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

Τα γονίδια (*pat-3/pat-4*).

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

1.2.2 Μηχανισμός της παρθενοκαρπίας

Έχει αναφερθεί ότι οι γιββερελλίνες προάγουν την ανάπτυξη άσπερμων καρπών (Fos et al., 2000). Επίσης, για τη σειρά *RP75/59* προτάθηκε ότι τα *pat-3/pat-4* είναι υπεύθυνα για την αύξηση της συγκέντρωσης του GA₁ και του GA₃ στις ωθήκες πριν την επικονίαση (Fos et al., 2001). Πρόσφατα, η ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα κλειδιά που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των γιββερελλινών έδειξε μια υψηλή και συνεχής έκφραση του GA_{20-ox1} στις ωθήκες των *pat-1* μεταλλάξεων, όταν στις ωθήκες του άγριου τύπου η

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

Οι πολυαμίνες επίσης συμμετέχουν στην πρώιμη ανάπτυξη του άσπερμου καρπού. Οι πολυαμίνες είναι απαραίτητες για την παρθενοκαρπική ανάπτυξη των ωοθηκών των *pat-2*. Οι Fos et al. (2003) έδειξαν ότι η προσθήκη πολυαμινών προάγει μερικώς την καρπόδεση και την ανάπτυξη των άγριων τύπων ωοθηκών στην ποικιλία τομάτας *Madrigal*. Δεν έχει ακόμη ξεκαθαριστεί εάν οι γιββερελλίνες και οι πολυαμίνες ενεργούν ανεξάρτητα στην καρπόδεση της τομάτας, αλλά η χαμηλότερη αποτελεσματικότητα των πολυαμινών συγκρινόμενη με εκείνη των γιββερελλινών προτείνει πως οι πολυαμίνες δεν λειτουργούν ως το πρωταρχικό σήμα (Fos et al., 2003). Μάλιστα, οι Alabadi et al. (1996) αναφέρουν ότι συγκεκριμένα βιοσυνθετικά μονοπάτια πολυαμινών παρουσιάζονται πιο ενεργά μετά τη χορήγηση αυξινών και γιββερελλινών. Πιθανόν, το γονίδιο *pat-2* ενεργοποιεί το μονοπάτι βιοσύνθεσης της πολυαμίνης μέσω υψηλών GA επιπέδων στις μη επικονιασμένες ωοθήκες *pat-2* (Fos et al., 2003). Συνεπώς, τα γονίδια *pat-1*, *pat-2*, και *pat3/pat-4* ενεργοποιούν ένα ή και περισσότερα μονοπάτια στη βιοσύνθεση του GA, με αποτέλεσμα την πιο έντονη έκφραση των ενεργών GAs, οι οποίες με την σειρά τους προάγουν το σχηματισμό παρθενοκαρπικών καρπών.

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

Ο ρόλος της αυξίνης στην παρθενοκαρπία αναβαθμίστηκε με την εισαγωγή του γονιδίου *ARF8* στο *Arabidopsis* και του *IAA9* στην τομάτα. Στο μετάλλαγμα *fwf* του *Arabidopsis*, ο παράγοντας απόκρισης στην αυξίνη 8 (ARF8) είχε ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό της ανάπτυξης του καρπού από επικονίαση και γονιμοποίηση και οδήγησε στο σχηματισμό

παρθενοκαρπικού καρπού (Goetz et al., 2006). Όταν το ARF8 είναι λειτουργικό, τότε εμφανίζεται ως αναστολέας καθώς σταματά την περαιτέρω ανάπτυξη της ωοθήκης όταν δεν υπάρχει γονιμοποίηση. Μάλιστα, προτείνεται πως το ARF8 προσδένεται στις πρωτεΐνες Aux/IAA ώστε να σχηματισθεί πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο προσδένεται στους προαγωγείς ενός εύρους γονιδίων που αποκρίνονται στην αυξίνη τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη του σχηματισμού των καρπών και την ανάπτυξή τους.

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

Η σημασία των ενδογενών γιββερελλινών στην ανάπτυξη του παρθενοκαρπικού καρπού δεν είναι απαραίτητο ότι θα διαρκέσει για ολόκληρη την περίοδο σχηματισμού του. Το επίπεδο των ενδογενών γιββερελλινών κατά τη διάρκεια και μετά από τη φάση της ταχύτατης αύξησης (3 με 4 εβδομάδες μετά την άνθηση) μπορεί να μην είναι σημαντική για τη μετέπειτα ανάπτυξη του καρπού. Αντίθετα, ένα χαμηλό επίπεδο ενδογενών γιββερελλινών 1-4 εβδομάδες μετά την άνθηση ενδέχεται να προκαλέσει παρεμπόδιση της ανάπτυξης (Kataoka et al., 2004).

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

επικονιασμένους καρπούς, η αυξίνη πιθανόν συντίθεται στα αναπτυσσόμενα σπέρματα διότι σε αυτά οι συγκεντρώσεις της αυξίνης είναι υψηλότερη (Kojima et al., 2003).

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

1.2.3 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα

Σε αρχικές μελέτες, ο Gustafson (1936) ανέφερε πως κανονικού μεγέθους παρθενοκαρπικοί καρποί αναπτύχθηκαν μετά από χειρισμό των 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 σε παρθενοκαρπικούς καρπούς. Το 2-ναφθυλοξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε συγκεντρώσεις 40-60ppm. Επίσης, εφαρμογή βρίσκει το 2-(3-χλωροφαινόξυ) προπιονικό οξύ στα 25-40ppm μόνο για καλλιέργεια θερμοκηπίου και το N-m-τολοφθαλιμικό οξύ 0.1-0.5% με καθολικό ψεκασμό όταν τα φυτά έχουν αναπτύξει 2-3 ταξικαρπίες, όπου η καθεμία έχει 2-3 ανοικτά άνθη (Ho and Hewitt 1986). Το 4-c 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 (Ho and Hewitt 1986), σκόνη εδάφους ή φυσικός ερεθισμός του στίγματος (Gustafson, 1942) μπορούν να προάγουν την παρθενοκαρπία.

1.2.4 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία

Η αλληλεπίδραση μεταξύ περιβαλλοντικών παραγόντων και γονοτύπου καθορίζει την έκταση της έκφρασης της παρθενοκαρπίας. Άσπερμοι καρποί σχηματίζονται συχνά ως αποτέλεσμα επικράτησης δυσμενών περιβαλλοντικών συνθηκών για την παραγωγή γύρης, την επικονίαση ή τη γονιμοποίηση (Abdalla and Verkerk, 1968). Οι χαμηλές θερμοκρασίες σχετίζονται με την παρθενοκαρπική καρπόδεση. Ο Preil (1973) αναφέρει πως σε σταθερή ημερήσια θερμοκρασία 25°C και νυκτερινές θερμοκρασίες 5, 10 και 15 °C οι παρθενοκαρπικοί καρποί αποτέλεσαν το 71, 45 και 29% της ολικής καρπόδεσης αντίστοιχα. Επίσης, παράγοντες όπως το μήκος της ημέρας, η ένταση και η ποιότητα του φωτός και οι αλληλεπιδράσεις 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 εξαρτάτο από το γονότυπο των φυτών. Η παρθενοκαρπία εμφανίστηκε με μεγαλύτερη συχνότητα σε μεγάλους καρπούς που προέρχονταν από πολύχρωμες ωθήκες, ενώ ήταν μικρότερη σε γονότυπους με μικρούς καρπούς και ωθήκες με λιγότερες χώρους.

1.2.5 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας

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

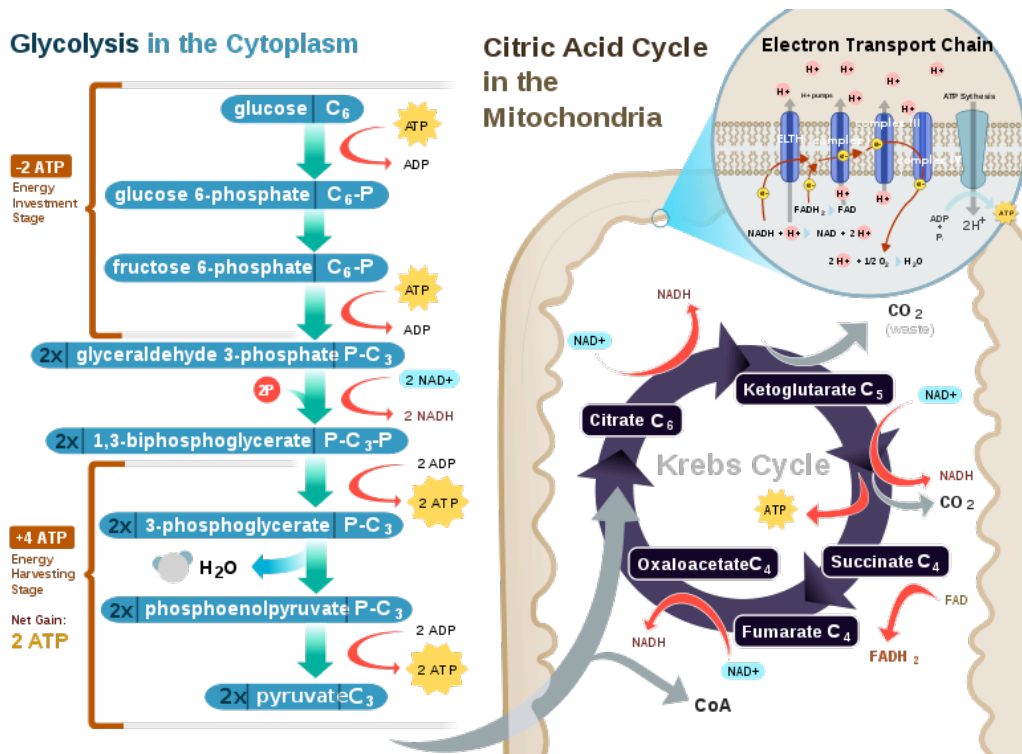
Το νωπό βάρος των καρπών που προέρχονται από γενετική παρθενοκαρπία είναι το μισό ή τα δύο τρίτα των ένσπερμων καρπών (Marcelli et al., 1978), αν και ορισμένοι παρθενοκαρπικοί καρποί είχαν περίπου το ίδιο βάρος ή ακόμη και μεγαλύτερο (Gorguet et al., 2005). Ακόμη, το περιβάλλον και το γενετικό υπόβαθρο 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 και υψηλότερα ποσοστά σακχάρων αλλά λιγότερα οξέα και κυτταρίνη σε σχέση με τους κανονικούς καρπούς (Ho and Hewitt, 1986).

1.3.1 Η κυτταρική αναπνοή

Η αναπνοή ως φυσιολογική λειτουργία, αποτελεί ακρογωνιαίο λίθο για την ζωή λόγω της κομβικής της σημασίας στον ενεργειακό μεταβολισμό και τον μεταβολισμό του άνθρακα. Στους ετερότροφους οργανισμούς (ή στους ετερότροφους ιστούς) η αναπνοή προσφέρει το μεγαλύτερο ποσοστό ενέργειας που απαιτείται για την αύξηση και τη συντήρησή τους (van Dongen et al., 2011). Στους φωτοσυνθετικούς ιστούς η αναπνοή δεν είναι η κυριότερη οδός παραγωγής ενέργειας αν και εκεί η συμμετοχή στο ενεργειακό δυναμικό είναι σημαντική. Επιπρόσθετα η λειτουργία ορισμένων μεταβολικών μονοπατιών (ιδίως της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων) φαίνεται να είναι απαραίτητη για τη μέγιστη απόδοση στη φωτοσύνθεση (Ditilleul et al., 2003; van Dongen et al., 2011). Σε όλους όμως τους ιστούς η αναπνευστική αλυσίδα παίζει ρόλο σε πολλές φυσιολογικές λειτουργίες, όπως στη σύνθεση ATP, στην παραγωγή ανθρακικών αλυσίδων για βιοσύνθεση πολύπλοκων βιομορίων, στη ρύθμιση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού του κυττάρου, στην απόκριση σε παράγοντες βιοτικής και αβιοτικής καταπόνησης (van Dongen et al., 2011). Η πορεία της αναπνευστικής αποδόμησης των σακχάρων, που αποτελούν τα κύρια αναπνευστικά υποστρώματα φαίνεται παρακάτω:



Εικόνα 4: Σχηματική παράσταση των διεργασιών της αναπνευστικής αποδόμησης των υδατανθράκων

www.wikipedia.org

Η αναπνευστική αλυσίδα παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία στη λειτουργία της, για παράδειγμα:

α) τα πολλαπλά “σημεία εισόδου”-υποστρώματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη λειτουργία του συστήματος, όπως το άμυλο, η σακχαρόζη καθώς και λιπίδια, αμινοξέα και πρωτεΐνες (Ishizaki, 2006; Araujo et al., 2010)

β) ο κύκλος των τρικαρβοξυλικών οξέων μπορεί να διαφοροποιηθεί σε συνθήκες καταπόνηση όπως υποξία (Rocha et al., 2010),

γ) ύπαρξη “παρακάμψεων” στο σύστημα όπως η Εναλλακτική οξειδάση (ΑΟΧ)

δ) συνεργασία μεταβολικών οδών από διαφορετικά μέρη των κυττάρων (μιτοχόνδρια, κυτόπλασμα)(Rocha et al., 2010).

Η αναπνευστική αποδόμηση των υδατανθράκων, όπως προαναφέρθηκε, αποτελείται από ένα συνδυασμό από διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια. Η γλυκόλυση που λαμβάνει χώρα στο κυτόπλασμα και στα πλαστίδια, τον κύκλο των τρικαρβοξυλικών οξέων (κύκλος του Krebs) που λαμβάνει χώρα στη μήτρα των μιτοχονδρίων και την οξειδωτική φωσφορυλίωση που λαμβάνει χώρα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Fernie et al., 2004; Bunik and Fernie, 2009).

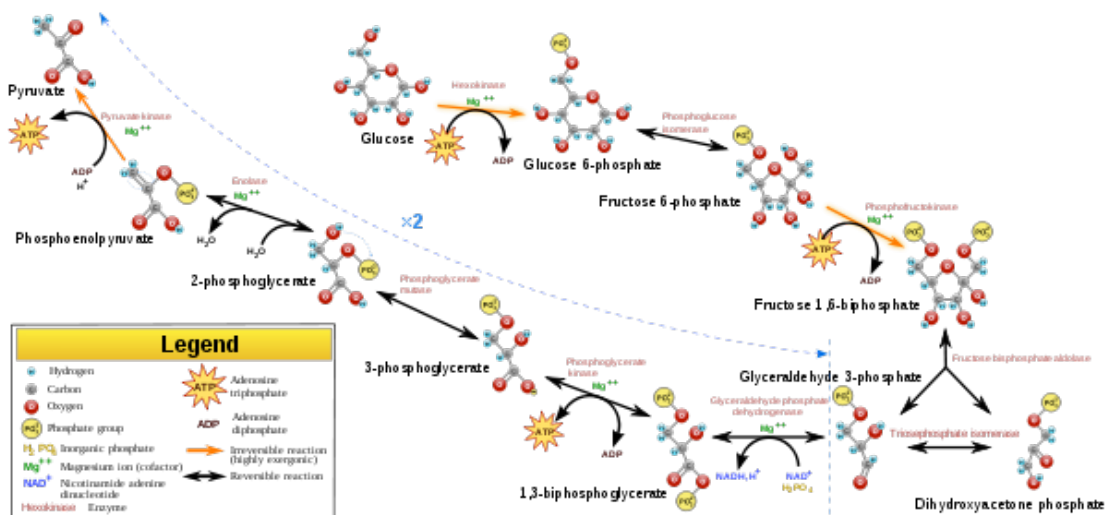
1.3.2 Οι κύριοι μεταβολικοί οδοί.

α) Η γλυκόλυση

Η γλυκόλυση είναι η διεργασία κατά την οποία, μονοσακχαρίτες μετατρέπονται σε πυροσταφυλικό οξύ. Συναντάται σε όλα τα ζώντα κύτταρα και ήταν το πρώτο βιοχημικό μονοπάτι που χαρακτηρίστηκε ικανοποιητικά. Παρόλο που τα ένζυμα που αποτελούν το μονοπάτι, είναι κοινά σε όλους τους οργανισμούς, τα τελευταία 30 χρόνια, έχουν βρεθεί στα φυτά κάποιες ιδιότητες που δεν συναντώνται σε όλα τα είδη, όπως η αλκοολική ζύμωση σε αναερόβιες συνθήκες (Givan, 1999). Η γλυκόλυση λαμβάνει χώρα κυρίως στο κυτόπλασμα, αν και είναι πλέον αποδεκτό ότι στα πλαστίδια υπάρχουν τα ένζυμα που απαιτούνται για τη πραγματοποίηση των αναγκαίων αντιδράσεων (Frehner et al., 1990). Η γλυκόλυση αποτελείται από 10 αντιδράσεις (Σχήμα) και ως εκ τούτου υπάρχουν 10 ενδιάμεσα προϊόντα που παράγονται. Τα κυριότερα σάκχαρα μπορούν να μετατραπούν σε ένα από αυτά τα ενδιάμεσα

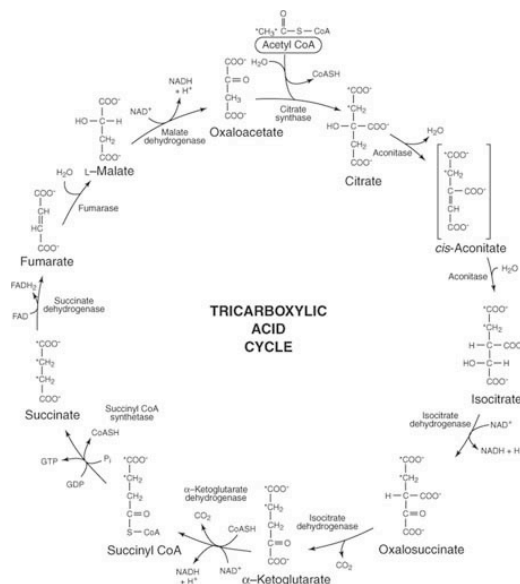
προϊόντα και να εισέλθουν στο μονοπάτι (Romano and Conway, 1996).

Από την γλυκόλυση, παράγονται δύο υψηλής ενέργειας μόρια ATP και 2 NADH, αλλά και δύο μόρια πυροσταφυλικού οξέος που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα στα επόμενα στάδια της αναπνευστικής αλυσίδας (Lane et al., 2009).



Εικόνα 5: Η γλυκόλυση www.wikipedia.org

β) Ο κύκλος των τρικαρβονικών οξέων (TCA circle-Krebs circle)



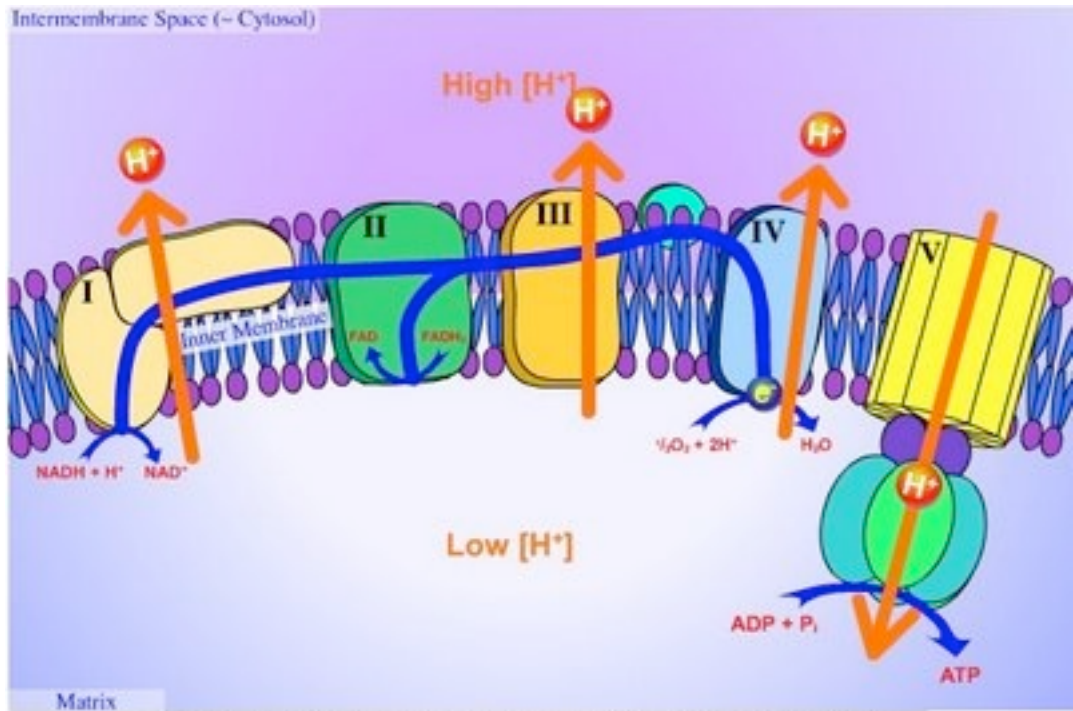
Εικόνα 6: Ο κύκλος του Krebs (www.journal.chemistrycentral.com)

Ο κύκλος των τρικαρβονικών οξέων είναι μία σειρά ενζυμικών αντιδράσεων του αερόβιου

μεταβολισμού. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως "καύσιμο" για την παραγωγή ενέργειας διάφορα μόρια, όπως το ακέτυλο-συνένζυμο Α που προέρχεται από τη γλυκόλυση, προϊόντα από οξείδωση λιπαρών οξέων καθώς και μερικά αμινοξέα μπορούν να "εισαχθούν τον κύκλο". Με την ολοκλήρωση της σειράς των αντιδράσεων υπάρχει ενεργειακό κέρδος τρία μόρια NADH ένα μόριο ATP και ένα μόριο FADH₂. Καθώς κάθε μόριο γλυκόζης αποδίδει δύο μόρια ακέτυλο-συνένζυμο Α, το τελικό ενεργειακό κέρδος από κάθε μόριο γλυκόζης είναι διπλάσιο. Οι αντιδράσεις του κύκλου, πραγματοποιούνται στη μήτρα του μιτοχονδρίου (Voet et al., 2002; Κατινάκης, 2004; Berg et al., 2004).

γ) Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων

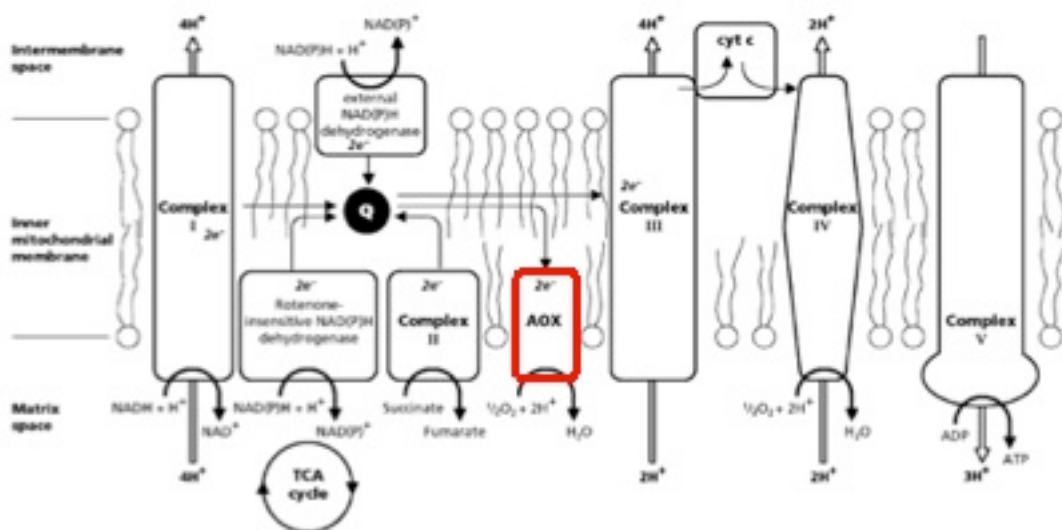
Μετά τον κύκλο του Krebs (TCA circle) το οξυγόνο εισέρχεται στην αναπνευστική αλυσίδα ως αποδέκτης ηλεκτρονίων στο τέλος της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η οξείδωση αυτή λαμβάνει χώρα σε διαφορετικά στάδια μέσω ποικίλων μεταφορικών μορίων πολλά από τα οποία χαρακτηρίζονται ως κυτοχρώματα. Τα κυτοχρώματα (σύμπλοκα πρωτεϊνών- πλην του κυτοχρώματος c που είναι μονομερές- με ενσωματωμένο δακτύλιο πορφυρίνης που περιέχει σίδηρο) μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια μέσω των ατόμων σιδήρου. Υπάρχουν τέσσερα κυτοχρώματα ενσωματωμένα στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου. Οι υπόλοιπες πρωτεΐνες που δεν χαρακτηρίζονται ως κυτοχρώματα, έχουν θείο και σίδηρο, και μεταφέρουν και αυτές ηλεκτρόνια μέσω των ιόντων σιδήρου. Τρία συμπλέγματα μεταφορέων είναι ενσωματωμένα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη. Το σημαντικότερο μεταφορέας ηλεκτρονίων είναι το κυτόχρωμα Q (CoQ). Η αλυσίδα λειτουργεί μεταφέροντας ηλεκτρόνια από το ένα σύμπλεγμα στο επόμενο, μειώνοντας την ενέργεια τους, ενώ στο τέλος της αλυσίδας, τα εξασθενημένα ηλεκτρόνια τα δέχεται το οξυγόνο που με δύο πρωτόνια σχηματίζει ένα μόριο νερού. Η ενέργεια για την αλυσίδα (ηλεκτρόνια) προέρχεται από το NADH και το FADH₂, παράλληλα, παράγονται και πρωτόνια που απελευθερώνονται εκτός της εσωτερικής μιτοχονδριακής μεμβράνης. Το γεγονός αυτό και δεδομένου ότι η μεμβράνη δεν είναι περατή στα πρωτόνια, δημιουργεί δυναμικό πρωτονίων εντός και εκτός της μεμβράνης. Τα πρωτόνια εισέρχονται εντός της μεμβράνης μέσω καναλιών που έχουν ενσωματωμένο το σύμπλοκο της ATP συνθάσης. Η ενέργεια των πρωτονίων χρησιμοποιείται για την πρόσδεση μίας φωσφομάδας στο ADP και την παραγωγή ATP (Κατινάκης, 2004; Berg et al., 2004).



Εικόνα 7: Η αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων (www.wikipedia.org)

1.4.1 Η εναλλακτική Οξειδάση (Alternative Oxidase) (EC 1,-)

Στα μιτοχόνδρια όλων των οργανισμών μεταφέρονται ηλεκτρόνια μέσω της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων της αναπνοής. Αναφέρεται εκτενώς στη βιβλιογραφία ότι το τελικό στάδιο του μονοπατιού των φυτών, των μυκήτων και των μονοκύτταρων ευκαρυωτικών κυττάρων, χωρίζεται σε δύο κλάδους (Σχήμα) :



Εικόνα 8: Η «θέση» της Εναλλακτικής οξειδάσης, μεταξύ των ενζυμικών συμπλόκων που αποτελούν την

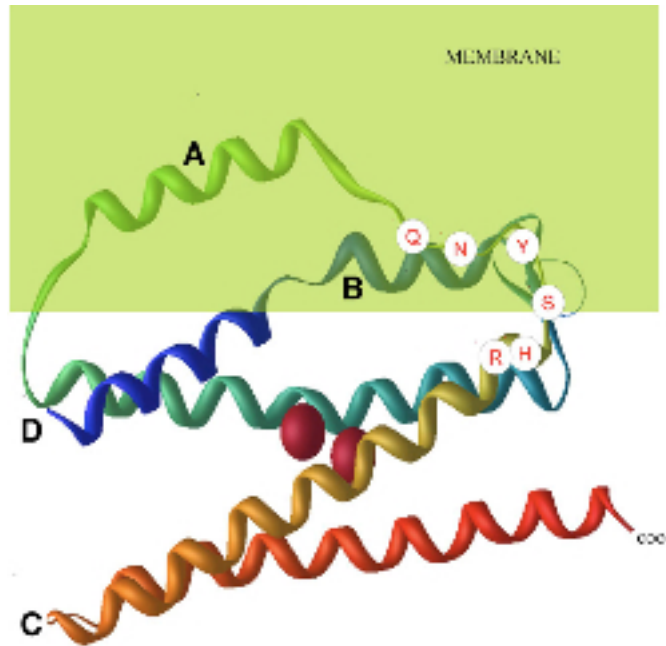
αναπνευστική αλυσίδα, στην μεμβράνη των μιτοχονδρίων (Millenaar and Lambers, 2002).

α) μέσω του κυτοχρώματος (οξειδάση του κυτοχρώματος c) μέσω του οποίου παράγεται η ενέργεια (ATP) που είναι αναγκαίο για τις λειτουργίες του οργανισμού.

β) μέσω του εναλλακτικού μονοπατιού που είναι ανθεκτικό στο κυάνιο και από το οποίο δεν παράγεται ATP, και στο οποίο εμπλέκεται μία μόνο οξειδάση η Εναλλακτική Οξειδάση (ΑΟΧ). Η ενέργεια που παράγεται από αυτό το μονοπάτι, κυρίως εκλύεται με τη μορφή θερμότητας (Simons et al., 1999; van Aken et al., 2009; Fu et al., 2010).

Η ΑΟΧ κωδικοποιείται από μια μικρή ομάδα γονιδίων σε όλα σχεδόν τα φυτά (4 στη τομάτα (Navet et al., 2003) Τα γονίδια αυτά, μπορούν να ομαδοποιηθούν στα δικότυλα φυτά, σε δύο ομάδες (ΑΟΧ1 και ΑΟΧ2), τα γονίδια που ανήκουν στην πρώτη ομάδα, παρουσιάζουν μεταξύ των φυτικών ειδών περισσότερες ομοιότητες από αυτά της δεύτερης, ενώ τα μονοκότυλα φυτά αναφέρεται ότι διαθέτουν μόνο την ΑΟΧ1 ομάδα ενζύμων (Considine et al., 2002; Rasmusson et al., 2009). Τα γονίδια της πρώτης ομάδας, αναφέρεται ότι ενεργοποιούνται περισσότερο σε καταστάσεις καταπόνησης από αυτά της δεύτερης (Clifton et al., 2005). Στη τομάτα αναφέρεται ότι ομάδα ΑΟΧ2 ανήκει μόνο ένας ιστύπος του ενζύμου (Holtzapffel et al., 2003)

Στα φυτά η ΑΟΧ είναι ομοδιμερές ένζυμο και εντοπίζεται στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Σχήμα) Στον καπνό, το μέγεθος της υπομονάδας του ενζύμου με, προσδιορίστηκε με SDS-Page περίπου 30-35 kD (Day and Wiskich, 1995).



Εικόνα 9: Διαγραμματική αναπαράσταση της δευτερογενούς δομής και της θέσης του ενζύμου στη μιτοχονδριακή μεμβράνη, οι κόκκινες σφαίρες αντιπροσωπεύουν τις θέσεις των ιόντων σιδήρου, ενώ η κόκκινη αλυσίδα φαίνεται να είναι σημαντική για την πρόσδεση με την ουμπικινόνη (Albury et al., 2010)

Το ένζυμο αναφέρεται ότι παράγεται στον πυρήνα των κυττάρων και μεταφέρεται στα μιτοχόνδρια (Tanudji et al., 1999).

Το ένζυμο έχει θέσεις πρόσδεσης με σίδηρο (όπως πολλές οξειδάσες). Το γεγονός έχει επιβεβαιωθεί με φασματοσκοπία EPR (Berthold et al., 2002).

Σε πολλές έρευνες, αναφέρεται ότι πλησίον του αμινοτελικού άκρου του ενζύμου υπάρχουν δύο συντηρημένες περιοχές, οι οποίες περιέχουν κατάλοιπα κυστεΐνης που θεωρείται ότι παίζουν ρόλο στην ενεργοποίηση και την απενεργοποίηση του ενζύμου μέσω δημιουργίας δισουλφιδικών δεσμών (Holtzapffel et al., 2003).

Υπάρχει επίσης μια καλά συντηρημένη περιοχή σε πολλά είδη που θεωρείται (μέσω μοντέλων βιοπληροφορικής) ότι αντιστοιχεί σε ενεργό κέντρο, (διαφορετικό από αυτό της αντίδρασης οξείδωσης), πρόσδεσης στην ουμπικινόνη. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με την απουσία του ενζύμου στα θηλαστικά, καθιστά την περιοχή αυτή πιθανό στόχο φαρμάκων ενάντια σε μολύσεις κυρίως από πρωτόζωα. Μεταλλάξεις στο σημείο αυτό (αντικατάσταση Gln 242 με Asn) οδήγησαν σε ολική απώλεια της δραστηριότητας του ενζύμου (Albury et al., 2010) .

Το ένζυμο έχει εκτενώς αναφερθεί ότι εκφράζεται σε πολλά φυτικά όργανα και σε πολλές

συνθήκες, ενώ σε συνθήκες καταπόνησης παρατηρείται ταχεία αύξηση των μεταγραφημάτων στα φυτά (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Whelan et al. 1996; Considine et al. 2002; Thirkettle-Watts et al. 2003; Finnegan et al. 2004; Ho et al., 2008)

Αναφορικά με τον ρόλο της AOX στα φυτά, έχουν προταθεί από διάφορες έρευνες τα παρακάτω:

- 1) Απενεργοποίηση των παραγόμενων στα μιτοχόνδρια ελευθέρων ριζών οξυγόνου και ως εκ τούτου, αντοχή σε καταστάσεις καταπόνησης (Maxwell et al., 1999; Mittler 2002). Το μιτοχόνδριο, είναι έδρα της πολλών μεταβολικών διεργασιών όπου παράγονται ROS καθώς και πολλών μηχανισμών απενεργοποίησης των ROS όπως ο κύκλος ασκορβικού-γλουταθειόνης. Η AOX πιθανά δρα μειώνοντας το επίπεδο της αναγωγής της ουμπικινόνης που μειώνει τη παραγωγή ROS στα μιτοχόνδρια (Chew et al., 2003; Noctor et al., 2007; Rasmusson et al., 2009)
- 2) Παραγωγή θερμότητας σε στοχευμένους ιστούς και όργανα (π.χ. στα άνθη για προώθηση της επικονίασης με προσέλκυση των εντόμων) (Wagner et al., 2008)
- 3) Συμμετοχή σε μηχανισμούς παραγωγής σημάτων σχετικά με την άμυνα των φυτών στα παθογόνα (αναφέρονται κυρίως ιοί). Το ένζυμο αναφέρεται ότι αποτελεί μέρος ενός ευρύτερου συνόλου μηχανισμών σημάτων και η αποτελεσματικότητα διαφέρει ανάλογα με το είδος της προσβολής (Lee et al., 2011)
- 4) Το ένζυμο ισορροπεί το οξειδαναγωγικό δυναμικό του μιτοχονδρίου σε ακρέες συνθήκες, βοηθώντας τη λειτουργία του κύκλου των τρικαρβοξυλικών οξέων στις συνθήκες αυτές (παράδειγμα τέτοιων συνθηκών είναι η υπερβολική συσσώρευση ATP εντός του κυττάρου) (Umbach et al., 2006).
- 5) Συμμετοχή του ενζύμου στο μηχανισμό προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου (van Aken et al., 2009).

Έχει αναφερθεί ότι η δραστηριότητα της AOX μπορεί να μειώσει την παραγωγή ATP από την

αναπνοή έως και 60%, το γεγονός αυτό υπογραμμίζει την σημασία του ενζύμου στη λειτουργία του της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια (Rasmusson et al., 2009).

1.4.2 Έκφραση του γονιδίου

Το ένζυμο έχει εκτενώς αναφερθεί ότι εκφράζεται σε πολλά φυτικά όργανα και κάτω από διαφορετικές συνθήκες, ενώ σε συνθήκες καταπόνησης παρατηρείται ταχεία αύξηση των μεταγραφημάτων στα φυτά (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Whelan et al. 1996; Considine et al. 2002; Thirkettle-Watts et al. 2003; Finnegan et al. 2004; Ho et al., 2008). Πιο συγκεκριμένα, αναφέρεται ότι παράγοντες που επάγουν αυξανόμενες ποσότητες ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) (κυρίως παράγοντες καταπόνησης), οδηγούν γενικά σε αύξηση της έκφρασης του ενζύμου (Clifton et al., 2005; Noctor et al., 2007). Το παραπάνω συμπέρασμα ενισχύεται από τα ευρήματα του (Wagner, 1995) που αναφέρει ότι η επίδραση υπεροξειδίου του υδρογόνου σε κύτταρα πετούνιας, οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης του ενζύμου.

Στο *Arabidopsis* όπου έχουν βρεθεί τέσσερις ισότυποι της κατηγορίας AOX1 και ένας της AOX2, η έκφραση του κάθε ισότυπου διαφέρει σε κάθε στάδιο ανάπτυξης ενώ η έκφραση των ισοτύπων κάτω από επίδραση παραγόντων καταπόνησης σε διάφορα φυτικά είδη, δεν είναι ίδια (Clifton et al., 2005; Rasmusson et al., 2009).

Υπερ-έκφραση της AOX1 οδήγησε σε αυξημένα επίπεδα του ενζύμου στα μιτοχόνδρια καπνού αλλά χωρίς εμφανή επίδραση στην ανάπτυξη των φυτών. Παρόλα αυτά με επίδραση αντιμυκίνης A, τα φυτά που υπερ-εξέφραζαν την AOX1 αναπτύχθηκαν σαφώς γρηγορότερα από το μάρτυρα (Maxwell et al., 1999)

1.4.3 Ρύθμιση της δραστηριότητας του ενζύμου.

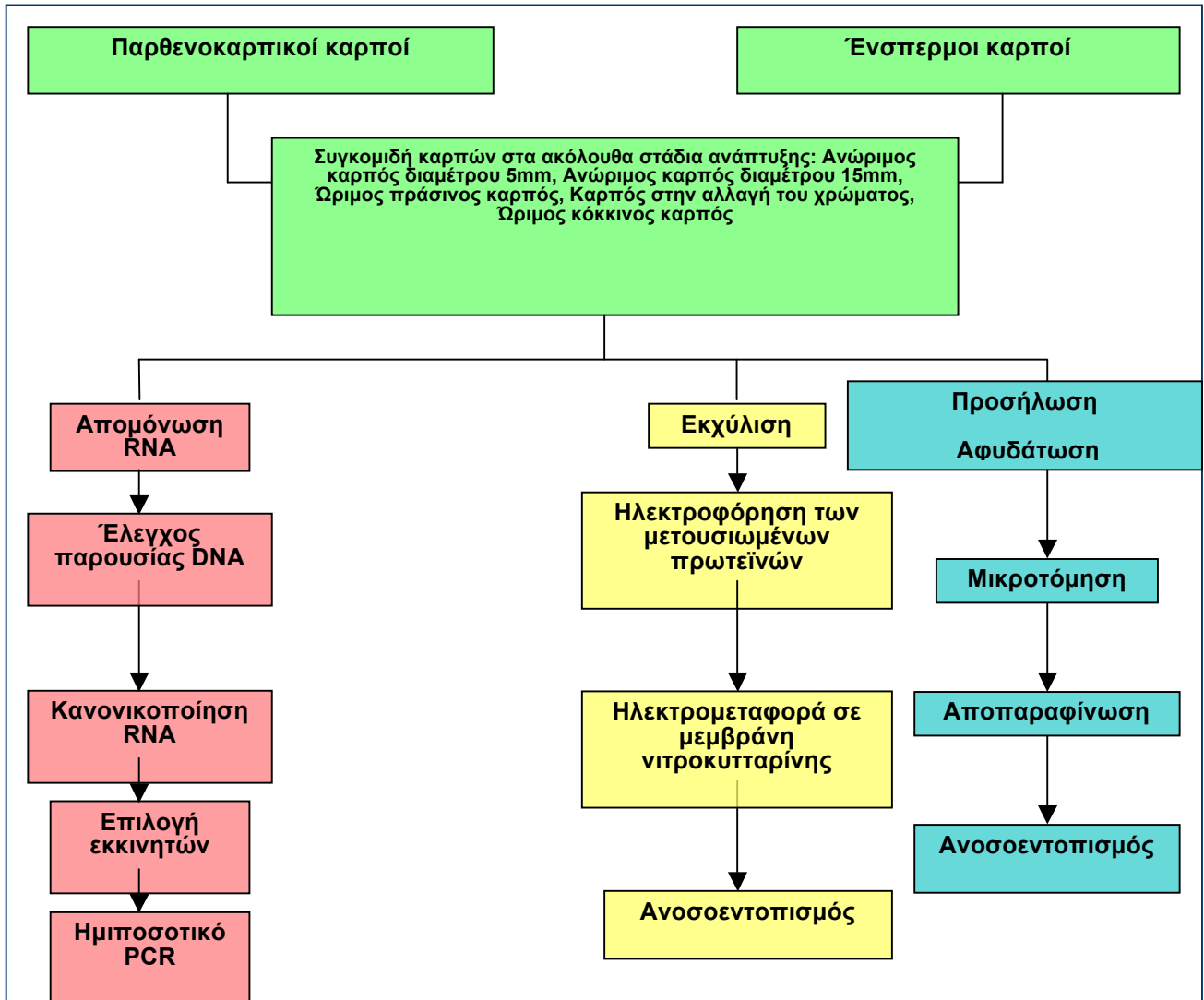
Έχουν αναφερθεί αρκετοί παράγοντες που επηρεάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Όλοι όμως έχουν εντοπιστεί με μελέτες σε απομονωμένα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα η σημασία του κάθε παράγοντα *in vivo* να μην μπορεί να εκτιμηθεί με ακρίβεια (Millenaar and Lambers, 2003)

Οι παρακάτω μηχανισμοί ρύθμισης έχουν προταθεί:

- 1) Το ένζυμο μπορεί να βρίσκεται σε οξειδωμένη ή ανηγμένη κατάσταση. Η ανηγμένη κατάσταση φαίνεται να είναι περισσότερο ενεργή (Umbach et al., 1994)
- 2) Ορισμένα α-κετοοξέα όπως λχ το πυροσταφυλλικό, φαίνεται ότι αυξάνουν τη δραστικότητα του ενζύμου (Umbach et al., 1994, Millar et al., 1996)
- 3) Μεγαλύτερες ποσότητες ανηγμένης ουμπικινόνης, φαίνεται να οδηγεί σε μεγαλύτερη δραστικότητα.
- 4) Η δραστικότητα του αναπνευστικού μονοπατιού μέσω του κυττοχρώματος, έχει επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου, αφού οι δύο κλάδοι δρουν ανταγωνιστικά (Millar et al., 1995; Wagner and Krab, 1995; Day et al., 1996)

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1 Η διαδικασία του πειράματος

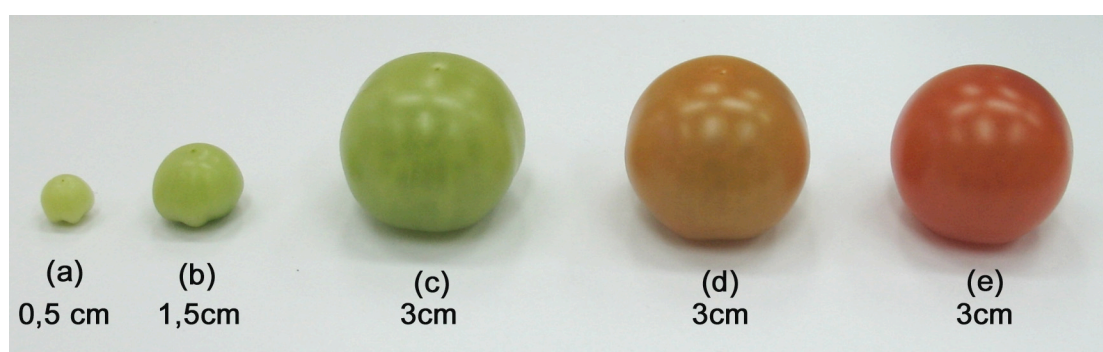


Εικόνα 10: Σχηματική παράσταση των διαδικασιών του πειράματος.

2.2 Το φυτικό υλικό

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ένσπερμοι και άσπερμοι καρποί τομάτας τύπου cherry της ποικιλίας Conchita. Πρόκειται για πρώιμη

ποικιλία που συγκομίζεται με ταξικαρπία. Κάθε ταξικαρπία μπορεί να φέρει 12 με 16 καρπούς. Οι καρποί της Conchita είναι λαμπεροί κόκκινοι με μέσο βάρος 20gr. Η ανάπτυξη και η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε στο 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. Για την παραλαβή των παρθενοκαρπικών καρπών έγιναν οι ακόλουθες ενέργειες. Όταν ακόμη τα άνθη ήταν κλειστά και πριν αυτά καταστούν επιδεκτικά επικονίασης, με μία λαβίδα ανοίχτηκαν τα πέταλα και αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι ανθήρες αφήνοντας άθικτο τον ύπερο. Ακολούθησε ψεκάσμος του στίγματος 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-ναφθοξυοξεικό οξύ σε συγκέντρωση 50ppm. Οι άσπερμοι και ένσπερμοι καρποί συγκομίστηκαν σε 5 διαφορετικά στάδια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη τους: ανώριμοι καρποί διαμέτρου 0,5cm και 1,5cm, ώριμοι πράσινοι, καρποί στην αλλαγή του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι (**Εικόνα 2.1**). 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 11: Τα 5 στάδια ανάπτυξης του καρπού τομάτας τύπου cherry βάση των οποίων έγινε η συγκομιδή. (a) Ανώριμος καρποί διαμέτρου 0,5 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 erpendorf στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15000g για 15min και 4°C. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων με τη μέθοδο Bearden και στη συνέχεια προστέθηκαν στο εκχύλισμα μερικοί κόκκοι κυανούν της βρωμοφαινόλης για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

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

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών

100mM Tris - HCl pH 7.5

15% glycerol

0,02% BSA

2mM Ανοιγμένη γλουταθειόνη

4% PVP

0,1% Triton X

2.3.2. 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 φυγοκέντρηση τους στα 10000g επί 10min.

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

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

A. Πηκτή ανάλυσης 10% T, 2.7% C

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

2,50ml Ρυθμιστικό Διάλυμα Ανάλυσης

3,80ml Αποσταγμένο Νερό

50μl Υπερθειϊκό Αμμώνιο (10%)

10μl TEMED

100μl SDS (10%)

Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης

378mM Tris-HCl pH 8.9

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

1,0ml Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμιδίου, Bis- Ακρυλαμιδίου (30%, 2.7%)

5,0ml Ρυθμιστικό Διάλυμα συσσώρευσης

3.76ml Αποσταγμένο Νερό
100μl Υπερθειικό Αμμώνιο (10%)
10μl TEMED
100μl SDS (10%)

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης

63mM Tris-HCl pH 6.8

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών

25mM Tris
192mM γλυκίνη

2.3.3. Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

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

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

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

2.3.4. Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.

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

Ακολούθησε επώαση μιας ταινίας νιτροκυτταρίνης με πολυκλωνικά αντισώματα παρασκευασθέντα εναντίον συντηρημένων περιοχών της AOX (Agrisera AS04 054, rabbit anti AOX) και σε αραιώση 1:750 σε TBST-1% BSA για 12h στους 25°C. Ομοίως, άλλη μια ταινία νιτροκυτταρίνης επώαστηκε με αντισώματα εναντίον συντηρημένων περιοχών της AOX (Agrisera AS04 054, rabbit anti AOX).

Την επόμενη ημέρα, οι ταινίες νιτροκυτταρίνης ξεπλύθηκαν 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 ξέπλυματα επί 5min με TBST 1% ζελατίνης.

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

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

Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών

24mM Tris

192mM γλυκίνη

20% μεθανόλη

Ρυθμιστικό διάλυμα TBST

20mM Tris HCl pH 7.5

150mM NaCl

0,05% Tween 20

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης-Buffer3

10mM Tris-HCl pH 9.5

100mM NaCl

50mM MgCl₂

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης

10ml ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης

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

66μl Νιτρομπλέ του τετραζολίου (NBT)

2.4 Ανοσοεντοπισμός

2.4.1. Προσήλωση.

Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν τομές από ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας τύπου cherry στα εξής στάδια ανάπτυξης: ανώριμος καρπός διαμέτρου 0,5cm και 1,5cm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή του χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός. Οι τομές από τα πέντε στάδια των κανονικών και παρθενοκαρπικών καρπών προσηλώθηκαν σε κατάλληλο διάλυμα που περιείχε 4% παραφολμαλδεΰδη και 0,5% γλουταραλδεΰδη για χρονικό διάστημα 48h σε θερμοκρασία δωματίου.

2.4.2. Αφυδάτωση.

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

2.4.3. Διαφανοποίηση.

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

2.4.6. 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.

2.4.7. Ανοσοεντοπισμός.

Αρχικά οι τομές καλύφθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα TBST με 1% BSA (διάλυμα δεσμεύσεως μη ειδικών θέσεων) και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Ακολούθησε επώαση των τομών, που προορίζονταν για τον ανοσοεντοπισμό της GS, σε 1:750 αραιώση του αντισώματος (Agrisera AS10 699, rabbit anti AOX) 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 αραιώση (1:5000) δευτερογενούς αντισώματος (AP-Anti-Rabbit, Promega), για 2h περίπου σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα προέρχεται από ποντίκι έναντι των αντισωμάτων κουνελιών (IgG και φέρει συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση).

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

Στην συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης με την επώαση των τομών σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης, παρουσία χρωμοφόρου NBT/BCIP. Η χρωματική αντίδραση γίνεται στο σκοτάδι και η ανάπτυξη του χρώματος ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο, ούτως ώστε να προληφθεί η ανάπτυξη μη εξειδικευμένου σήματος υποβάθρου. Η αντίδραση σταματά με καλό ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με αποσταγμένο νερό. Οι τομές που χρησιμοποιήθηκαν ως μάρτυρες, χρωματίστηκαν με σαφρανίνη.

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

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα TBST

20mM Tris HCl pH 7.5

150mM NaCl

0,05% Tween 20

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης-Buffer3

10mM Tris-HCl pH 9.5

100mM NaCl

50mM MgCl₂

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης

10ml ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης

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

66μl Νιτρομπλέ του τετραζολίου (NBT)

2.5. Έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν την ΑΟΧ 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).

Για να επιτευχθεί τόσο η βέλτιστη παραγωγή RNA όσο και ο καλύτερος βαθμός καθαρότητας του φυτικού υλικού, είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί η κατάλληλη ποσότητα αρχικού υλικού. Η μέγιστη ποσότητα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι 200mg φυτικού υλικού. Για τα περισσότερα φυτά, η χωρητικότητα πρόσδεσης του RNA τόσο της RNeasy spin στήλης όσο και η λυτική χωρητικότητα του αντιδραστηρίου Ρυθμιστικό διάλυμα RLT δεν πρέπει να ξεπερνούν αυτό το όριο. Σε περιπτώσεις που δεν αναφέρεται το ποσό του αρχικού υλικού από την εν λόγω εταιρία, συνιστάται η χρήση 50mg φυτικού υλικού.

Σημαντικά σημεία πριν την αρχή της διαδικασίας.

1. Σε αυτή τη διαδικασία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε νωποί είτε κατεψυγμένοι στους -80°C ιστοί. Οι ιστοί μπορούν να αποθηκευθούν στους -80°C για αρκετούς μήνες. Το στάδιο αυτό προϋποθέτει τη χρήση υγρού αζώτου για την άμεση ψύξη του ιστού πριν τη μεταφορά του στους -80°C. Η απόψυξη των ιστών πρέπει να αποφεύγεται κατά τη διάρκεια της ζύγισης ή του χειρισμού τους πριν τη λειοτριβήση με το ρυθμιστικό διάλυμα RLT. Ομογενοποιημένα λειοτριβήματα των

ιστών που έχουν προκύψει από το τέταρτο βήμα που θα περιγραφεί παρακάτω, μπορούν να αποθηκευθούν στους -80°C για αρκετούς μήνες. Οι λειοτριβημένοι ιστοί πρέπει να επωασθούν σε θερμόλουτρο στους 37°C μέχρι να έχουν ξεπαγώσουν ομοιόμορφα και τα άλατα να έχουν διαλυθεί πριν συνεχίσουμε στο πέμπτο βήμα. Η επί μακρόν επώαση πρέπει να αποφεύγεται καθώς μπορεί να διακινδυνεύεται η ακεραιότητα του RNA.

2. Όλα τα βήματα της διαδικασίας γίνονται σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου. Η διαδικασία εκτελείται άμεσα.
3. Όλα τα στάδια φυγοκέντρησης γίνονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 20 και 25°C σε μικροφυγόκεντρο. Η θερμοκρασία της φυγόκεντρου δεν πρέπει να πέσει κάτω από τους 20°C .
4. Η β - μερκαπτοαιθανόλη (β - ME) προστίθεται πριν την χρήση στο ρυθμιστικό διάλυμα RLT. Πιο συγκεκριμένα, προσθέτουμε $100\ \mu\text{l}$ β - ME ανά 1ml ρυθμιστικού διαλύματος RLT. Τα αντιδραστήρια με την β - ME μπορούν να αποθηκευθούν σε θερμοκρασία δωματίου για ένα μήνα.
5. 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.
6. Εάν εκτελούμε προαιρετική πέψη DNάσης στην στήλη, οφείλουμε να προετοιμάσουμε το διάλυμα Dnάση I stock.

Διαδικασία.

1. Η ζύγιση καθορίζει την ποσότητα του φυτικού υλικού που όμως δεν πρέπει να ξεπερνά τα $200\ \text{mg}$.
2. Ο ζυγισμένος ιστός τοποθετείται άμεσα σε υγρό άζωτο όπου και λειοτριβείται. Η σκόνη που προκύπτει αποθηκεύεται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης χωρητικότητας $2\ \text{ml}$ στο οποίο απουσιάζει RNάση. Το υγρό άζωτο αφήνεται να εξατμιστεί αλλά δεν επιτρέπεται να ξεπαγώσει ο ιστός. Άμεσα ακολουθεί το τρίτο βήμα. (Το RNA σε φυτικούς ιστούς δεν προστατεύεται έως ότου επιτευχθεί άμεση ψύξη του ιστού σε υγρό άζωτο).
3. Προστίθενται $450\ \mu\text{l}$ ρυθμιστικό διάλυμα RLT μέχρι το μέγιστο των 200mg

λειοτριβημένου ιστού. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση (vortex). Επώαση διάρκειας 1-3min βοηθά τη λύση των ιστών.

4. Οι λειοτριβημένοι ιστοί μεταφέρονται σε μια στήλη QIAshredder spin (μωβ) που είναι τοποθετημένη σε ένα σωλήνα συλλογής των 2ml και φυγοκεντρείται για 2min σε μεγάλη ταχύτητα. Το υπερκείμενο της στήλης μεταφέρεται προσεκτικά σε ένα μικρό σωλήνα μικροφυγοκέντρησης χωρίς να διαταραχθούν τα κυτταρικά υπολείμματα στο σωλήνα συλλογής. Στα επόμενα βήματα χρησιμοποιείται μόνο το υπερκείμενο. Συνήθως κρίνεται απαραίτητο να κόβεται η άκρη της πιπέτας για να εισέλθει το προϊόν της λύσης των κυττάρων στη στήλη QIAshredder spin. 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.
5. Προστίθεται 0,5 volume αιθανόλης (96- 100%) στο καθαρισμένο προϊόν της λύσης των κυττάρων και αναμιγνύεται άμεσα με τη χρήση πιπέτας. Δεν φυγοκεντρούμε. Άμεσα ακολουθεί το έκτο βήμα.
6. Το δείγμα (συνήθως 650 μl), μεταφέρεται μαζί με το ίζημα που έχει σχηματιστεί σε μια στήλη RNeasy spin (ροζ) που είναι τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής των 2ml. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15s σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000*g (10000rpm). Αφαιρείται το διήθημα.
7. Προστίθενται 700μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1 στη στήλη RNeasy spin. Φυγοκεντρούμε για 15s σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000g (10000rpm) για να ξεπλυθεί η μεμβράνη της στήλης. Τέλος, απορρίπτεται το διήθημα. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης αφαιρείται προσεκτικά η στήλη RNeasy spin από το σωλήνα συλλογής ώστε να μην επικοινωνεί η στήλη με το διήθημα. Το βήμα αυτό δεν εκτελείται σε περίπτωση που προηγουμένως διεξάχθηκε προαιρετική πέψη της DNάσης στη στήλη.
8. Προσθέτουμε 500μl ρυθμιστικού διαλύματος RPE στην στήλη RNeasy spin. Φυγοκεντρούμε για 15s σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000g (10000rpm) για να ξεπλυθεί η μεμβράνη της spin στήλης.
9. 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 ξηρανθεί η

μεμβράνη ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη που πιθανόν δεν αφαιρέθηκε).

10. Η στήλη RNeasy spin τοποθετείται σε ένα νέο σωλήνα συλλογής 2ml και απορρίπτεται ο παλιός με το διήθημα. Φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 1min
11. Η στήλη RNeasy spin τοποθετείται σε νέο σωλήνα συλλογής 1,5ml. Προστίθενται 30-50μl νερό που δεν περιέχει RNάση κατευθείαν στη μεμβράνη της στήλης spin. Φυγοκεντρούμε για 1min σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000g (10000rpm) ώστε να εξαχθεί το RNA.
12. Εάν η παραγωγή RNA είναι μεγαλύτερη των 30μg επαναλαμβάνουμε το προηγούμενο στάδιο με τη χρήση 30-50μl επιπλέον νερού που δεν περιέχει RNάση ή με τη χρήση του εκλούμενου υγρού του προηγούμενου βήματος (εάν απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα RNA). Εφόσον χρησιμοποιηθεί το εκλούμενο υγρό του προηγούμενου βήματος το παραγόμενο RNA θα είναι 15-30% λιγότερο από την ποσότητα που θα προκύψει με τη χρήση νερού που δεν έχει RNάση με την τελική όμως συγκέντρωση του RNA να είναι μεγαλύτερη.

2.5.2. Έλεγχος της ποιότητας του παραλαμβανόμενου RNA.

Μετά την παραλαβή του RNA ελέγχθηκε η ποιότητά του μέσω ηλεκτροφόρησης TAE σε πηκτική 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 πηκτική αφέθηκε να κρυώσει πριν τοποθετηθεί στην συσκευή ηλεκτροφόρησης. Το μίγμα της ηλεκτροφόρησης συνίστατο από 5μl δείγματος RNA και 15μl διαλύματος αποδιάταξης RNA, το οποίο θερμάνθηκε στους 65 °C για 5 λεπτά και ψύχθηκε σε πάγο για άλλα 5 λεπτά, πριν φορτωθεί στην πηκτική. Η τάση που εφαρμόστηκε ήταν 70V για 20min.

50X Tank ρυθμιστικό διάλυμα

2M Tris-Οξεικό

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 erpendorf τοποθετούνται:

600μl φορμαμίδιο

2400μl dd H₂O

100μl 10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης του Δείγματος

2.5.3. Υδρόλυση DNA των δειγμάτων.

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

Αρχικά, σε κάθε δείγμα προστέθηκαν 2μl DNάσης και 2μl 1X ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης (Promega). Ακολούθησε Vortex των δειγμάτων και προσθήκη 0,5μl RNase out (παρεμποδιστής της RNάσης).

Τοποθετώ 15,5μl του δείγματος RNA

Προσθέτω από το μητρικό μείγμα μέχρι τελικό όγκο 20μl

Τοποθέτηση στους 37°C για 45 min

Προσθέτουμε 1μl DNASE Stop Solution

Κατόπιν, προστέθηκαν 180μl dd αποστειρωμένου H₂O και 200μl φαινόλη και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5min. Σχηματίζονται δύο ευδιάκριτες φάσεις, με την υπερκείμενη φάση να περιέχει το RNA. Η υπερκείμενη φάση τοποθετήθηκε σε νέο αποστειρωμένο erpendorf. 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 erpendorf. Προστέθηκαν 200μl χλωροφόρμιο και πραγματοποιήθηκε εκ νέου φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές 5min. Η υπερκείμενη φάση τοποθετήθηκε σε νέο αποστειρωμένο erpendorf. 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 erpendorf αφέθηκε μέσα σε πάγο με ανοικτό το καπάκι του για 5min, για να εξατμιστεί η αιθανόλη. Τέλος, επαναδιαλύουμε σε 20μl dd αποστειρωμένο H₂O. Μετά την αντίδραση PCR και την ηλεκτροφόρηση TAE, η παρουσία μόνο των εκκινητών της συμπικουτίνης δείχνει εάν έχει υδρολυθεί πλήρως το DNA.

10X Ρυθμιστικό Διάλυμα DNάσης

400mM Tris-HCl (pH 8.0)

100mM MgSO₄

10mM CaCl₂.

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 H₂O και 1μl εκκινήτη 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 πραγματικού χρόνου (RT-PCR).

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) αποτελεί την πλέον εξειδικευμένη και ευαίσθητη μέθοδο ενισχύσεως ακολουθιών DNA και RNA, *in vitro* ή/ και *in situ*. Η αντίδραση προϋποθέτει την ύπαρξη δύο ολιγονουκλεοτιδίων, που έχουν την ικανότητα να υβριδίζουν στις συμπληρωματικές αλυσίδες DNA ή cDNA, τα οποία δρουν ως εκκινήτες της σύνθεσης της αλυσίδας του DNA. Η σχεδίαση των εκκινήτων 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 Mg²⁺.

Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης, πρώτο στάδιο αποτελεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, με τη θέρμανση του δείγματος. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινήτων στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων γίνεται με θέρμανση του δείγματος στη βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η όλη διαδικασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινήτων και σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας επαναλαμβάνεται για έναν αριθμό κύκλων (συνήθως 40-45). Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων και εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινήτων ή παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης, η συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό.

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόστηκαν στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινήτων εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξεως των εκκινήτων (T_m). Σε

ειδικό σωλήνα erpendorf (500 ή 100 μ l) προστέθηκαν τα παρακάτω:

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μ l	Συγκέντρωση πυκνού δ/τος (stock solution)
RNAse free H ₂ O	6,1	
Ανοδικός εκκινητής (F primer)	1	10 μ M
Καθοδικός εκκινητής (R primer)	1	10 μ M
Kapa RYBR Fast qPCR Master mix (2X)	10	
KSF Rox Low (χρωστική)	0,4	
cDNA	1,5	100 ng/ μ l
Τελικός όγκος αντίδρασης	20	

Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

Τα βήματα της αντίδρασης ήταν:

1. Αρχικό βήμα ενεργοποίησης 3 λεπτά 95°C
2. Αποδιάταξη DNA 95°C 3 sec
3. Υβριδισμός 30" 60°C
4. Επέκταση 11" 72°C

Τα βήματα 2 και 4 επαναλαμβάνονται 45 φορές.

5. 1 λεπτό 95°C Το στάδιο αυτό και τα επόμενα πραγματοποιούνται για την απομάκρυνση μη εξειδικευμένα διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές.

Τερματισμός αντίδρασης

6. 30 sec 55°C
7. 30 sec 95°C
8. Τελική φάση αντίδρασης 3' 25°C

Οι εκκινητές αυτοί ήταν:

Ένζυμο	Ανοδικός εκκινητής	Καθοδικός Εκκινητής
AOX 1	ACA CGA GTT GTC ATG GGT CA	CCA TAG CCG AAA AAT GCC TA
AOX 2	ACA CAC TGA TGC AAC CAA CG	GGC ATA TGG TGC TTC TCC AC
Ubiquitin	AGG ATG GAA GGA CTC TGG CG	TCA CAA CAC ATC ACA AGG TG

Η σχετική έκφραση του γονιδίου υπολογίστηκε με τον τύπο

$$\frac{\text{Έκφρ.ΓονιδίουX}}{\text{Έκφρ.Umbi}} = \frac{\text{eff}_{\text{reac.Ubi}}^{\text{Ct.Ubi}}}{\text{eff}_{\text{reac.ΓονίδιοX}}^{\text{Ct.ΓονίδιοX}}}$$

όπου *eff*= αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, που υπολογίζεται από τα αποτελέσματα της αντίδρασης και μέσω του προγράμματος LinRegPCR (Remakers et al., 2003).

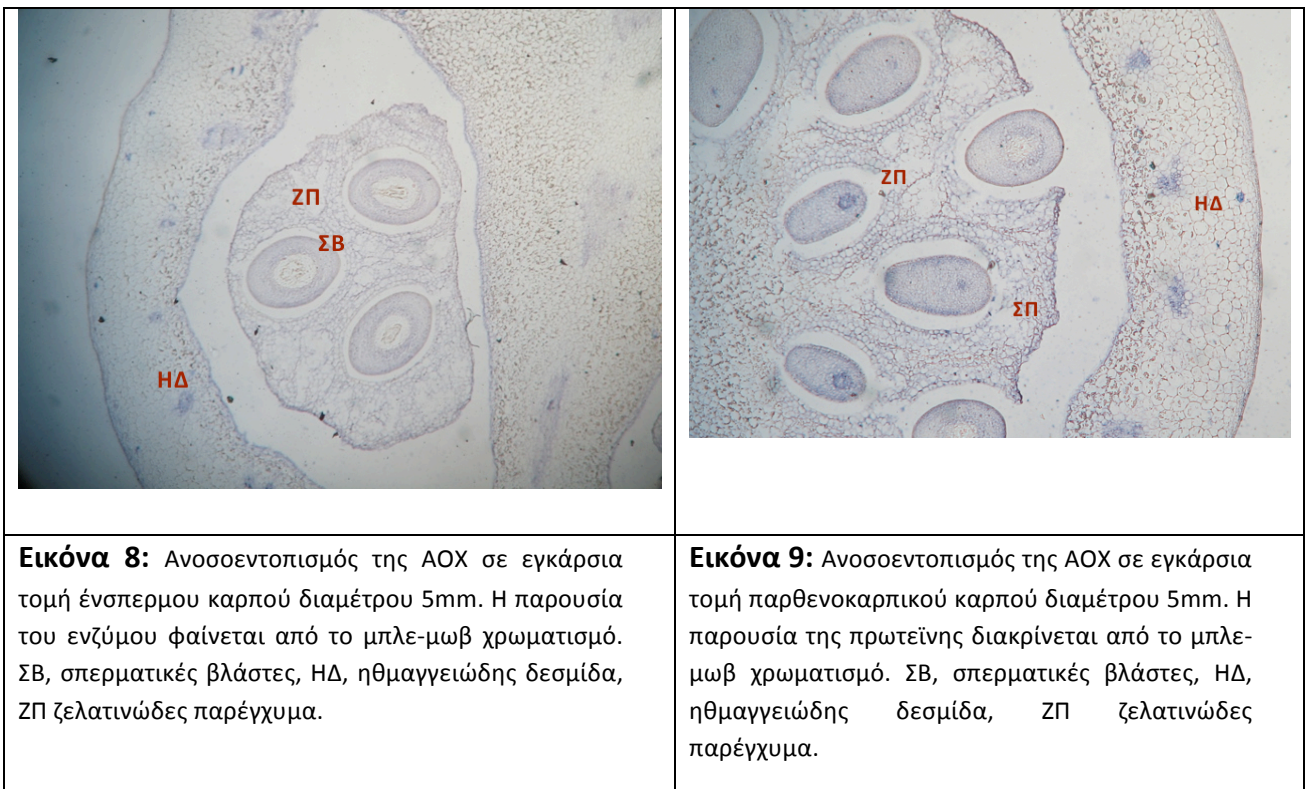
3. Αποτελέσματα

3.1 Ανοσοεντοπισμός της ΑΟΧ

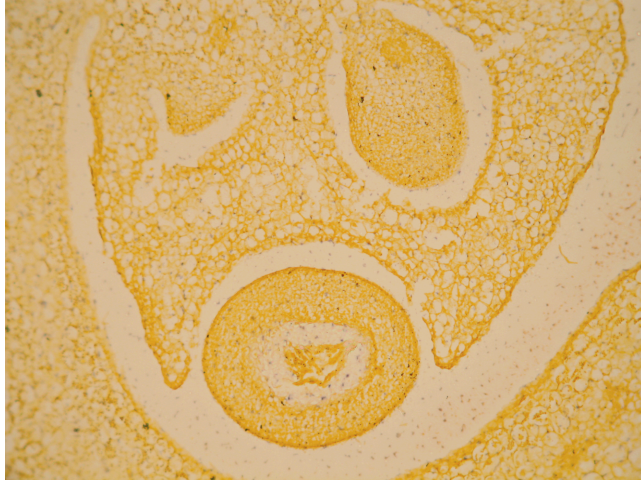
Ο ανοσοεντοπισμός της εναλλακτικής οξειδάσης δείχνει τους ιστούς στους οποίους κατά τη στιγμή της προσήλωσης υπάρχει η πρωτεΐνη καθώς και τη σχετική αφθονία του. Η παρουσία μωβ-μπλέ χρωματισμού σηματοδοτεί την παρουσία της εναλλακτικής οξειδάσης στους φυτικούς ιστούς.

3.1.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm

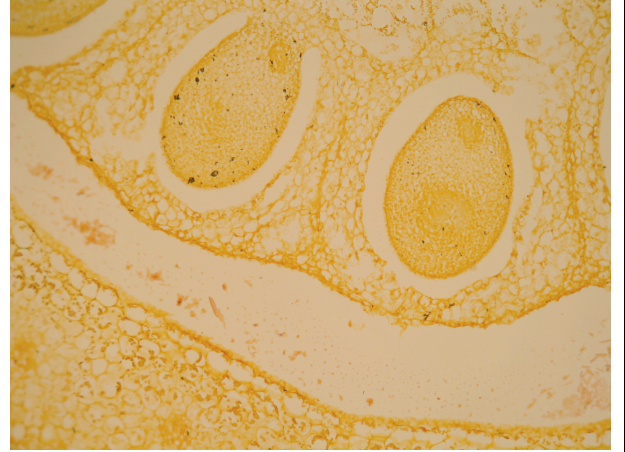
Σε εγκάρσιες τομές στο στάδιο των 5mm του ένσπερμου (Εικόνα 8) και παρθενοκαρπικού (Εικόνα 9) ανώριμου καρπού βρέθηκε πως η πρωτεΐνη εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Λιγότερο έντονο είναι το σήμα στην περιοχή του πλακούντα, του ζελατινώδους παρεγχύματος καθώς και στα κύτταρα του περικαρπίου.



Ακολουθούν οι φωτογραφίες από τους μάρτυρες (επώαστηκαν με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης) για τον ένσπερμο και παρθενοκαρπικό ανώριμο καρπό διαμέτρου 5mm (Εικόνα 13, Εικόνα 14).



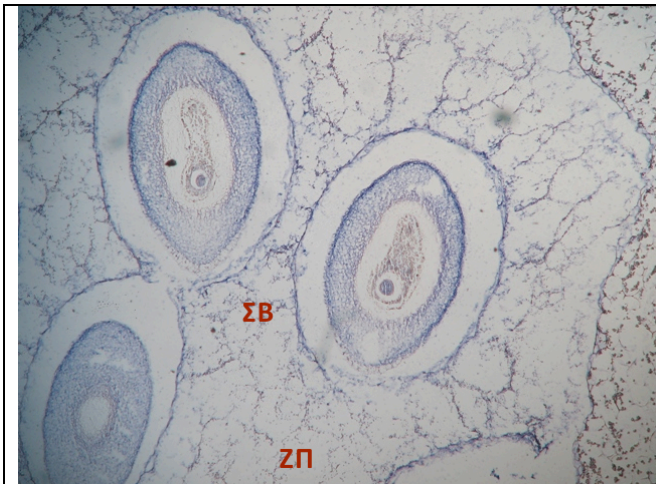
Εικόνα 13: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.



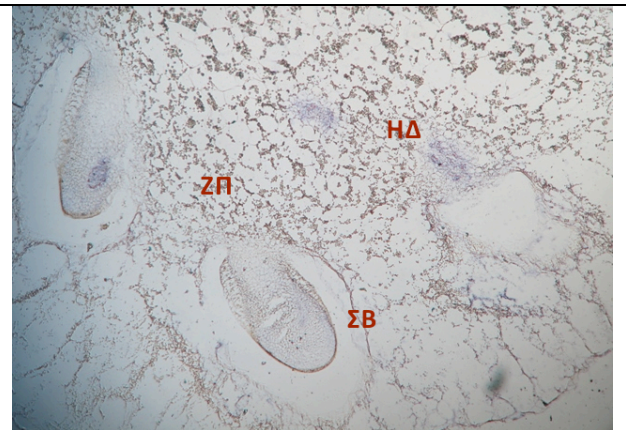
Εικόνα 14: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 5mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

3.1.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm

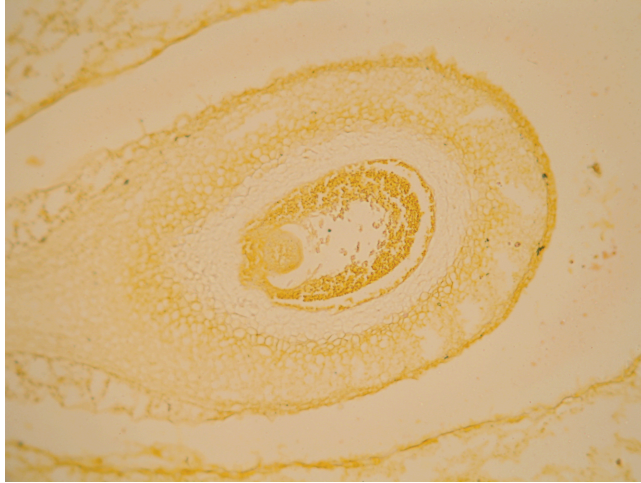
Στο στάδιο του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Ασθενέστερο ήταν το σήμα στα κύτταρα του περικαρπίου, του πλακούντα και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (Εικόνες 15, 16, 17,18, 19 και 20).



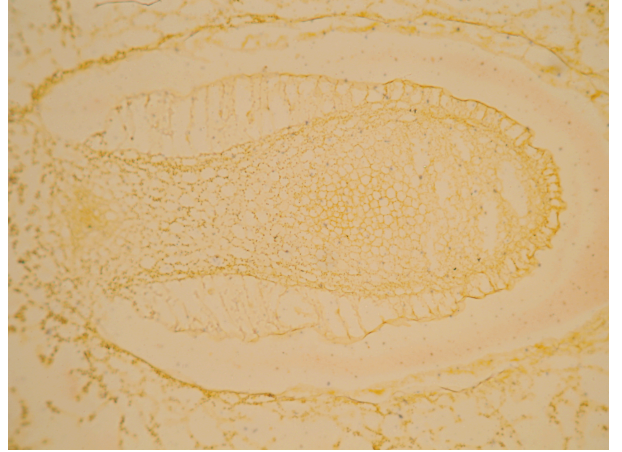
Εικόνα 15: Ανοσοεντοπισμός της ΑΟΧ σε ένσπερμο ανώριμο καρπό διαμέτρου 15mm. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός στην περιοχή των σπερματικών βλαστών (ΣΒ). Αντίθετα, λιγότερη ήταν η δραστηριότητα του ενζύμου στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ).



Εικόνα 16: Ανοσοεντοπισμός της ΑΟΧ σε παρθενοκαρπικό ανώριμο καρπό διαμέτρου 15mm. Και στην περίπτωση αυτή η παρουσία του ενζύμου εντοπίζεται στις σπερματικές βλάστες (ΣΒ) καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), ενώ ανιχνεύεται λιγότερο στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ).



Εικόνα 21: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορμόνη προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

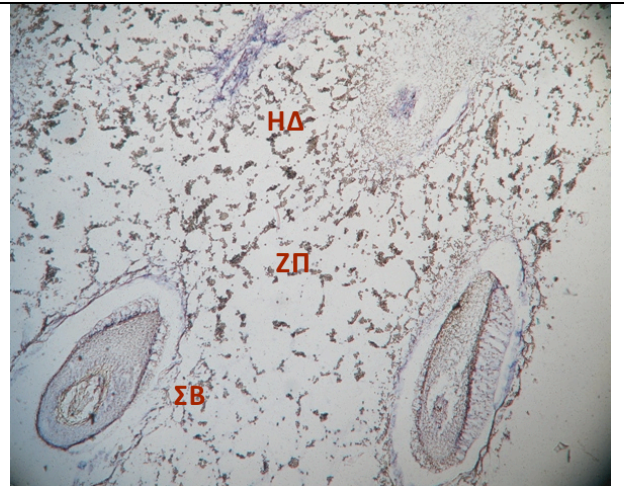


Εικόνα 22: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορμόνη προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

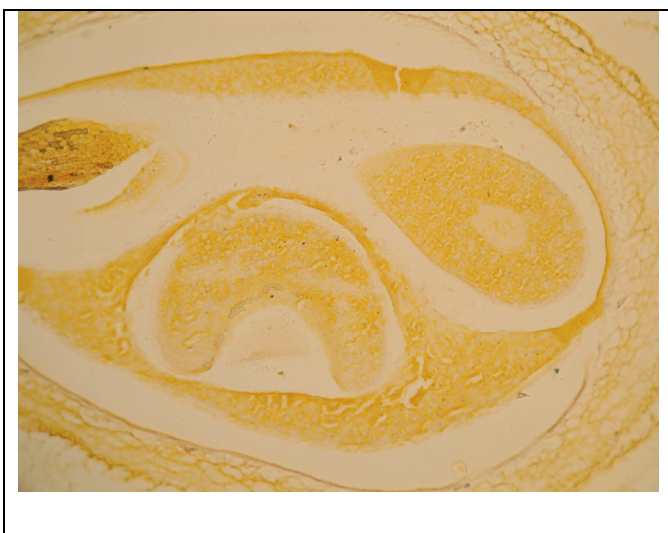
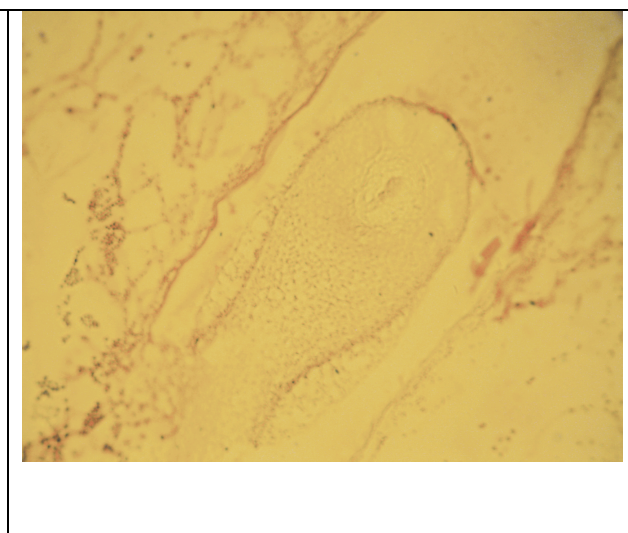
3.1.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού



Εικ 23. Κατά το στάδιο του ώριμου ένσπερμου πράσινου καρπού ΑΟΧ εντοπίστηκε κυρίως στους ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.

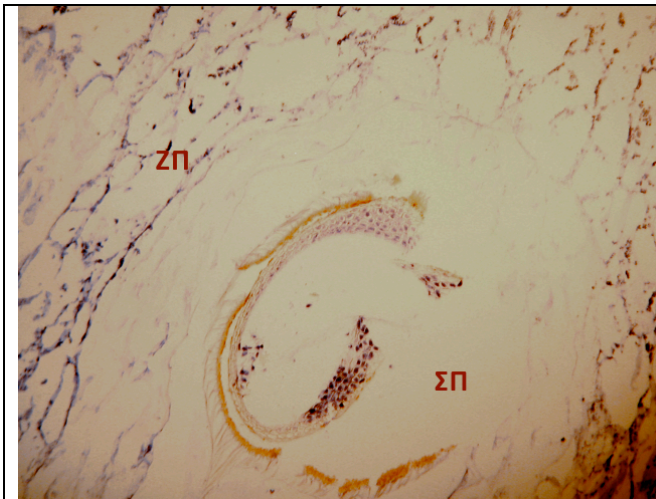


Εικόνα 24: Ανοσοεντοπισμός της ΑΟΧ σε παρθενοκαρπικό πράσινο ώριμο καρπό. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ) καθώς και στα κύτταρα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ).

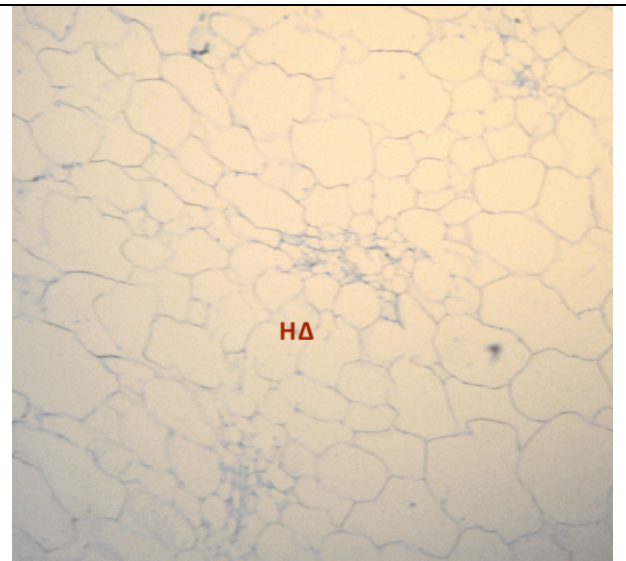
	
<p>Εικόνα 29: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή ένσπερμου πράσινου ώριμου καρπού. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.</p>	<p>Εικόνα 30: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού πράσινου ώριμου καρπού. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.</p>

3.1.4 Στάδιο αλλαγής χρώματος

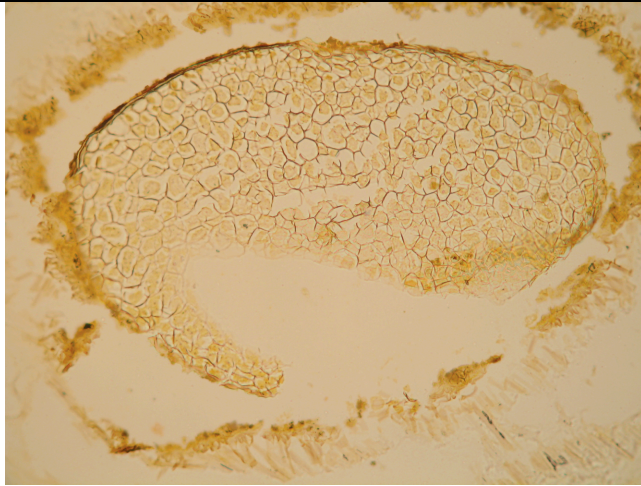
Στον κανονικό καρπό κατά το στάδιο της αλλαγής χρώματος η AOX εντοπίστηκε κυρίως στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου σπέρματος καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνες 31, 33). Αντίθετα, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η πρωτεΐνη εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνες 32, 34).



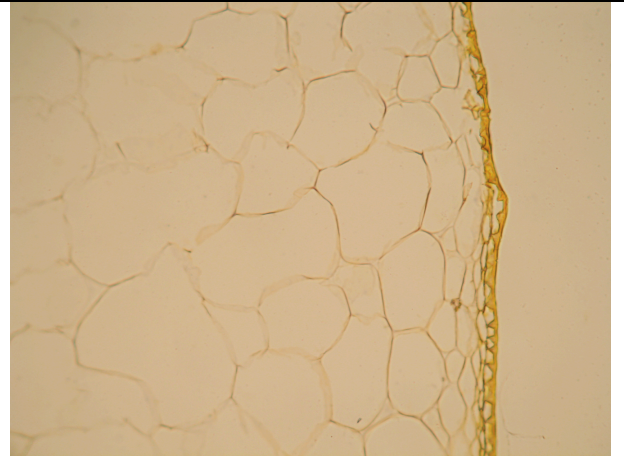
Εικόνα 31: Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της ΑΟΧ σε ένσπερμο καρπό στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου είναι έντονη στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου εμβρύου (ΣΠ). Υπήρχε παρουσία του ενζύμου και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ).



Εικόνα 32: Ανοσοεντοπισμός της ΑΟΧ σε παρθενοκαρπικό καρπό στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Παρουσία ενζύμου υπήρχε στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ)



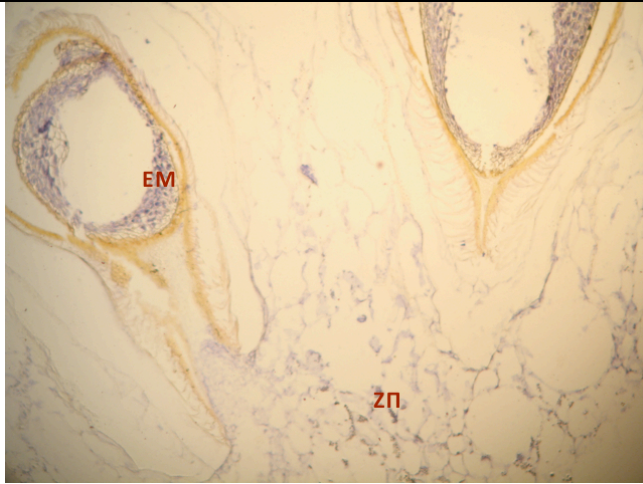
Εικόνα 35: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή αναπτυσσόμενου εμβρύου ένσπερμου ώριμου καρπού στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.



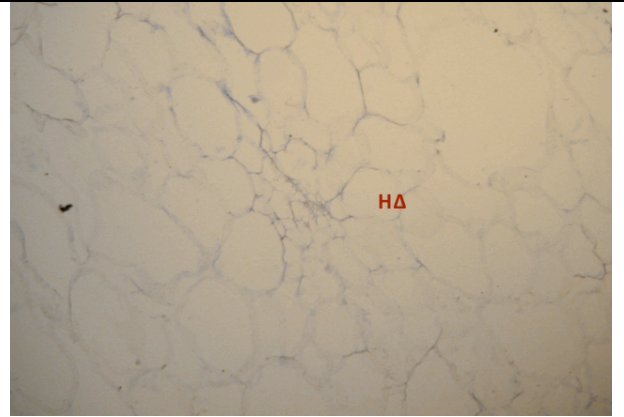
Εικόνα 36: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού ώριμου καρπού στην περιοχή του περικαρπίου στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

3.1.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού

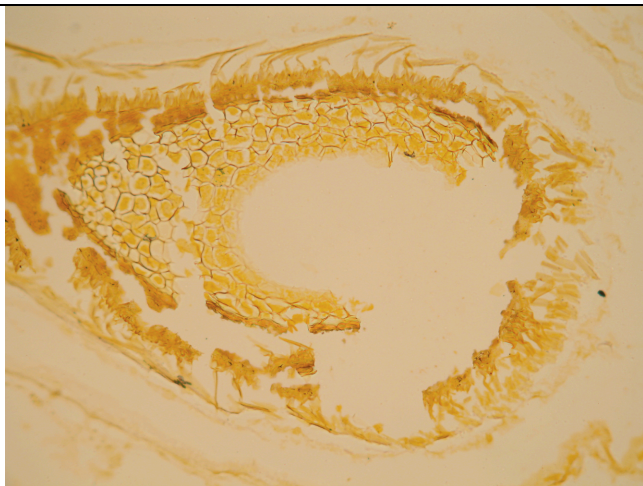
Στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού η παρουσία του ενζύμου ήταν έντονη στο εσωτερικό των αναπτυσσόμενων σπερμάτων καθώς επίσης και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνες 37, 39, 40). Στον παρθενοκαρπικό καρπό το σήμα ήταν ασθενέστερο και εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνα 38).



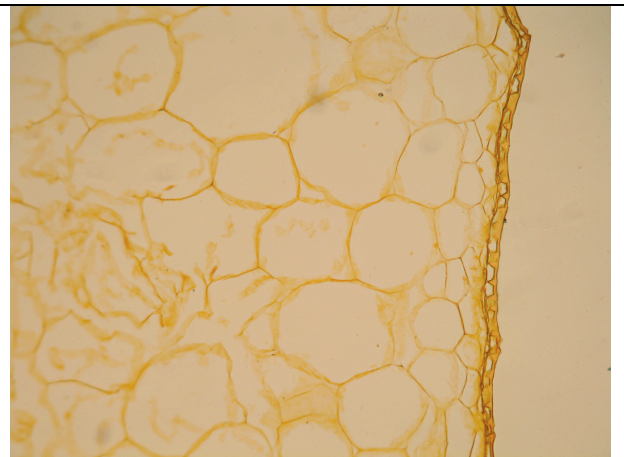
Εικόνα 37: Ανοσοεντοπισμός της ΑΟΧ σε εγκάρσια τομή αναπτυσσόμενου σπέρματος από κόκκινο ώριμο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. Έμβρυο (EM), ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ).



Εικόνα 38: Ανοσοεντοπισμός της ΑΟΧ σε εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού κόκκινου ώριμου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ) διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.



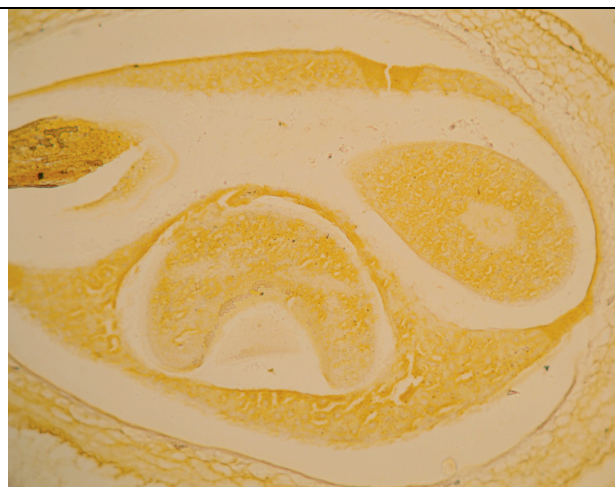
Εικόνα 41: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή ένσπερμου κόκκινου ώριμου καρπού στην περιοχή του σπέρματος. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.



Εικόνα 42: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού κόκκινου ώριμου καρπού στην περιοχή του περικαρπίου. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.



Εικόνα 41: Σπέρμα από ώριμο κόκκινο καρπό. (ΕΜ) έμβρυο (ΕΣ) ενδοσπέρμιο. Η παρουσία του ενζύμου ήταν έντονη στο σπέρμα.



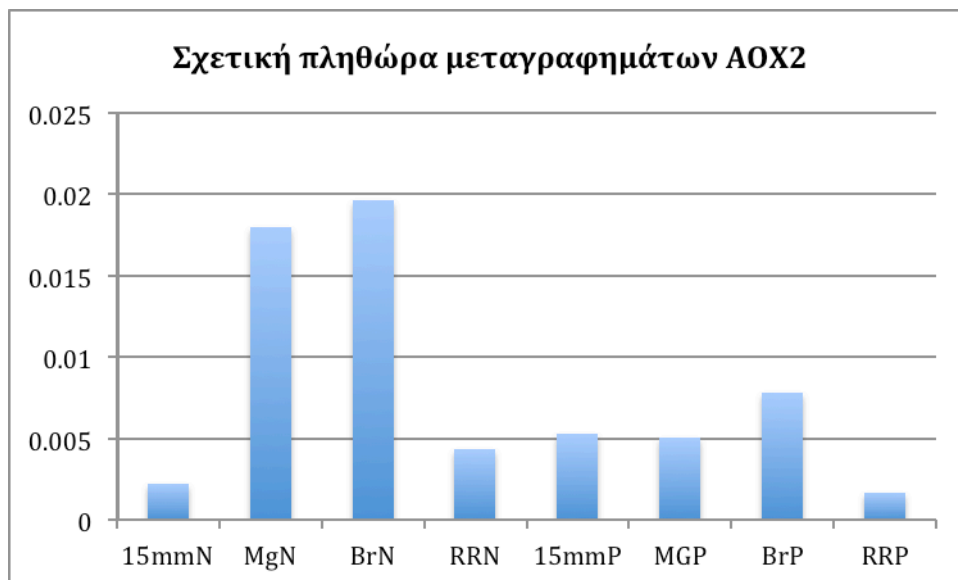
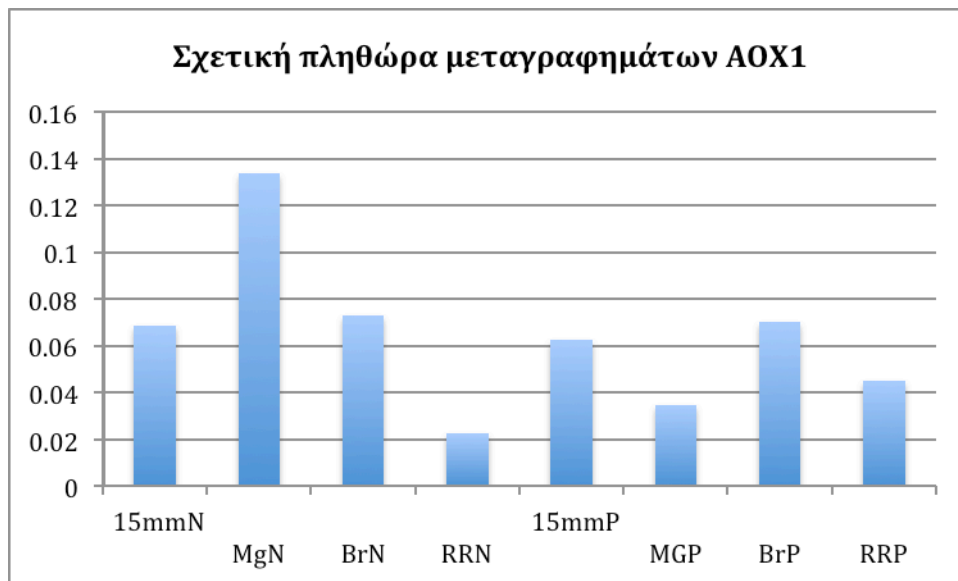
Εικόνα 42: Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού κόκκινου ώριμου καρπού στην περιοχή του περικαρπίου. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

3.2 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων

Τα αποτελέσματα της ανοσοανίχνευσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καρπού τομάτας cherry στο στάδιο της αλλαγής χρώματος μετά την ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης φαίνονται στην Εικόνα 43. Τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα κατά της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης αναγνώρισαν δύο πεπτίδια (βέλη).

Εικόνα 43: Ανοσοεντοπισμός της ΑΟΧ σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτρομεταφορά τους από πηκτή πολυακρυλαμίδης. Με βέλη σημειώνονται οι 2 ζώνες που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα.

3.3 Πληθώρα μεταγραφημάτων της ΑΟΧ κατά την ανάπτυξη των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών.



Η εν γένει πληθώρα των μεταγραφημάτων ήταν μεγαλύτερη στους ένσπερμους καρπούς, το γεγονός αυτό κατά πάσα πιθανότητα οφείλεται στην ύπαρξη του σπέρματος και στη μεταβολική του δραστηριότητα. Το στάδιο της αλλαγής του χρώματος σε όλες τις

περιπτώσεις παρουσιάζει μεγάλο σχετικό αριθμό μεταγραφημάτων, το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στην κλιμακτήριο του καρπού. Στους ένσπερμους καρπούς και στους δύο ισότυπους ανιχνεύτηκαν περισσότερα μεταγραφήματα στα στάδια του ώριμου πράσινου καρπού καθώς και στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος. Στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η σχετική πληθώρα των μεταγραφημάτων παρουσιάζεται μειωμένη, το γεγονός πιθανά υποδηλώνει μικρότερη γενικά μεταβολική δραστηριότητα στον καρπό σε αυτό το στάδιο. Στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού διαπιστώθηκε στους ένσπερμους καρπούς μεγάλη σχετικά πληθώρα μεταγραφημάτων συγκριτικά με τους παρθενοκαρπικούς καρπούς, το γεγονός αυτό πιθανά αποδίδεται στην μεταβολική δραστηριότητα των σπερμάτων.

4. Συζήτηση/Συμπεράσματα

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δεν προκύπτει κάποια δημοσιευμένη έρευνα που να πραγματεύεται το θέμα της παρούσας μελέτης τόσο ως προς το σκέλος της έρευνας σχετικά με την ΑΟΧ κατά την ανάπτυξη του καρπού της τομάτας cherry, όσο και τη μελέτη του ενζύμου σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς. Οι περισσότερες μελέτες σχετικά με το ένζυμο, πραγματεύονται τη λειτουργία του σε συνθήκες καταπόνησης (Wagner, 1995; Clifton et al., 2005; Noctor et al., 2007;).

Οι πληροφορίες στη βιβλιογραφία σχετικά με τη δραστικότητα της ΑΟΧ δεν μπορούν να δώσουν μια πλήρη εικόνα σχετικά με την πραγματική λειτουργία του ενζύμου στο μεταβολισμό. Το πιθανότερο είναι ότι η δραστικότητα της ΑΟΧ "αποφορτίζει" την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, προσφέροντας μια εναλλακτική οδό που αν και δεν προσφέρει ενέργεια στο κύτταρο, προστατεύει από τη δημιουργία ενεργών μορφών οξυγόνου που παράγονται σε συνθήκες υπερβολικής μεταβολικής δραστηριότητας (Purvis, 1997; Maxwell et al., 1999; Robson and Vanlerberghe, 2002; Noctor et al., 2007; Rasmusson et al., 2009). Η υπόθεση αυτή είναι σε αντιστοιχία με τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος, όπου στους ένσπερμους καρπούς, όπου αναμένεται μεγαλύτερη μεταβολική δραστηριότητα λόγω ακριβώς της ύπαρξης του σπέρματος, η σχετική πληθώρα των μεταγραφημάτων βρέθηκε συνολικά μεγαλύτερη. Επίσης και ο ιστοχημικός εντοπισμός του ενζύμου ενισχύει τον

παραπάνω ισχυρισμό, αφού το ένζυμο εντοπίστηκε στα σπέρματα σε όλες τις περιπτώσεις.

Αναφορικά με τη σχετική πληθώρα των μεταγραφημάτων, ο αριθμός των μεταγραφημάτων της AOX 1 ήταν σημαντικά αυξημένος συγκριτικά με την AOX 2. Το γεγονός είναι σε αντιστοιχία με τη βιβλιογραφία, όπου αναφέρονται 4 ισοένζυμα που ανήκουν στην ομάδα AOX 1 ενώ μόνο ένα ισοένζυμο της AOX 2 στη τομάτα (Considine et al., 2002; Navet et al., 2003; Rasmusson et al., 2009).

Αναφέρεται ότι παράγοντες που επάγουν αυξανόμενες ποσότητες ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) οδηγούν γενικά σε αύξηση της έκφρασης του ενζύμου (Clifton et al., 2005; Noctor et al., 2007). Δεδομένου του γεγονότος ότι πληθώρα των μεταγραφημάτων ήταν σε όλες τις περιπτώσεις και των δύο ισοενζύμων υψηλή κατά τη διάρκεια του σταδίου της αλλαγής του χρώματος και δεδομένου επίσης ότι το στάδιο αυτό ταυτίζεται με την κλιμακτήριο του καρπού όπου η μεταβολική δραστηριότητα αυξάνεται κατακόρυφα, τα ευρήματα του πειράματος, ενισχύουν τον παραπάνω ισχυρισμό. Επιπρόσθετα, ο εντοπισμός του ενζύμου σε όλα τα στάδια, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες όπου και εκεί η μεταβολική δραστηριότητα αναμενεται σχετικά αυξημένη, είναι μια ακόμα ένδειξη που υποστηρίζει την υπόθεση αυτή.

5. Βιβλιογραφία

- Abdalla AA, Verkerk K** (1968) Growth, flowering and fruit set of the tomato at high temperature. *Neth J Agri Sci* **16**: 71-76
- Alabadí D, Aguero MS, Pérez-Amador MA, Carbonell J** (1996) Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries: changes in unpollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin and gibberellin. *Plant Physiol* **112**: 1237-1244
- Albury MS, Elliott M, Moore AL** (2010) Ubiquinol-binding site in the alternative oxidase: Mutagenesis reveals features important for substrate binding and inhibition *Biochimica et Biophysica Acta* **1797**: 1933–1939
- Allaby M** (1998) Oxford dictionary of plant sciences. Oxford University Press, New York. pp. 262
- Araújo WL, Ishizaki K, Nunes-Nesi A, Larson TR, Tohge T, Krahnert I, et al.** (2010) Identification of the 2-hydroxyglutarate and isovaleryl-CoA dehydrogenases as alternative electron donors linking lysine catabolism to the electron transport chain of Arabidopsis mitochondria. *Plant Cell* **22**:1549–63.
- Archbold DD, Jr Dennis FG, Fiore JA** (1982) Accumulation of ¹⁴C labelled material from foliar-applied ¹⁴C sucrose by tomato ovaries during fruit set and initial development. *J Am Soc Hort Sci* **107**: 19-23
- Asahira T, Hosoki T, Shinya K** (1982) Regulation of low temperature-induced malformation of tomato fruit by plant growth regulators. *J Jpn Soc Hort Sci* **50**: 468-474
- 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
- Asahira T, Takagi H, Takeda Y, Tsukamoto Y** (1968). Αναφορά από **Atherton J, Rudich G** (1986)
- Asahira T, Takagi H, Takeda Y, Tsukamoto Y** (1968). Αναφορά από **Atherton J, Rudich G** (1986)
- Atherton J, Rudich G** (1986) Tomato crop. A scientific basis for improvement. Chapman and Hall UK
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L** (2004) Βιοχημεία Πανεπιστημιακές εκδόσεις κρήτης.
- Berthold DA, Voevodskaya N, Stenmark P, Gräslund A, Nordlund P** (2002) EPR studies of the mitochondrial alternative oxidase evidence for a diiron carboxylate center, *J. Biol. Chem.* **277**: 43608–43614.
- Bohner J, Bangerth F** (1988). Αναφορά από **Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993)
- Brown AHD, Nero E, Zon YD, Dagan O** (1978). Genetic variation in natural populations of wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Genetica*, **49**, 97-108.
- Bunger-Kibler S, Bangerth F** (1982) Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of

tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regul* **1**: 143-154

- Bunik VI, Fernie AR** (2009) Metabolic control exerted by the 2-oxoglutarate dehydrogenase reaction: a cross-kingdom comparison of the crossroad between energy production and nitrogen assimilation. *Biochem J* **27**:405–21.
- Chew O, Whelan J, Millar AH** (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria reveals dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J Biol Chem* **278**: 46869–46877
- Clifton R, Lister R, Parker KL, Sappl PG, Elhafez D, Millar AH, Day DA, Whelan J** (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **58**: 193 – 212
- Clifton R, Lister R, Parker KL, Sappl PG, Elhafez D, Millar AH, et al.** (2005) Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* **58**:193–212.
- Considine MJ, Holtzapffel RC, Day DA, Whelan J, Millar AH** (2002) Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol* **129**: 949–953
- Considine MJ, Holtzapffel RC, Day DA, Whelan J, Millar AH** (2002) Molecular distinction between alternative oxidase from monocots and dicots. *Plant Physiol* **129**: 949–953
- 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
- 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
- Davies JW, Cocking EC** (1965). Αναφορά από **Atherton J, Rudich G** (1986)
- Day DA, Krab K, Lambers H, Moore A L, Siedow JN, Wagner AM, Wiskich JT** (1996) The cyanide-resistant oxidase: To inhibit or not to inhibit, that is the question. *Plant Physiol* **110**: 1-2.
- Day DA, Wiskich JT** (1995) Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J Bioenerg Biomembr* **27**: 379–385
- Dutilleul C, Driscoll S, Cornic G, De Paepe R, Foyer CH, Noctor G** (2003) Functional mitochondrial complex I is required by tobacco leaves for optimal photosynthetic performance in photorespiratory conditions and during transients. *Plant Physiol* **131**: 264–275
- FAO** (1985). Αναφορά από **Wangdi PC** (1992) Cherry tomato varietal trial. In: Training report 1991. 10th Regional Training Course in Vegetable Production and Research. AVRDC-TOP Bangkok, Thailand
- Fernie AR, Carrari F, Sweetlove LJ** (2004) Respiratory metabolism: glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. *Curr Opin Plant Biol* **7**:254–61
- Finnegan PF, Soole KL, Umbach AL** (2004) Alternative mitochondrial electron transport proteins in higher plants. In: Day DA, Millar H, Whelan J (eds) *Plant Mitochondria: from Genome to Function Vol 17*; Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 163–230
- Fos M, Nuez F, Garcia-Martinez JL** (2000) The gene pat-2, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol* **122**: 471-479

- Fos M, Proano K, Alabadí D, Nuez F, Carbonell J, García-Martínez JL** (2003) Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic pat-2 tomato ovaries. *Plant Physiol* **131**: 359-366
- Fos M, Proano K, Nuez F, Garcia-Martinez JL** (2001) Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system pat-3/pat-4 in tomato. *Physiol Plantarum* **111**: 545-550
- Frehner M, Pozueta-Romero J, Akazawa T** (1990) Enzyme Sets of Glycolysis, Gluconeogenesis, and Oxidative Pentose Phosphate Pathway Are Not Complete in Nongreen Highly Purified Amyloplasts of Sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) Cell Suspension Cultures. *Plant Physiol.* **94**(2):538-544.
- Fu LJ, Shi K, Gu M, Zhou YH, Dong DK, Liang WS, Song FM, Yu JQ** (2010) Systemic induction and role of mitochondrial alternative oxidase and nitric oxide in a compatible tomato-*Tobacco mosaic virus* interaction *Molec Plant-Microbe Interact* **23**:39-48
- George W, Scott J, Spiltstoeser W** (1984) Parthenocarpy in tomato. *Hort Rev* **6**: 65-84
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451
- Givan CV** (1999) Evolving concepts in plant glycolysis: two centuries of progress *Biological Reviews* **74**(3): 277-309
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM** (2006) AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1873-1886
- Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005) Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biol* **7**: 131-139
- Gough C, Hobson GE** (1990) A comparison of the productivity, quality, shelf life characteristics and consumer reaction to the crop from cherry tomato plants grown at different levels of salinity. *J Hort Sc* **65**: 431-439
- Grierson D, Kader AA** (1986) Fruit ripening and quality. In: *The Tomato Crop*. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company. pp. 241-275
- Groot SPC, Bruinsma J, Karssen CM** (1987) The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: Studies with a gibberellin-deficient mutant. *Physiol Plantarum* **71**: 184-190
- Gustafson FG** (1936) Inducement of fruit development by growth promoting chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* **22**: 628-636
- Gustafson FG** (1942) Parthenocarpy: natural and artificial. *Bot Rev* **8**: 599-654
- Hallman E, Kobryń J** (2003) Yield and quality of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) cultivated on rockwool and cocofibre. *Acta Horti* **614**: 693-697
- Harris WM, Spurr AR** (1969) Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am J Bot* **56**: 380-389
- Harris WM, Spurr AR** (1969) Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am J Bot* **56**: 380-389
- Heiser C, Anderson G** (1999). Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007)
- Ho LC, Hewitt JD** (1986) Fruit development. In: *The Tomato Crop*. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company. pp. 201-239
- Ho LC, Sjut V, Hoad GV** (1983) The effect of assimilate supply on fruit growth and hormone levels in tomato plants. *Plant Growth Regul* **1**: 155-171

- Ho LHM, Giraud E, Uggalla V, Lister R, Clifton R, Glen A, et al.** (2008) Identification of regulatory pathways controlling gene expression of stress-responsive mitochondrial proteins in arabidopsis. *Plant Physiol* **147**:1858–1873.
- Hobson G** (1988) Cherry tomatoes. *The Garden* pp 55-60
- Holtzapffel RC, Casteli J, Finnegan PM, Millar AH, Whelan J, Day DA** (2003) A tomato alternative oxidase protein with altered regulatory properties. *Biochim Biophys Acta* **1606**: 153–62
- Houghtalin HB** (1935). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986)
- Ishizaki K, Schauer N, Larson TR, Graham IA, Fernie AR, Leaver CJ.** (2006) The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of Arabidopsis in extended darkness. *Plant J* **47**:751–60.
- Kataoka K, Uemachi A, Nonaka M, Yazawa S** (2004) Effect of endogenous gibberellins in the early stages of fruit growth and development of the 'Severianin' tomato. *J Hort Sci Biot* **79**: 54- 58
- Kataoka K, Uemachi A, Yazawa S** (2003) Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in pat-2 and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Sci Hort* **98**: 9-16
- Kojima K, Tamura Y, Nakano M, Han D-S Niimi Y** (2003) Distribution of indole-acetic acid, gibberellin and cytokinins in apoplast and symplast of parthenocarpic tomato fruits. *Plant Growth Regul* **41**: 99-104
- Koltunow AM, Grossniklaus U** (2003) Apomixis: A developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 547-574
- Lane AN, Fan TWM, Higashi RM** (2009). Metabolic acidosis and the importance of balanced equations. *Metabolomics* **5**(2): 163–165
- Lee WS, Shih-Feng F, Verchot-Lubicz J, Carr JP** (2011) Genetic modification of alternative respiration in *Nicotiana benthamiana* affects basal and salicylic acid-induced resistance to potato virus X *BMC Plant Biology* **11**: 41-51
- Lifschitz E, Brodai L, Hareven D, Hurwitz C, Prihadash A, Pnueli L, Samach A, Zamir D** (1993) Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005)
- Lin S, Splittstoesser WE, George WL** (1983) A comparison of normal seeds and pseudoembryos produced in parthenocarpic fruit of 'Severianin' tomato. *HortScience* **18**: 75-76
- 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
- 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
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 8271 – 8276
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L** (1999) The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc Natl Acad Sci* **96**: 8271–8276.
- Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP** (1998) The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* **125**:

- Meredith FI, Purcell AE** (1966) Changes in the concentration of carotenes of ripening home- stead tomatoes. *J Am Soc Hort Sci* **89**: 544-548
- Millar AH, Atkin OK, Lambers H, Wiskich JT, Day DA** (1995) A critique of the use of inhibitors to estimate partitioning of electrons between mitochondrial respiratory pathways in plants. *Physiologia Plantarum* **95**: 523: 532
- Millar AH, Hoefnagel MHN, Day DA, Wiskich JT** (1996) Specificity of the organic acid activation of alternative oxidase in plant mitochondria. *Plant Physiol* **111**: 613-618.
- Millenaar FF, Lambers H** (2003) The alternative oxidase: in vivo regulation and function. *Plant Biol.* **5**: 2–15
- Mittler R** (2002) Oxidative Stress. Antioxidants and Stress Tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405–410.
- Mohr WP, Stein M** (1969) Fine structure of fruit development in tomato. *Can J Plant Sci* **49**: 549–553
- Muller CH** (1940). Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007)
- Navet R, Jarmuszkiewicz W, Almeida AM, Sluse-Goffart C, Sluse FE** (2003) Energy conservation and dissipation in mitochondria isolated from developing tomato fruit of ethylene-defective mutants failing normal ripening: the effect of ethephon, a chemical precursor of ethylene. *J Bioenerg Biomembr* **35**: 157–168
- Noctor G, De Paepe R, Foyer CH** (2007) Mitochondrial redox biology and homeostasis in plants. *Trends Plant Sci* **12**: 125–134
- Nuez F, Costa J, Cuartero J** (1986) Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties 'Sub- Arctic Plenty', '75/59' and 'Severianin'. *Z Pflanzenzucht* **96**: 200-206
- Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Soressi GP, Mazzucato A, Mariotti L, Ceccarelli N** (2007) Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta* **226**: 877-888
- Pecaut P and Philouze J** (1978) A sha-pat line obtained by natural mutation. *Tomato Genet Coop Rep* **28**: 12-22
- Philouze J** (1985). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005)
- Philouze J** (1989) Natural parthenocarpy in tomato. IV. A study of the polygenic control of parthenocarpy in line 75/59. *Agronomie* **9**: 63-75
- Philouze J, Maisonneuve B** (1978) Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety Severianin. *Tomato Genet Coop Rep* **28**: 12-13
- Preil W** (1973) Influence of temperature on the parthenocarpy of tomatoes. *Angew Bot* **47**: 135-140
- Purvis AC** (1997) Role of the alternative oxidase in limiting superoxide production by plant mitochondria. *Physiol Plant* **100**:165–70.
- Quiros CF** (1974). Αναφορά από **Warnock SJ** (1988) A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *Hortscience* **23**: 669-673
- Rabinowitch HD, Budowski P, Kedar N** (1975) Carotenoids and epoxide cycles in mature-green tomatoes. *Planta* **122**: 91–97
- Raffo A, Leopardi C, Fogliano V, Ambrosino P, Salucci M, Gennaro L, Bugianesi R, Giufridda F, Quaglia G** (2002)

Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. Naomi F1) harvested at different ripening stages. *J Agr Food Chem* **50**: 6550–6556

Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., and Moorman, A.F. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**: 62–66

Rasmusson AG, Fernieb AR, van Dongenb JT (2009) Alternative oxidase: a defence against metabolic fluctuations? *Physiologia Plantarum* **137**: 371–382

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

Robson CA, Vanlerberghe GC (2002) Transgenic plant cells lacking mitochondrial alternative oxidase have increased susceptibility to mitochondria-dependent and independent pathways of programmed cell death. *Plant Physiol* **129**:1908–20.

Rocha M, Licausi F, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Sodek L, Fernie AR, et al. (2010) Glycolysis and the tricarboxylic acid cycle are linked by alanine aminotransferase during hypoxia induced by waterlogging of *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* **152**:1501–13.

Romano AH, Conway T (1996) Evolution of carbohydrate metabolic pathways. *Res Microbiol.* **147**(6-7):448-55

Ross JJ, O'Neill DP (2001) New interactions between classical plant hormones. *Trends Plant Sci* **6**: 2-4

Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Huub L, Kerckhoffs J, Elliott RC (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* **21**: 547-552

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

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

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

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

Simons BH, Millenaar FF, Mulder L, Van Loon LC, Lambers H (1999) Enhanced expression and activation of the alternative oxidase during infection of Arabidopsis with *Pseudomonas syringae* pv tomato. *Plant Physiol* **120**: 529–538

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.

Tanudji M, Sjoling S, Glaser E, Whelan J. (1999) Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria. *J Biol Chem* **274**: 1286–1293.

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

Thirkettle-Watts D, McCabe TC, Clifton R, Moore C, Finnegan PM, Day DA, Whelan J (2003) Analysis of the alternative oxidase promoters from soybean. *Plant Physiol* **133**: 1158–1169

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

- Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007) Tomato. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry: Transgenic Crops*. 59 (ed. Pua EC, Davey MR) Springer-Verlag. pp. 163-180
- Umbach AL, Ng VS, Siedow JN** (2006) Regulation of plant alternative oxidase activity: a tale of two cysteines. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 135–142
- Umbach AL, Wiskich JT, Siedow JN** (1994) Regulation of alternative oxidase kinetics by pyruvate and intermolecular di-sulfide bond redox status in soybean seedling mitochondria. *FEBS Letters* **348**: 181-184.
- Van Aken O, Giraud E, Clifton R, Whelan J** (2009) Alternative oxidase: a target and regulator of stress responses. *Physiologia Plantarum* **137**: 354–361
- van Dongen JT, Gupta KJ, Ramírez-Aguilar SJ, Araújo WL, Nunes-Nesi A, Fernie AR** (2011) Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways *Journal of Plant Physiol.* **168**: 1434–1443
- Vanlerberghe GC, Vanlerberghe AE, McIntosh L** (1994) Molecular genetic alteration of plant respiration (silencing and overexpression of alternative oxidase in transgenic tobacco). *Plant Physiol* **106**: 1503–1510
- Varga A, Bruinsma J** (1986) Tomato. In: *CRC Handbook of Fruit Set and Development*. S.P. Mon- selise, 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
- Voet D, Voet JG, Pratt CW** (2002). *Fundamentals of Biochemistry*, updated edition. New York: Wiley.
- Wagner AM** (1995) A Role for Active Oxygen Species as Second Messengers in the Induction of Alternative Oxidase Gene Expression in *Petunia hybrida* Cells. *FEBS Lett.* **368**: 339–342.
- Wagner AM, Krab K** (1995) The alternative respiration path- way in plants: Role and regulation. *Physiologia Plantarum* **95**: 318-325.
- Wagner AM, Krab K, Wagner MJ, Moore AL** (2008) Regulation of ther- mogenesis in flowering Araceae: the role of the alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta* **1777**: 993–1000
- Walker AJ** (1975). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986)
- Whelan J, Millar AH, Day DA** (1996) The alternative oxidase is encoded in a multigene family in soybean. *Planta* **198**: 197–201
- Wilson LA, Sterling C** (1976) Studies on the cuticle of tomato fruit. I. Fine structure of the cu- ticle. *Z Pflanzenphysiol* **77**: 359 – 371.
- Xuan PT** (1999) Effect of potassium nitrate on seed production of cherry tomato. ARC Training report
- Κατινάκης Π. (2004)** Βιοχημεία Εκδόσεις EMBPYO
- Ολύμπιος ΧΜ** (2001) Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. Σταμούλης, Αθήνα. σελ. 40-44