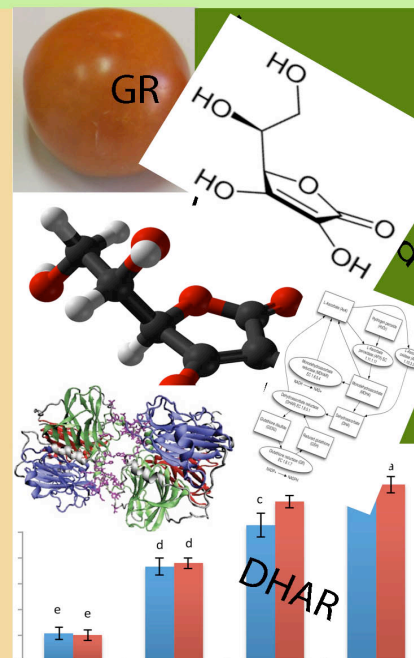


Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας



Φυσιολογικός και βιοχημικός
χαρακτηρισμός του μεταβολισμού
του ασκορβικού οξέος σε ένσπερμους
και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας
τύπου cherry

Διδακτορική διατριβή
Τσανικλίδης Γεώργιος



Αθήνα 2013

Περίληψη.....	5
Abstract	9
Συνοτομογραφίες.....	11
1. Θεωρητικό υπόβαθρο	12
1.1.1 Η ανάπτυξη του καρπού της τομάτας.	12
1.1.2 Ο ρόλος της αυξίνης στην ανάπτυξη των καρπών	13
1.1.3 Το γενετικό υπόβαθρο της παρθενοκαρπίας.	14
1.1.4 Ο ρόλος της αυξίνης στην παρθενοκαρπία.	16
1.2 Το ασκορβικό οξύ (AsA).....	16
1.2.1 Η σημασία του ASA στον άνθρωπο.....	16
1.2.2 Η δομή του AsA και οι λειτουργίες του στα φυτά.	18
1.2.3 Παράγοντες που επιδρούν στη συγκέντρωση του AsA στα φυτά.....	19
2. Πρώτη πειραματική ενότητα	20
2.1 Εισαγωγή.....	20
2.1.1 Η βιοσύνθεση του AsA.....	20
2.1.2 Η GDP-D- 3,5-επιμεράση της μαννόζης (GME, EC 5.1.3.18).....	23
2.1.3 Η αφυδρογονάση της L-γαλακτονολακτόνης (GalLDH) (EC 1.3.2.3).....	24
2.2 Αποτελέσματα	29
2.2.1 Η συγκέντρωση AsA στους αναπτυσσόμενους καρπούς.	29
2.2.3 Ανοσοεντοπισμός GalLDH.....	31
2.3 Μελέτη της πληθώρας των μεταγραφημάτων των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του AsA.....	33
2.3.1 Σχετική έκφραση γονιδίων ενζύμων που σχετίζονται με τον αναβολισμό του AsA.	33
2.4 Συζήτηση	35
2.4.1 Συγκέντρωση του ολικού AsA (tAsA).....	35
2.4.2 Η έκφρασή γονιδίων που σχετίζονται με τον αναβολισμό του AsA.	36
2.4.3 Ανοσοεντοπισμός της GalLDH	37
2.4.4 Συμπεράσματα	38
3. Δεύτερη πειραματική ενότητα	39
3.1 Εισαγωγή.....	39
3.1.1 Οι Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (ROS)	39
3.1.2 Ο μεταβολισμός του AsA	41
3.2 Τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του AsA	43

3.2.1 Η υπεροξειδάση του ασκορβικού (APX, EC 1.11.1.11).....	43
3.2.2 Η έκφραση των γονιδίων και η δραστικότητα της APX	45
3.2.3 Ρεδοκτάση του μόνοδεύδρο ασκορβικού (MDHAR) EC 1.6.5.4	48
3.2.4 Ρεδοκτάση του δεύδρο ασκορβικού (DHAR) EC 1.8.5.1	50
3.2.5 Ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR EC 1.8.1.7).....	51
3.2.6 Η οξειδάση του AsA (AO, EC 1.10.3.3)	52
3.3 Αποτελέσματα	55
3.3.1 Δραστικότητα της APX και της DHAR στους αναπτυσσόμενους καρπούς.....	55
α) Δραστικότητα της APX	55
3.3.2 Ανοσοεντοπισμός της APX	56
3.3.2 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της APX.....	58
3.3.3 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της MDHAR	62
3.3.4 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της DHAR.....	64
3.3.5 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της GR	65
3.3.6 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της AO	67
3.4 Συζήτηση	69
3.4.1 Έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων της APX και της AO	69
3.4.2 Έκφραση των γονιδίων της ανακύκλωσης του AsA.....	71
3.4.3 Ανοσοεντοπισμός της κυτοπλασματικής APX	72
3.4.4 Ενζυμική δραστικότητα της APX και της DHAR.....	73
3.4.5 Συμπεράσματα	74
4. Τρίτη πειραματική ενότητα	75
4.1 Μεταβολισμός του AsA σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς που δέχτηκαν μετασυλλεκτικούς χειρισμούς.....	75
4.1.1 Εισαγωγή.....	75
4.2 Αποτελέσματα.....	77
4.2.1 Η συγκέντρωση AsA.....	77
4.2.2 Δραστικότητα της APX και της DHAR	79
4.3 Μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον αναβολισμό του AsA	81
4.3.1 Σχετική έκφραση της <i>GalLDH</i> και της <i>GME</i>	81
4.4 Μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον καταβολισμό και την ανακύκλωση του AsA	83
4.4.1 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της APX.....	83
4.4.2 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της MDHAR	87

4.4.3 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της <i>DHAR</i>	89
4.4.4 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της <i>GR</i>	91
4.5 <i>Συζήτηση</i>	93
4.5.1 Συγκέντρωση <i>AsA</i> και <i>tAsA</i>	93
4.5.2 Σχετική έκφραση της <i>GalLDH</i> και της <i>GME</i>	95
4.5.3 Σχετική έκφραση της <i>APX</i>	96
4.5.4 Σχετική έκφραση της των γονιδίων των ενζύμων που σχετίζονται με την ανακύκλωση του <i>AsA</i>	97
4.5.5 Δραστικότητα της <i>APX</i> και της <i>DHAR</i>	98
4.5.6 <i>Συμπεράσματα</i>	99
5. <i>Υλικά και μέθοδοι</i>	101
5.1.1 Το φυτικό υλικό.....	102
5.2.1 Χειρισμοί πειράματος δεύτερης πειραματικής ενότητας (μετασυλλεκτικών χειρισμών)	103
5.3.1 Ανοσοεντοπισμός της <i>GalLDH</i> και της <i>APX</i>	104
5.4.1 Οι ηλεκτροφορήσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών.....	108
5.4.2 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.....	109
5.4.3 Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων	110
5.4.4 Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου στις μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης	110
5.4.5 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων	111
5.5 Η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του <i>AsA</i> στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού	112
5.5.1 Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς	112
5.5.2 Έλεγχος της ποιότητας του παραλαμβανόμενου RNA.....	112
5.5.3 Υδρόλυση DNA των δειγμάτων	113
5.5.4 Παρασκευή cDNA	114
5.5.5 Ημιοσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	114
5.5.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR).....	116
5.5.7 Μέτρηση ελεύθερου και ολικού <i>AsA</i> με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC)	119
5.5.8 Εκτίμηση της δραστικότητας της <i>APX</i>	120
5.5.9 Εκτίμηση της δραστικότητας της <i>DHAR</i>	121
5.5.10 Στατιστική επεξεργασία	121
6. Βιβλιογραφία.....	122

Για την πραγματοποίηση της μελέτης αυτής θα ήθελα προσωπικά να ευχαριστήσω:

Τον κ. Γιώργο Αϊβαλάκι, συνοδηγό μου σε αυτό το ωραίο ταξίδι.

Τους κ. Χ.Κ. Πασσαμ και Π. Κατινάκη για τη βοήθεια τις πολύτιμες συμβουλές τους.

Τους κ. Δ. Μπουράνη, Γ. Καραμπουρνιώτη, Γ. Λιακόπουλο και Κ. Ακουμιανάκη των οποίων οι πόρτες ήταν πάντα ανοιχτές για εμένα σε ότι και αν χρειαζόμουν.

Τους κ. Ν. Νικολουδάκη και Κ. Δελή για την θαυμάσια συνεργασία μας.

Τους συναδέλφους μου κ. Γ. Τσιλικόχρυσο, Α. Μπενοβία, Μ.Ε. Νικολοπούλου, Γ. Καραπάνο, Ε. Χρονοπούλου, Θ. Καρανίσα, Ε. Κουρή, Β. Ρούνη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω συνολικά όλους τους συναδέλφους από τα εργαστήρια Φυσιολογίας και Μορφολογίας φυτών, Γενικής και Γεωργικής Μικροβιολογίας, Ενζυμικής Βιοτεχνολογίας, Κηπευτικών Καλλιεργειών και Μοριακής Βιολογίας, για όλες τις συζητήσεις, τη βοήθεια και την ανταλλαγή των προβληματισμών μας.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και την κ. Αγγελική Μπουτίνη.

Ενότητες της παρούσης εργασίας έχουν δημοσιευτεί σε επιστημονικά περιοδικά και έχουν παρουσιαστεί σε επιστημονικά συνέδρια με κριτές.

Tsaniklidis G, Delis K, Liakopoulos G, Karapanos I, Katinakis P, Passam HC, Aivalakis G (2012) Induced parthenocarpic cherry tomato fruits did not shown significant differences in L-ascorbate content but showed different pattern in GalLDH and GME expression Plant Growth Regulation 68 (3): 493-502

Tsaniklidis G, Delis K, Nikoloudakis N, Katinakis P, Passam HC, Aivalakis G L-ascorbic acid metabolism in parthenocarpic and seeded cherry tomatoes (submitted for publication to Plant Growth Regulation).

Γ. Τσανικλίδης, Γ.Λιακόπουλος, Ι. Καραπάνος, Κ. Δελής, Α.Ε. Νικολοπούλου, Π. Κατινάκης, Χ. Πάσσαμ, Γ. Αϊβαλάκης (2011) Μελέτη της συγκέντρωσης του Ασκορβικού οξέως σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς τομάτας τύπου "cherry". 25ο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, Λεμεσός.

Γ. Τσανικλίδης, Γ.Λιακόπουλος, Κ. Δελής, Γ. Αϊβαλάκης (2011) Τα μεταγραφήματα της κυτοπλασματικής Υπεροξειδάσης του Ασκορβικού οξέως, έδειξαν σημαντικές διαφορές σε ένπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". 62ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, Αθήνα.

Γ. Τσανικλίδης, Α. Μπενοβίας, Γ. Αϊβαλάκης (2012) Μελέτη της ρεδουκτάσης του δεϋδροασκορβικού οξέως σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". 2ο Συνέδριο Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας, Αθήνα.

Η ανάθεση της παρούσης μελέτης έγινε με την απόφαση της υπ. αριθ. 6 της 19.1.2010 Γενικής Συνέλευσης του τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας.

Περίληψη

Στην τομάτα, η παρθενοκαρπία προκαλείται συχνά με την επίδραση αυξινών για να ξεπεραστούν τα εμπόδια της γονιμοποίησης που προκαλούνται από τις χαμηλές θερμοκρασίες. Για να εκτιμηθούν τα αποτελέσματα της αγρονομικής αυτής πρακτικής στη φυσιολογία του καρπού και τη διαιτητική αξία της τομάτας τύπου “cherry” στην πρώτη ενότητα αυτής της διατριβής προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του ανηγμένου και ολικού ασκορβικού οξέος σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς. Επιπλέον ανοσοεντοπίστηκε η αφυδρογονάση της γαλακτονολακτόνης και μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων της αφυδρογονάσης της γαλακτονολακτόνης, και της επιμεράσης της GDP-μαννόζης, δύο ενζύμων κλειδιών της βιοσύνθεσης του ασκορβικού οξέος τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς.

Το σήμα εντοπισμού της αφυδρογονάσης της γαλακτονολακτόνης ήταν εντονότερο στις σπερματικές βλάστες και στα ώριμα έμβρυα των ένσπερμων καρπών. Τα αποτελέσματά αυτής της ενότητας προτείνουν ότι αν και υπήρχαν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων της βιοσύνθεσης του ασκορβικού καθώς και στον ανοσοεντοπισμό της αφυδρογονάσης της γαλακτονολακτόνης, αυτές δεν προκάλεσαν σημαντικές διαφορές στη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος των καρπών μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών που παρήχθησαν με την εφαρμογή της αυξίνης.

Στη δεύτερη ενότητα εξετάστηκε ο μεταβολισμός του ασκορβικού οξέος σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η δραστικότητα της υπεροξειδάσης και της ρεδουκτάσης του δεϋδροασκορβικού οξέος, ανοσοεντοπίστηκε η υπεροξειδάση του ασκορβικού και μελετήθηκε η έκφραση όλων των γνωστών γονιδίων που σχετίζονται με την οξειδωση και την αναγωγή του ασκορβικού οξέος κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών. Σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν κυρίως στην έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων 5 και 7 της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος, του κυτοπλασματικού ισοενζύμου της ρεδουκτάσης του μονοδεϋδρο ασκορβικού οξέος και του πλαστιδιακού ισοενζύμου της ρεδουκτάσης της γλουταθειόνης. Η δραστικότητα της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος ήταν ελαφρώς αυξημένη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς κατά την ωρίμανση του καρπού ενώ η δραστικότητα της ρεδουκτάσης του δεϋδροασκορβικού οξέος δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές στις δύο μεταχειρίσεις. Το σήμα του εντοπισμού της

υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος ήταν εντονότερο στις σπερματικές βλάστες και στα αναπτυσσόμενα έμβρυα. Τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι οι ένσπερμοι και παρθενοκαρπικοί καρποί, παρουσίασαν κάποιες διαφορές στο μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος.

Στην τρίτη ενότητα μελετήθηκε η συμπεριφορά των καρπών σε συνθήκες παρόμοιες με διαδεδομένους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς, αναφορικά με τη βιοσύνθεση και το μεταβολισμό του ασκορβικού οξέος σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς. Οι χειρισμοί αφορούσαν, αποκομένους καρπούς που διατηρήθηκαν στις ίδιες συνθήκες με τα φυτά, ή και αποθήκευση τους στους 5 °C ή 10 °C για χρονικό διάστημα πέντε ημερών. Η έκφραση όλων σχεδόν των γονιδίων που μελετήθηκαν ήταν αυξημένη στους καρπούς που αποθηκεύτηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες 5°C και 10°C. Στους αποκομένους καρπούς που τοποθετήθηκαν δίπλα στα φυτά, το ανηγμένο και το ολικό ασκορβικό οξύ ήταν σημαντικά χαμηλότερο ενώ η δραστικότητα της υπεροξειδάσης του ασκορβικού οξέος ήταν αυξημένη ιδίως στους ένσπερμους καρπούς.

Τα παραπάνω ευρήματα καταδεικνύουν ότι ενώ οι καρποί που αποθηκεύτηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες πιθανά υπέστησαν καταπόνηση και απώλεσαν κάποια ποσότητα ασκορβικού οξέως. Η απώλεια ασκορβικού οξέος ήταν σημαντικότερη στους καρπούς που αποθηκεύτηκαν δίπλα στα φυτά γεγονός που υποδηλώνει και σε αυτή τη περίπτωση υπήρχε σημαντική καταπόνηση των καρπών.

Abstract

The auxin treatment in tomato plants is often been used to overcome problems in fruit setting caused by low temperatures. In order to evaluate the effects of this agronomical practice on the fruit physiology and on the dietary value of "cherry" tomato fruits, in the first section of this study, the concentration of free and total ascorbic acid had been evaluated in developing seeded and parthenocarpic fruits. Moreover, the expression of the gene and the immunolocalization of galactono-1,4 lactone dehydrogenase and the expression of GDP-mannose 3,5 -epimerase gene, two key enzymes in ascorbic acid biosynthesis, had been also studied. The immunolocalization signal was stronger in vascular bundles and in the embryos of seeded fruits. The results of this section suggested that even differences had been found in the gene expression of ascorbate biosynthesis and in the immunolocalization of galactono 1,4 lactone dehydrogenase, no significant differences in ascorbic acid had been found between seeded and parthenocarpic fruits induced by auxin.

In the second section, the metabolism of ascorbic acid was examined in seeded and parthenocarpic fruits. For this purpose, the activity of ascorbate peroxidase and of dehydroascorbate reductase, the expression of all characterized genes of ascorbic acid metabolism, as well as the immunolocalization of ascorbate peroxidase, were all examined in developing cherry tomato fruits, both parthenocarpic and seeded. Significant differences were found in the expression of the isoenzymes 5 and 7 of ascorbate peroxidase, in the expression of cytosolic monodehydro ascorbate reductase and on the plastidial glutathione reductase. The activity of ascorbate peroxidase was higher in the maturing parthenocarpic fruits. However, no major differences were found in dehydroascorbate reductase activity. The immunolocalization signal of ascorbate peroxidase was heavy in the embryos. The results of this section suggested that induced parthenocarpy caused some differences in ascorbic acid metabolism.

In the third part of this study the behavior concerning ascorbate biosynthesis and metabolism of seeded and parthenocarpic fruits was studied under temperatures simulating the conditions those of popular postharvest treatments for five days. Almost all genes were up-regulated during cold storage in 5°C and 10°C. Reduced and total ascorbate was considerable lower and ascorbate peroxidase was higher in fruits stored next to plants under the same conditions to the red ripe fruits, especially in seeded fruits. These results indicate that while fruits stored in

low temperatures were probably stressed and exhibited lower Ascorbate levels. However, the fruits stored next to plants suffered heavier losses of ascorbate fact that indicates that also in this case the fruits were significantly stressed.

Συντομογραφίες:

AsA: ασκορβικό οξύ

DHA: δεϋδρο-ασκορβικό οξύ

tAsA: ολικό ασκορβικό οξύ

15mm: ανώριμος πράσινος καρπός διαμέτρου 15mm

Mg: ώριμος πράσινος καρπός

Br: καρπός στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος

CM: καρπός στο στάδιο της εμπορικής ωριμότητας

RR: ώριμος κόκκινος καρπός

NTP: καρπός CM που αποθηκεύτηκε για 5 ημέρες δίπλα στα φυτά

5d5°C: καρπός CM που αποθηκεύτηκε για 5 ημέρες στους 5°C

10d10°C: καρπός CM που αποθηκεύτηκε για 5 ημέρες στους 10°C

GME: 3' 5' επιμεράση της GDP-D-μαννόζης

GalLDH: αφυδρογονάση της 1,4 γαλακτονολακτόνης

APX: υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέος

MDHAR: ρεδοκτάση του μόνοδεϋδρο ασκορβικού οξέος

DHAR: ρεδοκτάση του δεϋδρο-ασκορβικού οξέος

GR: ρεδοκτάση της γλουταθειόνης

AO: οξειδάση του ασκορβικού οξέος

ROS: ενεργές μορφές οξυγόνου

1. Θεωρητικό υπόβαθρο

Η καρπόδεση είναι σημαντικό στάδιο του βιολογικού κύκλου των φυτών που έχει τεράστιες συνέπειες στην αγροτική παραγωγή. Ως καρπόδεση ορίζεται η αύξηση της ωοθήκης σε αναπτυσσόμενο νεαρό καρπό που ακολουθεί συνήθως τη γονιμοποίηση.

Στη τομάτα, όπως και στην πλειονότητα των φυτικών ειδών, η διαδικασία αυτή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη σε περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως οι υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες. Εξαιτίας της ευαισθησίας αυτής, το χρονικό διάστημα της καλλιέργειας της τομάτας περιορίζεται σε περιόδους του έτους όπου οι θερμοκρασίες του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκές (de Jong et al., 2009; Hazra and Dutta 2010). Όμως, η ζήτηση για εκτός εποχής λαχανικά, αυξάνεται συνεχώς ιδιαίτερως στη Βόρεια Ευρώπη και στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής (van der Vorst et al., 2011). Για αυτόν το λόγο η τομάτα καλλιεργείται και σε θερμοκήπια. Σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες ιδίως στη λεκάνη της Μεσογείου, τομάτες καλλιεργούνται σε μη θερμαινόμενα θερμοκήπια ή τούνελ με αποτέλεσμα η καρπόδεση να είναι φτωχή όταν οι θερμοκρασίες του περιβάλλοντος είναι χαμηλές (de Jong et al., 2009). Για την αντιμετώπιση του προβλήματος αυτού, ορισμένοι παραγωγοί που καλλιεργούν τομάτες καταφεύγουν στην παραγωγή παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας. Στη λύση αυτή επίσης, στρέφονται και παραγωγοί που κατέχουν θερμαινόμενα θερμοκήπια για μείωση των εξόδων θέρμανσης (de Jong et al., 2009; Mazzucato et al., 1998).

1.1.1 Η ανάπτυξη του καρπού της τομάτας.

Η ανάπτυξη του καρπού της τομάτας χωρίζεται σε τέσσερις φάσεις (Gillaspy et al., 1993). Η κατά την πρώτη φάση αναπτύσσεται η ωοθήκη και γονιμοποιείται το ωοκύτταρο. Ακολουθούν έντονες κυτταροδιαιρέσεις και διαφοροποίηση των ιστών που διαρκούν 7-10 ημέρες (δεύτερη φάση). Κατά τη φάση αυτή ο καρπός είναι σημαντικός αποδέκτης θρεπτικών στοιχείων κυρίως υδατανθράκων (Kortstee et al., 2007). Κατά τη δεύτερη φάση, τα τοιχώματα της ωοθήκης αναπτύσσονται σε περικάρπιο, ενώ τμήμα του πλακούντα γεμίζει τις κοιλότητες που σχηματίζονται κατά την ανάπτυξη του καρπού και αναπτύσσεται στο ζελατινώδες παρέγχυμα που περιβάλλει τις σπερματικές βλάστες και εν συνεχεία τα σπέρματα (Gillaspy et

al., 1993). Η τρίτη φάση διαρκεί για 6-7 εβδομάδες και κατά τη διάρκεια της αυξάνεται ο καρπός έως ότου αυτός φτάσει στο τελικό του μέγεθος και ωριμάζουν πλήρως τα σπέρματα (Gillaspy *et al.*, 1993). Κατά τη τέταρτη φάση ωριμάζει ο καρπός, αλλάζει το χρώμα του και συσσωρεύονται διαλυτοί υδατάνθρακες. Στη φάση αυτή της αλλαγής του χρώματος του καρπού με την μετατροπή των χλωροπλαστών σε χρωμοπλάστες, παρατηρείται σύντομη αύξηση του ρυθμού της αναπνοής του καρπού καθώς και αύξηση της βιοσύνθεσης αιθυλενίου. Η χαρακτηριστική αυτή συμπεριφορά κατά την ωρίμανση κατατάσσει τους καρπούς της τομάτας στους κλιμακτηριακούς καρπούς. Στο τέταρτο στάδιο επίσης, παρατηρούνται αλλαγές στη πρωτεϊνική σύσταση του καρπού και χαλάρωση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Bartley *et al.*, 1994; Scheible and Pauly, 2004; Alexander and Grierson, 2002). Επιπλέον κατά το στάδιο αυτό παράγονται σάκχαρα, αρωματικές ενώσεις και οργανικά οξέα που έχουν σημαντική επίδραση οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και στη ποιότητα του καρπού (Fuke and Konosu, 1991) (Εικ 1).



Εικόνα

1: Η ανάπτυξη του καρπού της τομάτας "cherry".

1.1.2 Ο ρόλος της αυξίνης στην ανάπτυξη των καρπών

Η αυξίνη θεωρείται σημαντικός παράγοντας για την ανάπτυξη καρπών. Η εφαρμογή φυσικών ή τεχνητών αυξινών σε άνθη που δεν έχουν γονιμοποιηθεί, οδηγεί σε ορισμένα φυτικά είδη σε παρθενοκαρπικούς καρπούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι οι ορμόνες αυτές μιμούνται σήματα που παράγονται από την επικονίαση ή και τη γονιμοποίηση (Molesini *et al.*, 2009). Η κυρίαρχη θεωρία για το ρόλο της αυξίνης στην καρπόδεση υποστηρίζει ότι η ορμόνη πυροδοτεί τη συνέχιση της αύξησης της ωοθήκης μετά την επικονίαση. Πριν την επικονίαση προηγείται καταστολή της αύξησης της ωοθήκης (Pandolfini *et al.*, 2007). Οι Goetz *et al.*, (2006) πρότειναν ότι το ορμονικό σήμα που παράγεται από την επικονίαση οδηγεί στην πρωτεόλυση των πρωτεϊνών που σχετίζονται με την αυξίνη (auxin/indole-3-acetic acid

proteins), η οποία με τη σειρά της πυροδοτεί την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη του καρπού. Ο μηχανισμός αυτός όμως δεν έχει διευκρινιστεί επαρκώς. Οι πρωτεΐνες αυτές θεωρείται ότι καταστέλλουν την έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με την ανάπτυξη των καρπών και κατέχουν κεντρικό ρόλο στο μηχανισμό παραγωγής ορμονικών σημάτων (Overvoorde et al., 2005).

Η δράση της αυξίνης στην ανάπτυξη των καρπών συνδέεται πιθανώς και σε κάποιο βαθμό με τις γιββερελίνες. Οι Serrani et al., (2008) αναφέρουν ότι στην τομάτα, επέμβαση με μίγμα αυξινών και παρεμποδιστών των γιββερελινών μείωσαν την ανάπτυξη των καρπών σε σχέση μάρτυρες που δέχτηκαν μόνο την επίδραση αυξίνης. Επιπλέον, η επέμβαση με αυξίνες σε μη γονιμοποιημένες ωθήκες, επέδρασε στην αύξηση της βιοσύνθεσης και τη μείωση του ρυθμού αδρανοποίησης των γιββερελινών.

Η αυξίνη στα ανώτερα φυτά παράγεται από δύο βιοσυνθετικά μονοπάτια, το ένα είναι εξαρτώμενο από την τρυπτοφάνη ενώ το άλλο όχι (de Jong et al., 2009). Στη τομάτα η αύξηση του καρπού συνδέεται με την παραγωγή αυξίνης που εξαρτάται από την τρυπτοφάνη μόνο κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του καρπού. Κατά το στάδιο της αλλαγής του χρώματος, η παραγωγή της αυξίνης στον καρπό προέρχεται κυρίως από το μονοπάτι που δεν εξαρτάται από την τρυπτοφάνη (Epstein et al., 2002).

Έχει αναφερθεί ότι τα γονίδια που συνδέονται με τη βιοσύνθεση της αυξίνης εκφράζονται περισσότερο στον πλακούντα και στο ζελατινώδες παρέγχυμα από ότι στο περικάρπιο (Lemaire-Chamley et al., 2005). Η ανισορροπία στην παραγωγή αυξίνης στα διάφορα μέρη του καρπού της τομάτας οδηγεί σε διαφορετική συγκέντρωση της ορμόνης στα μέρη αυτά με επίδραση στις κυτταροδιαίρέσεις, στην αύξηση των κυττάρων και στις αλληλεπιδράσεις με άλλες ορμόνες όπως οι γιββερελίνες (Lemaire-Chamley et al., 2005).

1.1.3 Το γενετικό υπόβαθρο της παρθενοκαρπίας.

Σε ορισμένες περιπτώσεις, παρατηρείται στη φύση το φαινόμενο της ανάπτυξης καρπών χωρίς να έχει προηγηθεί γονιμοποίηση και το φαινόμενο αυτό ονομάζεται παρθενοκαρπία (Lukyanenko, 1991). Οι παρθενοκαρπικοί καρποί, όπως είναι φυσικό επακόλουθο, στερούνται σπερμάτων. Η παρθενοκαρπία σε ορισμένα φυτικά είδη είναι δυνατόν να προκληθεί διαμέσου του χειρισμού των ανθέων με ορμόνες.

Τρεις βασικοί παράγοντες προάγουν την παρθενοκαρπία:

α) Διαταραχή στα επίπεδα φυσικών ορμονών, ιδίως στους ιστούς της ωοθήκης (κυρίως της αυξίνης και των γιββερελινών) (de Jong et al., 2009).

β) Τροποποίηση της κατανομής άνθρακα (που ελέγχεται σε γονιδιακό επίπεδο αλλά και με αγρονομικές τεχνικές λχ χαρακώμα στο αμπέλι) (d' Aoust et al., 1999; Vardi et al., 2008)

γ) Αποτυχία γονιμοποίησης μετά την επικονίαση από διάφορους παράγοντες όπως χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες, επίδραση χημικών παραγόντων ή γενετικές ανωμαλίες (Vardi et al., 2008).

Η παρθενοκαρπία παρουσιάζεται σε ορισμένα φυτικά είδη με μεγάλη συχνότητα (Fos and Nuez, 1996; Fos et al., 2003). Στην τομάτα έχουν βρεθεί και περιγραφεί τρεις πηγές γενετικής παρθενοκαρπίας (Phiiouze, 1983, George et al., 1984, Lukyanenko, 1991). Μάλιστα οι σχετικές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην Ρωσική ποικιλία Severianin, στη Γερμανική καθαρή σειρά 75/59 και στη καθαρή σειρά *Montfavet 191* λόγω ακριβώς της σημαντικής παραγωγής παρθενοκαρπικών καρπών κυρίως σε χαμηλές θερμοκρασίες (Fos and Nuez 1996). Η καθαρή σειρά *Montfavet 191* φαίνεται ότι παράγει παρθενοκαρπικούς καρπούς λόγω της ύπαρξης γενετικών τόπων (*loci*) που ονομάστηκαν *rat-1*. Η ποικιλία Severianin παράγει παρθενοκαρπικούς καρπούς λόγω της ομοζυγωτίας στον γενετικό τόπου *rat-2* ενώ η σειρά 75/59 λόγω της ύπαρξης των γονιδίων *rat-3* και *rat-4* που φαίνεται ότι λειτουργούν συνεργιστικά και *αθροιστικά με τον rat-2* (Nuez et al., 1986).

Οι γενετικοί τόποι που εμπλέκονται στην παρθενοκαρπία (*rat-1*, *rat-2*, *rat-3* και *rat-4*) διεγείρουν ένα ή περισσότερα βήματα του μονοπατιού βιοσύνθεσης γιββερελινών, με αποτέλεσμα την αύξηση της έκφρασης των γονιδίων που παράγουν ενεργές γιββερελλίνες και επομένως το σχηματισμό παρθενοκαρπικών καρπών (Gorguet et al., 2005). Επίσης πιθανότατα οι διεργασίες για την παραγωγή παρθενοκαρπικών καρπών, αρχίζουν στα αρχικά στάδια της άνθησης σε χρόνο όπου η ωοθήκη δεν είναι ώριμη για επικονίαση (Fos and Nuez, 1997).

Μια διαφορετική προσέγγιση στην παραγωγή παρθενοκαρπικών καρπών βρέθηκε συμπτωματικά μέσω της παρεμπόδισης βιοσύνθεσης φλαβονοειδών. Οι Schijlen et al., (2007) αναφέρουν ότι σίγηση με RNAi της συνθάσης της χαλκόνης, οδήγησε στην παραγωγή παρθενοκαρπικών καρπών σε άνθη που προηγήθηκε επικονίαση αλλά όχι γονιμοποίηση.

Στη τομάτα έχουν παραχθεί σειρές με μεγάλο ποσοστό παρθενοκαρπίας είτε με διασταυρώσεις με άλλα είδη (λχ με διασταύρωση με το *Lycopersicon hirsutum* Dunal) είτε με τεχνητές μεταλλάξεις (Ziglstra, 1985). Παρόλα αυτά ιδίως στην περίπτωση των καρπών που προέκυψαν από τεχνητές μεταλλάξεις, οι καρποί δεν ήταν κανονικού σχήματος και χρώματος και συνεπώς δεν ήταν εμπορεύσιμες

1.1.4 Ο ρόλος της αυξίνης στην παρθενοκαρπία.

Τα επίπεδα των αυξινών στα άνθη τομάτας έχουν συνδεθεί με την παρθενοκαρπία. Εφαρμογή αυξινών σε ωοθήκες τομάτας ή υπερέκφραση γονιδίων που συνδέονται με τη βιοσύνθεση των αυξινών (Mezzetti et al., 2004), αυξάνουν το ποσοστό των παραγόμενων παρθενοκαρπικών καρπών (Goetz et al., 2007; Ren et al., 2011). Επιπρόσθετα, παρεμπόδιση της μεταφοράς της αυξίνης από τις ωοθήκες οδήγησε στην παραγωγή παρθενοκαρπικών καρπών (Serrani et al., 2008).

Υπερέκφραση γονιδίων που συνδέονται με τη βιοσύνθεση αυξίνης οδήγησε σε διαφορετική έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων, το μεταβολισμό σακχάρων και λιπιδίων, το μεταβολισμό των ορμονών και την αντίδραση σε αυτές (ιδίως της αυξίνης) (Martinelli et al., 2009).

Στους καρπούς της τομάτας αναφέρονται δύο κορυφές της συγκέντρωσης της αυξίνης, η μία οκτώ ημέρες και η άλλη τριάντα ημέρες μετά την επικονίαση. Η δεύτερη κορυφή δεν παρατηρείται στους παρθενοκαρπικούς καρπούς και πιθανά οφείλεται σε παραγωγή αυξίνης από το έμβρυο. Το γεγονός αυτό πιθανώς να ερμηνεύει τη διαφορά μεγέθους που παρατηρείται συχνά μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών (de Jong et al., 2009).

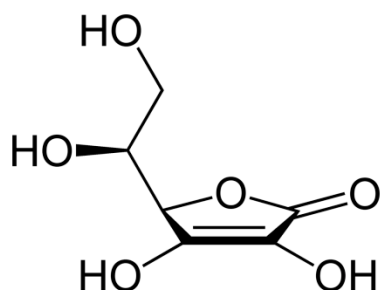
1.2 Το ασκορβικό οξύ (AsA).

1.2.1 Η σημασία του ASA στον άνθρωπο.

Το σκορβούτο, η ασθένεια των ναυτικών, ήταν γνωστό στους αρχαίους Έλληνες και Αιγυπτίους και ήταν συνδεδεμένο με τις μεγάλες εκστρατείες και τις εξερευνητικές αποστολές. Μέχρι το τέλος του 19ου αιώνα, η “ασθένεια” αποτελούσε πρόβλημα για τους μεταλλωρύχους

στην Αλάσκα και στην Καλιφόρνια. Ο πρώτος που μελέτησε συστηματικά την ασθένεια ήταν ο χειρουργός James Lind το 1750 ο οποίος και ανακάλυψε ότι μπορούσε να προλάβει και να εξαλείψει τα συμπτώματα της ασθένειας με τη χορήγηση εσπεριδοειδών. Τελικά οι Holst and Frolich (1907) επιβεβαίωσαν ότι η έλλειψη ασκορβικού οξέος οδηγεί στην ασθένεια, και η ουσία οφείλει το όνομά της στη θεραπεία του σκορβούτου (Chatterjee, 1973; Davey et al., 2000). Τα τελευταία 35 χρόνια έγιναν γνωστές ποικίλες άλλες βιολογικές δράσεις του AsA στον άνθρωπο. Μεταξύ αυτών, είναι η ειδική δράση του στη σύνθεση του κολλαγόνου και στην υγεία των οστών, του δέρματος, των ούλων, των δοντιών κ.α.. Επίσης έχει πλέον αναγνωριστεί ότι η δράση των λευκοκυττάρων και γενικότερα του ανοσοποιητικού συστήματος ενισχύεται από το AsA. Είναι επίσης γνωστή και η αντιοξειδωτική δράση του AsA με προστατευτικές ιδιότητες απέναντι σε ασθένειες όπως ο καρκίνος, οι καρδιαγγειακές νόσοι, η γήρανση και ο καταρράκτης (Davey et al., 2000). Ο λόγος που ο άνθρωπος καθώς και άλλα θηλαστικά όπως ο πίθηκος και τα ινδικά χοιρίδια, μερικά είδη πτηνών και ψαριών πρέπει να λαμβάνουν το AsA μέσω της διατροφής, είναι ότι το τελευταίο ένζυμο της μεταβολικής αλυσίδας σύνθεσης της ένωσης στα είδη αυτά, δηλαδή η οξειδάση της L-γουλονολακτόνης (GULO), δεν είναι λειτουργική (Harris, 1996; Smirnoff, 1996).

Η βιταμίνη C χρησιμοποιείται ευρέως στην βιομηχανία τροφίμων, στην κοσμετολογία, αλλά και στη διατροφή των παραγωγικών ζώων. Όμως το 50% της ποσότητας της συνθετικά παραγόμενης βιταμίνης C, κατευθύνεται στα συμπληρώματα διατροφής και στην παραγωγή άλλων παραϊατρικώνσκευασμάτων (Hancock and Viola, 2002).



Σχήμα 1: Ο χημικός τύπος του AsA (www.wikipedia.org)

1.2.2 Η δομή του AsA και οι λειτουργίες του στα φυτά.

Δομικά το AsA είναι μία από τις πιο απλές βιταμίνες. Προκύπτει από σάκχαρα με έξι άτομα άνθρακα και είναι η αλδοно-1,4-λακτόνη ενός εξανικού οξέος (L-γαλακτονικό ή L-γουλονικό οξύ) και περιέχει μια ομάδα ενεδιόλης στους άνθρακες 2 και 3. Το στερεοϊσομερές του AsA το D-ισοασκορβικό οξύ, έχει ελάχιστες από τις ιδιότητες της βιταμίνης C. Η μετακίνηση των p-ηλεκτρονίων στους άνθρακες C2-C3 στο συζευγμένο σύστημα της ενεδιόλης, καθιστά το υδρογόνο του C3 πολύ ενεργό με αποτέλεσμα να αποσπάται εύκολα με pK_a 4.13, οπότε στο pH των κυττάρων, η ένωση υφίσταται ως μονοσθενές ανιόν (L-ascorbate). Η απόσπαση του δεύτερου υδρογόνου γίνεται με pK_a 11.6 (Davey et al., 2000).

Στα φυτά ο ασκορβικό οξύ (AsA) ή βιταμίνη C, είναι το πιο άφθονο υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό και ανιχνεύεται σε όλους τους φυτικούς ιστούς (Barth et al., 2006). Συσσωρεύεται σε συγκεντρώσεις από 10-230mM στους χλωροπλάστες και η κύρια λειτουργία του είναι να αδρανοποιεί οξειδωτικά παράγωγα της αναπνευστικής και της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας, προστατεύοντας τα ακόρεστα λιπαρά οξέα και το DNA από μη αντιστρεπτή ζημιά από οξείδωση (Smirnoff and Wheeler, 2000). Οι ανάγκες που προκύπτουν από τις μεταβολικές και αναπτυξιακές διεργασίες οδηγούν στην μεταφορά του AsA από ιστούς που είναι ισχυροί παραγωγοί, σε άλλους με μεγαλύτερες ανάγκες που χρειάζεται να καταναλώνουν μεγαλύτερες ποσότητες από το δυναμικό παραγωγής τους. Τέτοιο παράδειγμα είναι τα νεαρά και τα ώριμα φύλλα. Μεταφορά του AsA μέσω του ηθμού, έχει αποδειχθεί με χρήση αυτοραδιογραφίας (Franceschi and Tarlyn, 2002).

Εκτός αυτού το AsA αποτελεί την πρώτη γραμμή άμυνας εναντίον των ενεργών ριζών οξυγόνου (ROS) και βοηθά στην προστασία των κυττάρων από πολλούς παράγοντες που προκαλούν οξειδωτική καταπόνηση όπως το όζον, η αλατότητα, οι προσβολές από παθογόνα, οι τραυματισμοί κλπ (Alhagdow et al., 2007; Suza et al., 2010). Επίσης το AsA εμπλέκεται σε μεγάλο αριθμό ενζυμικών αντιδράσεων όπως και στη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών όπως στην ανακύκλωση της λιποδιαλυτής α -τοκοφερόλης και στη σύνθεση του αιθυλενίου (Smirnoff and Wheeler, 2000; Alhagdow et al., 2007).

Το AsA εμπλέκεται επίσης και στις αναπτυξιακές διεργασίες των φυτών όπως οι κυτταροδιαιρέσεις και η αύξηση των κυττάρων (Garcia et al., 2009). Καλλιέργειες κυττάρων

BY-2 καπνού στις οποίες εκφραζόταν μια αντινοσηματική αφυδρογονάση της L-γαλακτονολακτόνης, βρέθηκαν να παράγουν το 70% του AsA των μαρτύρων και έδειξαν μείωση του ρυθμού αύξησης και ακανόνιστο σχήμα των κυττάρων (Tabata et al., 2001). Αντίστοιχα αποτελέσματα αναφέρονται και σε άλλα φυτικά είδη όπως το *Arabidopsis thaliana* και την πατάτα (Keller et al., 1999; Veljovic-Jovanovic et al., 2001).

Το AsA και τα παράγωγα του είναι πιθανό να λειτουργεί ως σήμα για την επαγωγή αντίδρασης των φυτών σε καταστάσεις καταπόνησης. Αυτό προέρχεται από ενδείξεις από δύο διαφορετικά πειράματα. Στο ένα η δραστηριότητα της οξειδάσης του ασκορβικού είχε αυξηθεί μέσω υπερέκφρασης του γονιδίου στον καπνό (Fotopoulos et al., 2008) και άλλο όπου η έκφραση της ρεδουκτάσης του δεϋδρο-ασκορβικού (DHA) έχει κατασταλεί (Chen and Gallie, 2004), με αποτέλεσμα και στις δύο περιπτώσεις, να μειωθούν οι συγκεντρώσεις του AsA. Και στις δύο περιπτώσεις παρατηρήθηκε κλείσιμο των στοματίων, αύξηση της αντοχής στην έλλειψη νερού, αύξηση του αποπλαστικού DHA. Έτσι, το DHA αναφέρεται ότι είναι πιθανό και στις δύο περιπτώσεις να λειτουργεί ως σήμα που προκαλεί κλείσιμο των στοματίων μαζί με το ABA για την αντιμετώπιση των απωλειών νερού.

1.2.3 Παράγοντες που επιδρούν στη συγκέντρωση του AsA στα φυτά.

Αρκετοί παράγοντες έχουν αναγνωριστεί πειραματικά ότι επιδρούν στα επίπεδα της συγκέντρωσης των φυτών σε AsA. Η συγκέντρωση AsA φαίνεται ότι ακολουθεί τον ημερήσιο κύκλο διακύμανσης με το μέγιστο της να συμπίπτει με τη μέγιστη φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Tamaoki et al., 2003; Chen et al., 2004). Η ηλικία των φύλλων επίσης είναι σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη συγκέντρωση του AsA όπως διαπιστώθηκε στην πατάτα. Τα νεαρά φύλλα βρέθηκε ότι έχουν δεκαπλάσια συγκέντρωση AsA από ότι τα γηρασμένα φύλλα (Bartoli et al., 2000). Τέλος, τα διάφορα φυτικά όργανα, δεν έχουν την ίδια περιεκτικότητα σε AsA. Στο *Arabidopsis thaliana*, η μεγαλύτερη συγκέντρωση AsA μετρήθηκε στο άνθος, ενώ η μικρότερη μετρήθηκε στις ρίζες (Lorence et al., 2004).

Όσον αφορά τον υποκυτταρικό εντοπισμό του AsA, τα διάφορα μέρη του κυττάρου δεν φαίνεται να έχουν τις ίδιες συγκεντρώσεις. Στο κυταρόπλασμα και στους χλωροπλάστες η συγκέντρωση βρέθηκε ότι είναι μεγαλύτερη από ότι στο χυμοτόπιο (Foyer et al., 1983; Davey et al., 2000).

2. Πρώτη πειραματική ενότητα

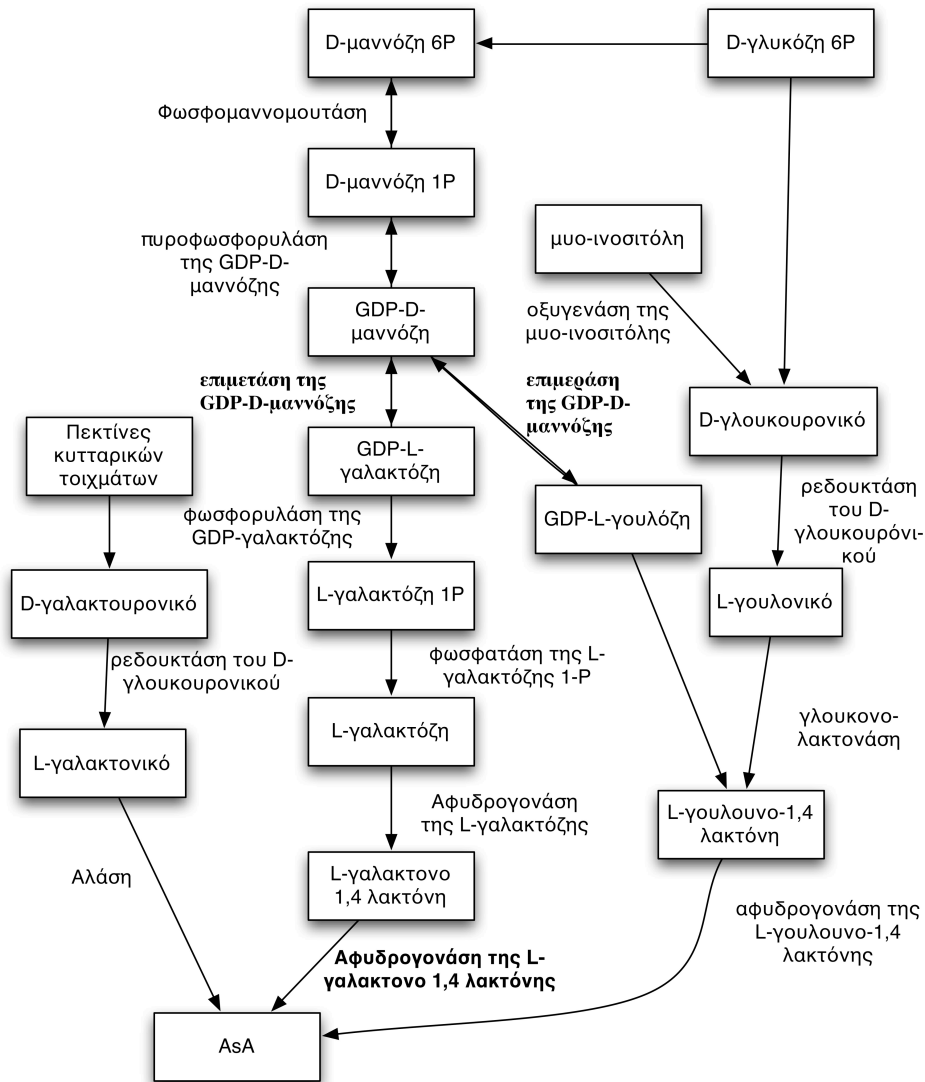
2.1 Εισαγωγή

2.1.1 Η βιοσύνθεση του AsA

Το AsA παράγεται από διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια, στα φυτά, στα ζώα και στους μύκητες, με δράση διαφορετικών ενζύμων. Στα ζώα, στα οποία το μονοπάτι έχει χαρακτηριστεί πολύ καλά, έχει ως αφετηρία την D-γλυκόζη και καταλήγει με τη μετατροπή της L-γουλονο 1,4 λακτόνη σε AsA, από το μικροσωμικό ένζυμο οξειδάση της L-γουλονο 1,4 λακτόνης (GUO) (Smirnoff, 2001; Linster and van Schaftingen, 2007).

Στα φυτά φαίνεται ότι υπάρχουν διαφορετικοί βιοσυνθετικοί οδοί (Σχ 2) για την παραγωγή του AsA, όμως ο χαρακτηρισμός, η λειτουργία και η ταυτοποίηση όλων των ενζύμων που εμπλέκονται δεν έχει ολοκληρωθεί ακόμα (Ioannidi et al., 2009).

Στα φυτά το μεγαλύτερο ποσοστό του AsA φαίνεται ότι παράγεται μέσω του μονοπατιού Smirnoff-Wheeler (Σχ 2) (Smirnoff and Wheeler, 2000; Ishikawa et al., 2006). Πρόσφατες έρευνες ενισχύουν την πεποίθηση αυτή αφού αναφέρουν συσχέτιση της περιεκτικότητας των καρπών σε AsA, σε αρκετά φυτικά είδη, με την έκφραση των γονιδίων του μονοπατιού Smirnoff-Wheeler (Imai et al., 1998; Hancock et al., 2007; Bulley et al., 2009; Badejo et al., 2009). Το μονοπάτι αυτό αποτελεί σήμερα πεδίο σημαντικών ερευνών παγκοσμίως, λόγω κυρίως της σπουδαιότητας του AsA στη διατροφή, την ανάγκη παραγωγής τροφίμων πλουσιότερων σε αυτό, αλλά και την ανάγκη κατανόησης των μηχανισμών αντίδρασης των φυτών σε καταστάσεις αβιοτικής καταπόνησης (Ioannidi et al., 2009).



Σχήμα 2: Τα βασικά μονοπάτια βιοσύνθεσης του AsA στα φυτά.

Το βασικό μονοπάτι όπως προαναφέρθηκε έχει ως αφετηρία τη γλυκόζη 6-P γλυκόζη που μετατρέπεται σε 1-φωσφοφρουκτόζη με την ισομεράση της φωσφορογλυκόζης (GPI, EC:5.3.1.9). Ακολουθεί η μετατροπή της 1-φωσφορο-φρουκτόζης σε 6-φωσφορομαννόζη μέσω της ισομεράσης της φωσφομαννόζης (PMI, EC 5.3.1.8), η οποία μετατρέπεται σε 1-φωσφορομαννόζη μέσω της μούτάσης της φωσφομαννόζης (PMM, EC:5.4.2.8).

Εν συνεχεία, η 1-φωσφορομαννόζη που μετατρέπεται σε GDP-D-μαννόζη μέσω του ενζύμου πυροφωσφορυλάσης της GDP-D-μαννόζης (GMP Ppase, EC 2.7.7.22). Επόμενο στάδιο είναι η μετατροπή της GDP-D-μαννόζης προς GDP-L-γαλακτόζη μέσω του ενζύμου 3' 5' επιμεράση της GDP-D-μαννόζης (GME, EC 5.1.3.18).

Το μονοπάτι, μέχρι αυτό το σημείο, παρέχει εκτός του AsA και πρόδρομες ενώσεις για τη σύνθεση πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων που περιέχουν μαννόζη, L-γαλακτόζη και L-φουκόζη. Το τμήμα του μονοπατιού που ακολουθεί, καταλήγει αποκλειστικά στη βιοσύνθεση AsA (Hancock and Viola, 2005).

Το επόμενο στάδιο είναι η παραγωγή 1-φωσφορο-γαλακτόζης με δράση του ενζύμου φωσφορυλάση της GDP-L-γαλακτόζης (GMP, EC 2.7.7.69). Ακολουθεί η παραγωγή L-γαλακτόζης με δράση του ενζύμου φωσφατάση της L-γαλακτόζης-1-P (GPP, EC 3.1.3.-), ενώ έπεται η παραγωγή L-γαλακτονο-1,4-λακτόνης από την L-γαλακτόζης με δράση του ενζύμου αφυδρογονάση της L-γαλακτόζης (GalLDH, EC 1.1.1.48). Το τελευταίο στάδιο είναι η παραγωγή AsA με τη δράση της αφυδρογονάσης L-γαλακτονο-1,4 λακτόνης (L-GalL DH, EC 1.3.2.3) (Σχ 2).

Μια άλλη βιοσυνθετική οδός χρησιμοποιεί ως πρόδρομο το γαλακτουρονικό οξύ το οποίο μετατρέπεται σε L-γαλακτονικό με δράση ενός ενζύμου που δεν έχει ακόμα χαρακτηριστεί (EC 1.1.1.-). Το γαλακτονικό παράγει L-γαλακτονο-1,4-λακτόνη μέσω ενός ενζύμου που επίσης δεν έχει χαρακτηριστεί (EC 3.1.1.-). Το επόμενο στάδιο είναι κοινό στα δύο μονοπάτια (Agius et al., 2003).

Τα τελευταία χρόνια έχει προταθεί ότι το μονοπάτι βιοσύνθεσης AsA που λειτουργεί στα ζώα, παρουσιάζει κάποια δραστηριότητα και στα φυτά. Αυτό το μονοπάτι περιλαμβάνει τη μετατροπή της μυο-ινοσιτόλης σε D-γλουκουρονικό οξύ με δράση του ενζύμου οξυγενάση την μυο-ινοσιτόλης (EC 1.13.99.1), ακολουθεί η παραγωγή L-γουλονικού μέσω του ενζύμου ρεδουκτάση του γλουκουρονικού (EC 1.1.1.19). Ακολούθως παράγεται L-γουλονολακτόνη, με δράση του ενζύμου γλουκονολακτονάση (EC 3.1.1.17), η οποία ακολούθως μετατρέπεται σε AsA με τη δράση του ενζύμου οξειδάση της γουλονολακτόνης (EC 1.1.3.8) (Davey et al., 1999; Agius et al., 2003; Lorence et al., 2004; Valpuesta and Botella, 2004; Ishikawa et al., 2007). Τα ένζυμα που εμπλέκονται σε αυτό το μονοπάτι δεν έχουν χαρακτηριστεί επαρκώς στα φυτά και δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για τη φυσιολογική σημασία και τη λειτουργία των μονοπατιών *in vivo*.

2.1.2 Η GDP-D- 3,5-επιμεράση της μαννόζης (GME, EC 5.1.3.18).

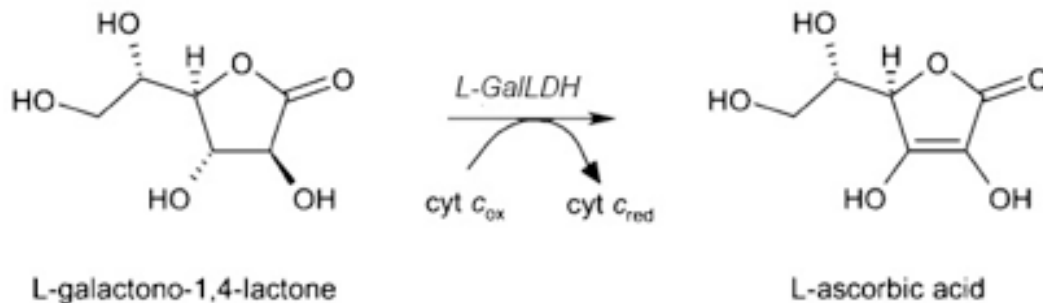
Η GDP-D- 3,5-επιμεράση της μαννόζης (GME, EC 5.1.3.18), η οποία καταλύει τον διπλό επιμερισμό της GDP-D-μαννόζης σε GDP-L-γαλακτόζη, θεωρείται ένα από τα ιδιαίτερος σημαντικά ένζυμα που συμμετέχει σε δύο βιοσυνθετικά μονοπάτια βιοσύνθεσης του AsA, και σε αυτό της L-γαλακτονολακτόνης και σε αυτό της L-γουλουνολακτόνης (Gilbert et al., 2009; Major et al., 2005). Το προϊόν της δράσης του ενζύμου η L-γαλακτόζη, θεωρείται ότι αποτελεί το σύνδεσμο μεταξύ της κύριας βιοσυνθετικής οδού του AsA (με τελικό βήμα την GalLDH) και των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων, επιπλέον η GME αποτελεί το πιο συντηρημένο ένζυμο στην αλυσίδα βιοσύνθεσης του AsA (Wolucka and Van Montagu, 2007). Εκτός από την L-γαλακτόζη, από τη δράση του ενζύμου παράγεται και ένα ακόμα προϊόν πολυμερισμού, η L-γουλόζη η οποία αποτελεί ενδιάμεσο κρίκο στο άλλο βιοσυνθετικό μονοπάτι του AsA αυτό της L-γουλουνολακτόνης το οποίο όμως δεν είναι επαρκώς χαρακτηρισμένο (Wolucka and Van Montagu, 2003). Η κρυσταλική δομή και η μελέτη του μηχανισμού κατάλυσης του ενζύμου αποκάλυψε ότι το ένζυμο μπορεί να καταλύσει οξειδωση, επιμερίωση και αναγωγή από το ίδιο ενεργό κέντρο (Major et al., 2005). Ο ρόλος του ενζύμου στη βιοσύνθεση του AsA στη τομάτα αποδείχθηκε γενετικά μέσω της σίγησης της έκφρασης δύο γονιδίων της GME με RNAi. Τα επίπεδα του AsA των τροποποιημένων φυτών ήταν σημαντικά χαμηλότερα από το μάρτυρα (Gilbert et al., 2009).

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την GME αναφέρεται ότι ρυθμίζει συνολικά τη λειτουργία του βιοσυνθετικού μονοπατιού του AsA σε καταστάσεις καταπόνησης. Σίγηση του γονιδίου της GME με RNAi στην τομάτα προκάλεσε σημαντικές ανωμαλίες στα παραγόμενα φυτά, συγκέντρωση ROS και ανωμαλίες στη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Laing et al., 2007; Wolucka and Van Montagu, 2007). Στο ακτινίδιο, μια σειρά από αβιοτικούς παράγοντες καταπόνησης (χαμηλές και υψηλές θερμοκρασίες, τραυματισμός και χαμηλή ένταση φωτισμού), οδήγησαν σε αύξηση του πλήθους των μεταγραφημάτων της GME (Li et al., 2013). Στη τομάτα, αναφέρεται ότι η έκφραση της GME ήταν συνεχής, ενώ η υπερ-έκφραση του γονιδίου οδήγησε σε αυξημένη αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες, στην αλατότητα και στην οξειδωτική καταπόνηση (Zhang et al. 2011).

2.1.3 Η αφυδρογονάση της L-γαλακτονολακτόνης (GalLDH) (EC 1.3.2.3).

α) Ιδιότητες της GalLDH

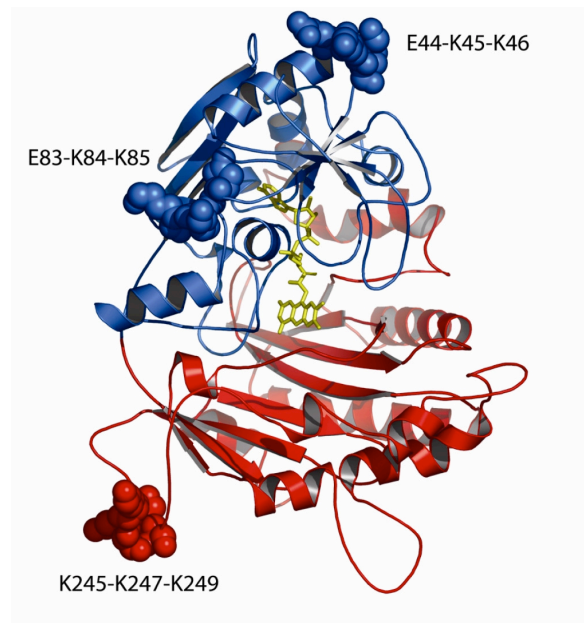
Η αφυδρογονάση της γαλακτονολακτόνης (GalLDH) είναι μία φλαβοπρωτεΐνη που καταλύει το τελευταίο στάδιο στο κεντρικό μονοπάτι της βιοσύνθεσης του L-ασκορβικού οξέος (βιταμίνη C), τη μετατροπή της L-γαλακτονο-1,4-λακτόνης σε ασκορβικό οξύ (AsA), στα ανώτερα φυτά (Alhagdow et al., 2007; Leferink et al., 2008) (Σχ 3). Η αντίδραση αυτή πραγματοποιείται στα μιτοχόνδρια και συγκεκριμένα στην εσωτερική μιτοχονδριακή μεμβράνη (Bartoli et al., 2000; Ioannidi et al., 2009). Ο παραπάνω μηχανισμός, απαιτεί τη συμμετοχή του κυτοχρώματος c ως δεύτερο υπόστρωμα που δέχεται ηλεκτρόνια καθώς η L-γαλακτονο-1,4-λακτόνη μετατρέπεται σε AsA. Το ένζυμο αδυνατεί να καταλύσει την αντίδραση σύνθεσης AsA παρουσία κυανιούχου καλίου που είναι αναστολέας του κυτοχρώματος c (Oba et al., 1995; Bartoli et al., 2000; Leferink et al., 2008). Κατά τη διάρκεια της δράσης του ενζύμου τα ηλεκτρόνια πιθανώς μεταφέρονται στη μιτοχονδριακή αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, μεταξύ των συμπλεγμάτων III και IV (Bartoli et al., 2000).



Σχήμα 3: Τελική αντίδραση σύνθεσης AsA στα φυτά (Leferink 2009)

Η συμμετοχή της GalLDH στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων, είναι σημαντική για τη σωστή λειτουργία των μιτοχονδρίων (Heazlewood et al., 2003; Alhagdow et al., 2007). Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί ότι η GalLDH είναι απαραίτητη για τη σύνδεση και τη σωστή λειτουργία του αναπνευστικού συμπλέγματος I (Pineau et al., 2008; Schertl et al., 2012). Τέλος, εκτός από την κύρια λειτουργία του, τη σύνθεση AsA ($K_m=0,15 \text{ mM}$, $k_{cat}=134s^{-1}$), έχει δειχθεί ότι το ένζυμο καταλύει σε ένα βαθμό και την οξείδωση της γουλονολακτόνης ($K_m=13,1\text{mM}$, $k_{cat}=4,0 \text{ s}^{-1}$), χρησιμοποιώντας το κυτόχρωμα c ως δέκτη ηλεκτρονίων (Yabuta et al., 2000).

Το ένζυμο έχει μια συντηρημένη περιοχή πρόσδεσης με το FAD (vanillyl-alcoholoxidase FAD domain). Όπως και οι περισσότερες οξειδοοδουκτάσες των αλντονολακτονών, το ένζυμο συνδέεται με το FAD με μη-ομοιοπολικό τρόπο (Fraaije et al., 1998; Imai et al., 1998; Yabuta et al., 2000). Η ύπαρξη αυτής της ομάδας πιθανά σημαίνει ότι η φλαβινική ομάδα συμμετέχει στην αντίδραση που καταλύει το ένζυμο (Oba et al., 1995).



Σχήμα 4: Σχηματική παράσταση του ενζύμου της GalLDH η πιθανή περιοχή πρόσδεσης με το FAD χρωματίζεται με μπλε ενώ η cap-domain με κόκκινο (Leferink, 2009) .

Η *in silico* ανάλυση της GalLDH στο πεπόνι και στη γλυκοπατάτα, προβλέπουν τρεις διαμεμβρανικές περιοχές, εντοπισμένες και στα δύο είδη σε παρόμοιες θέσεις (Bartoli et al., 2000; Pateraki et al., 2004). Τα ευρήματα αυτά καταδεικνύουν ότι πιθανά το ένζυμο εντοπίζεται στην εσωτερική μεμβράνη του μιτοχονδρίου με το ενεργό κέντρο να στρέφεται προς τον ενδομεμβρανικό χώρο, παρακάμπτοντας έτσι την ανάγκη μεταφοράς L-γαλακτονολακτόνης και L-ασκορβικού οξέος μέσω της μεμβράνης (Bartoli et al., 2000).

Το ένζυμο εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς του καπνού αλλά και πεπονιού (Tabata et al., 2001; Pateraki et al., 2004). Στο *Arabidopsis thaliana* το γονίδιο AltGLDH κωδικοποιεί ένα πολυπεπτίδιο 610 αμινοξέων, το οποίο παρουσιάζει μεγάλο βαθμό ομολογίας με GalLDH απομονωμένες από άλλα φυτικά είδη που κυμαίνεται από 74-79% (Tamaoki et al., 2003;

Pateraki et al., 2004). Η ομολογία αυτή κυρίως εντοπίζεται στην αμινοτελική περιοχή της αλληλουχίας της L-GalLDH, πράγμα που υποδηλώνει ότι εκεί εντοπίζεται το λειτουργικό κομμάτι του ενζύμου (Østergaard et al., 1997). Στο πεπόνι επιβεβαιώθηκε ότι το ένζυμο κωδικοποιείται από ένα μόνο γονίδιο (Pateraki et al., 2004).

Το ένζυμο έχει απομονωθεί πρώτη φορά από το κουνουπίδι (Mapson and Breslow 1958) και στη συνέχεια από πολλά άλλα είδη όπως το φασόλι, την πατάτα, το σπανάκι, την γλυκοπατάτα και τον καπνό (Oba et al., 1995; Mutsuda et al., 1995; Siendones et al., 1999; Yabuta et al., 2000), ενώ έχει επιτευχθεί η ετερόλογη έκφραση και παραγωγή του ενζύμου του καπνού στο *E. coli* (Yabuta et al., 2000).

Παρόλο που στα φυτά φαίνεται να υπάρχουν εναλλακτικά μονοπάτια βιοσύνθεσης του AsA (Agius et al., 2003; Lorence et al., 2004; Ishikawa et al., 2006), το τελευταίο στάδιο της μετατροπής της L-γαλακτονο-1,4-λακτόνης σε AsA, φαίνεται ότι καταλύεται, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, κατά κύριο λόγο από την GalLDH, μιας και αναφέρεται ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων του μονοπατιού Smirnof-Wheeler και της περιεκτικότητας σε AsA σε αρκετά φυτικά είδη (Alhagdow et al., 2007, Hancock et al., 2007; Imai et al., 2009; Bulley et al., 2009; Badejo et al., 2009). Επιπρόσθετα αν και η θεωρία της ύπαρξης διαφορετικών βιοσυνθετικών οδών παραγωγής ασκορβικού οξέως πέραν της GalLDH, κερδίζει έδαφος, όπως έδειξε η κλωνοποίηση των γονιδίων της αφυδρογονάσης του D-γαλακτουρονικού (Agius et al., 2003) και της οξυγενάσης της μυο-ινοσιτόλης (Lorence et al., 2004), η λειτουργία και η σημαντικότητα αυτών των μηχανισμών, μένει να αποδειχτεί *in vivo* (Ioannidi et al., 2009).

β) Έκφραση του γονιδίου και δραστηριότητα του ενζύμου και επίδραση αβιοτικών παραγόντων σε αυτές.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των καρπών τόσο της πορτοκαλιάς όσο και της μανταρινιάς, το πλήθος των μεταγραφημάτων της *GalLDhg* ακολουθούσε το ίδιο πρότυπο. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των καρπών, τα μεταγραφήματα της *GalLDhg*, ήταν σχετικά χαμηλά, στη συνέχεια όμως παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση τους που ακολουθήθηκε από σημαντική

πτώση στο τέλος της ωρίμανσης των καρπών (Yang et al., 2011). Στα φύλλα της μηλιάς, η έκφραση του γονιδίου και η δραστηριότητα του ενζύμου αυξάνεται στα νεαρά φύλλα και κορυφώνεται στα φύλλα 20 ημερών όπου διατηρείται σταθερή μέχρι το στάδιο της γήρανσης, οπότε μειώνεται. Αντίστοιχη περίπου πορεία ακολουθούν και οι συγκεντρώσεις του AsA. Παρόμοια ευρήματα, βρέθηκαν και στα φύλλα της πατάτας (Bartoli et al., 2000). Η έκφραση της *GalLDH* του *Arabidopsis thaliana* ακολουθεί ένα ημερήσιο πρότυπο. Το πρωί τα επίπεδα των μεταγραφημάτων είναι χαμηλά, ενώ αυξάνονται μέχρι ένα μέγιστο που παρατηρείται περίπου στις 18.00. Έπειτα παρατηρείται μείωση των μεταγραφημάτων, μέχρι το επόμενο πρωί. Παρόμοια διακύμανση ακολουθούν και τα επίπεδα L-ασκορβικού οξέος και σε άλλα φυτικά είδη, το οποίο πιθανώς σημαίνει ότι τουλάχιστον μερικώς τα επίπεδα αυτά εξαρτώνται από το ρυθμό μεταγραφής του *AtGLDH*. Επιπρόσθετα, φυτά που παρέμειναν συνεχώς στο σκοτάδι δεν παρουσίασαν την παραπάνω διακύμανση των μεταγραφημάτων και των επιπέδων του AsA (Tamaoki et al., 2003). Επίσης, στον καπνό, έχει δειχθεί ότι η έκφραση του ενζύμου επηρεάζεται θετικά από την ένταση του φωτός (Tabata et al., 2002).

Η σίγηση του γονιδίου *SiGalLDH* που κωδικοποιεί την *GalLDH* σε φύλλα τομάτας, οδηγεί σε σημαντική μείωση του ρυθμού ανάπτυξης, του μεγέθους των οργάνων αλλά και σημαντικές αλλοιώσεις στη μορφολογία των οργάνων του φυτού (Millar et al., 2003; Alhagdow et al., 2007;). Μείωση της ανάπτυξης αλλά και μειωμένο αδελφωμα μετά από σίγηση του γονιδίου βρέθηκε στο στο ρύζι (Liu et al., 2011, 2013). Επίσης, από τη μελέτη διαφορετικών διαγονιδιακών σειρών (Millar et al., 2003; Alhagdow et al., 2007), προέκυψε ότι φαίνεται να υπάρχει ένα κατώφλι δραστηριότητας της *GalLDH*, κάτω από το οποίο τα φυτά δεν μπορούν να πραγματοποιήσουν τις βασικές τους λειτουργίες και είναι θνησιγενή. Ο παραπάνω ισχυρισμός ενισχύεται και από τα ευρήματα των Pineau et al., (2008), που αναφέρουν ότι αν το γονίδιο που κωδικοποιεί την *GalLDhg* στο *Arabidopsis* καταστεί ανενεργό, προκαλείται αναστολή της ανάπτυξης των φυτών στο στάδιο των κοτυληδόνων. Η ανάπτυξη συνεχίστηκε μόνο με εξωγενή προσθήκη AsA. Η επίδραση αυτή πιθανά οφείλεται στη συμμετοχή της *GalLDH* στο σύμπλεγμα I της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια, με αποτέλεσμα η μειωμένη συγκέντρωση του ενζύμου στα φυτά όπου το γονίδιο έχει σιγηθεί, να επηρεάζεται συνολικά η μεταφορά ηλεκτρονίων στα οργανίδια αυτά (Millar et al., 2003; Alhagdow et al., 2007). Πιθανώς, τα ευρήματα που αναφέρονται στη διαφορετική μορφολογία των φυτών,

συνδέονται με δράση του AsA στη διαδικασία μεταφοράς και πρόσληψης ορμονικών σημάτων (Pignocchi et al., 2003, 2006).

Πρωώθηση της έκφρασης του γονιδίου οδηγεί στην αύξηση της περιεκτικότητας σε AsA σε πολλά φυτικά είδη, έως και επτά φορές, όπως στο *Arabidopsis* (Zsigmond et al., 2011) στο ρύζι, (Liu et al., 2011) στο *Lilium davidii* var. *Unicolor* και στον καπνό (Tokunaga et al., 2005).

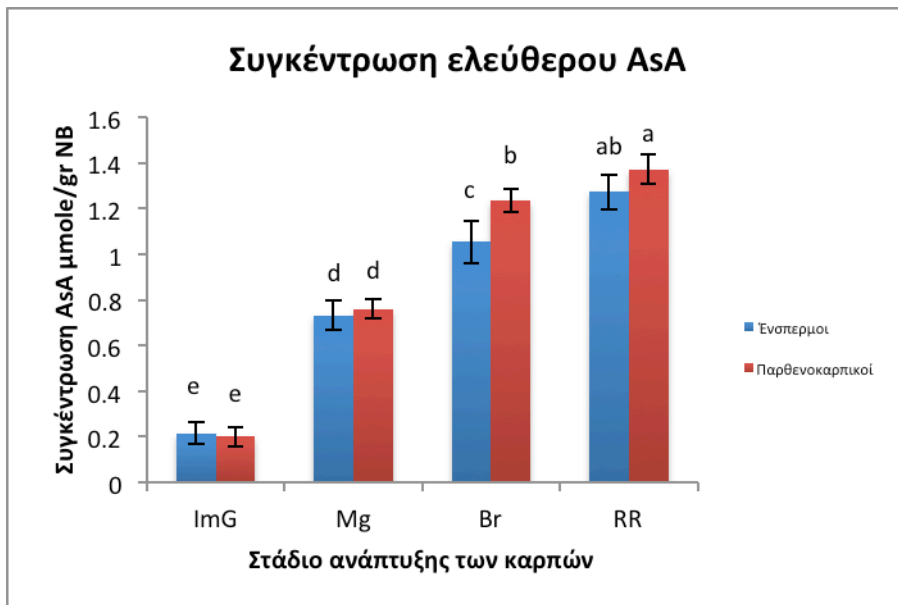
Σε κατάσταση οξειδωτικής καταπόνησης η GalLDH χάνει σχετικά εύκολα τη δραστικότητα της, αν και η μείωση αυτή καθυστερεί αν υπάρχει υψηλή συγκέντρωση είτε AsA, είτε υποστρώματος (L- γαλακτονο-1,4-λακτόνη). Η Cys-340 του ενζύμου είναι αυτή που υπόκειται σε τροποποίηση της θειόλης, μάλιστα η Cys-340 είναι καλά συντηρημένη σε όλες τις οξειδοοδουκτάσες των αλντονολακτονών, πράγμα που πιθανά σημαίνει παρόμοια συμπεριφορά από όλα αυτά τα ένζυμα. Είναι επίσης ενδιαφέρον ότι ενώ η οξείδωση της Cys-340 απενεργοποιεί το ένζυμο, αντικατάσταση της με Ala ή Ser, ελάχιστα μειώνει τη δραστικότητα του ενζύμου (Leferink et al., 2009).

Η δραστικότητα της GalLdhg πιθανά διαφέρει ανάλογα με το φυτικό είδος, τον ιστό και τις συνθήκες του περιβάλλοντος (Loscos et al., 2008) ενώ συσχετίζεται όπως προαναφέρθηκε σε μεγάλο βαθμό με τη περιεκτικότητα των ιστών σε AsA (Li et al., 2009; Shi et al., 2011).

2.2 Αποτελέσματα

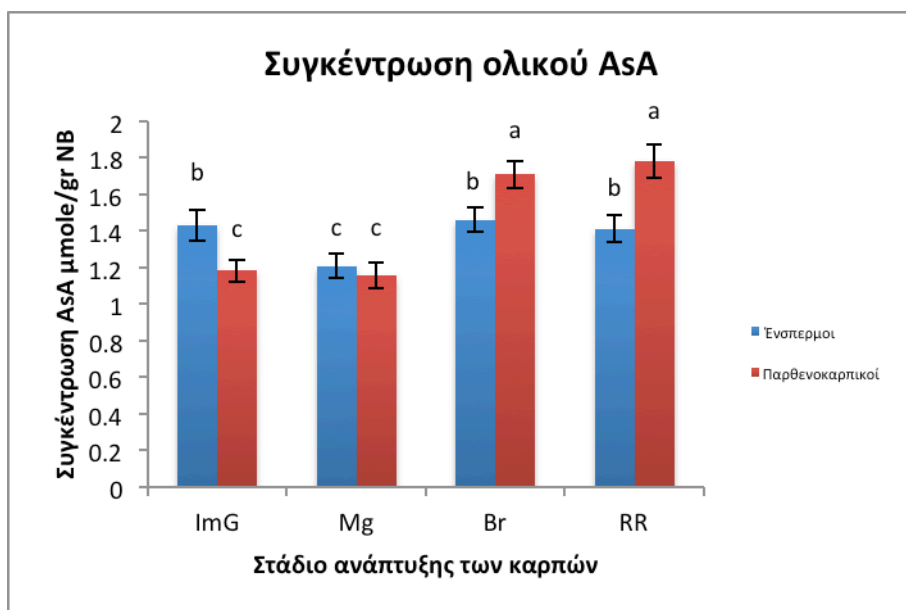
Για την μελέτη του αναβολισμού του του AsA στους αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" μελετήθηκαν η συγκέντρωση του AsA, ανοσοεντοπίστηκε η GalLDH, ενώ εκτιμήθηκε το πλήθος των μεταγραφημάτων των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ένζυμα GME και GalLDH.

2.2.1 Η συγκέντρωση AsA στους αναπτυσσόμενους καρπούς.



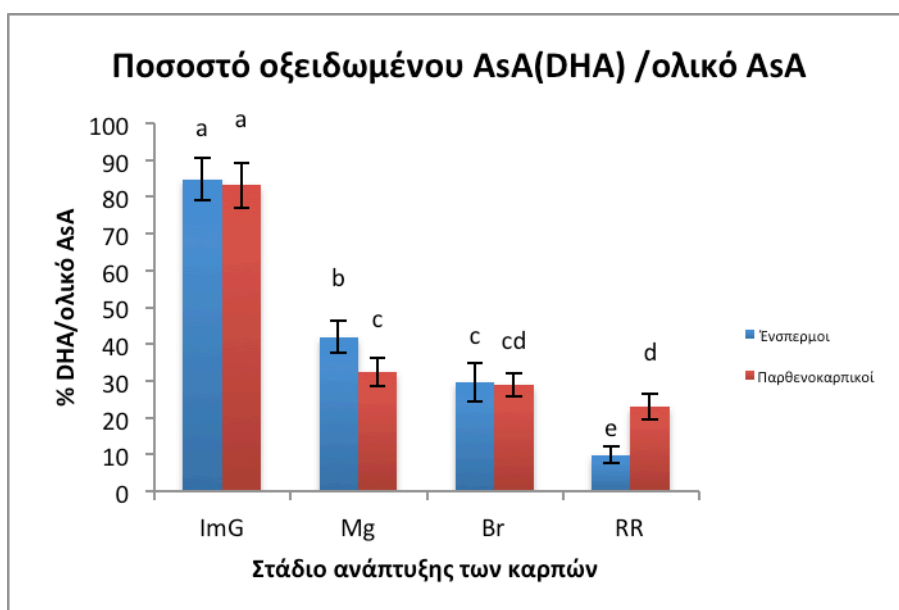
Διάγραμμα 1. Η συγκέντρωση του ελεύθερου AsA σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί, Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί, Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Η συγκέντρωση του ελεύθερου AsA ήταν χαμηλότερη στους ανώριμους πράσινους καρπούς (Διαγρ. 1) και εν συνεχεία αυξήθηκε κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών ανεξάρτητα από την ύπαρξη ή μη σπερμάτων.



Διαγραμμα 2: Συγκέντρωση ολικού AsA σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί, Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί, Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Η συγκέντρωση του ολικού AsA ήταν υψηλότερη στους ένσπερμους καρπούς κατά το στάδιο του ανώριμου πράσινου καρπού (ImG) ενώ μετά την κλιμακτηριακή ωρίμανση (στάδια Br και RR) ήταν υψηλότερη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς (κυρίως λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης ελεύθερου AsA) (Διαγρ. 2). Το γεγονός αυτό δείχνει ότι οι παρθενοκαρπικοί καρποί έχουν σχετικά αυξημένη ενεργή βιταμίνη C σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς.



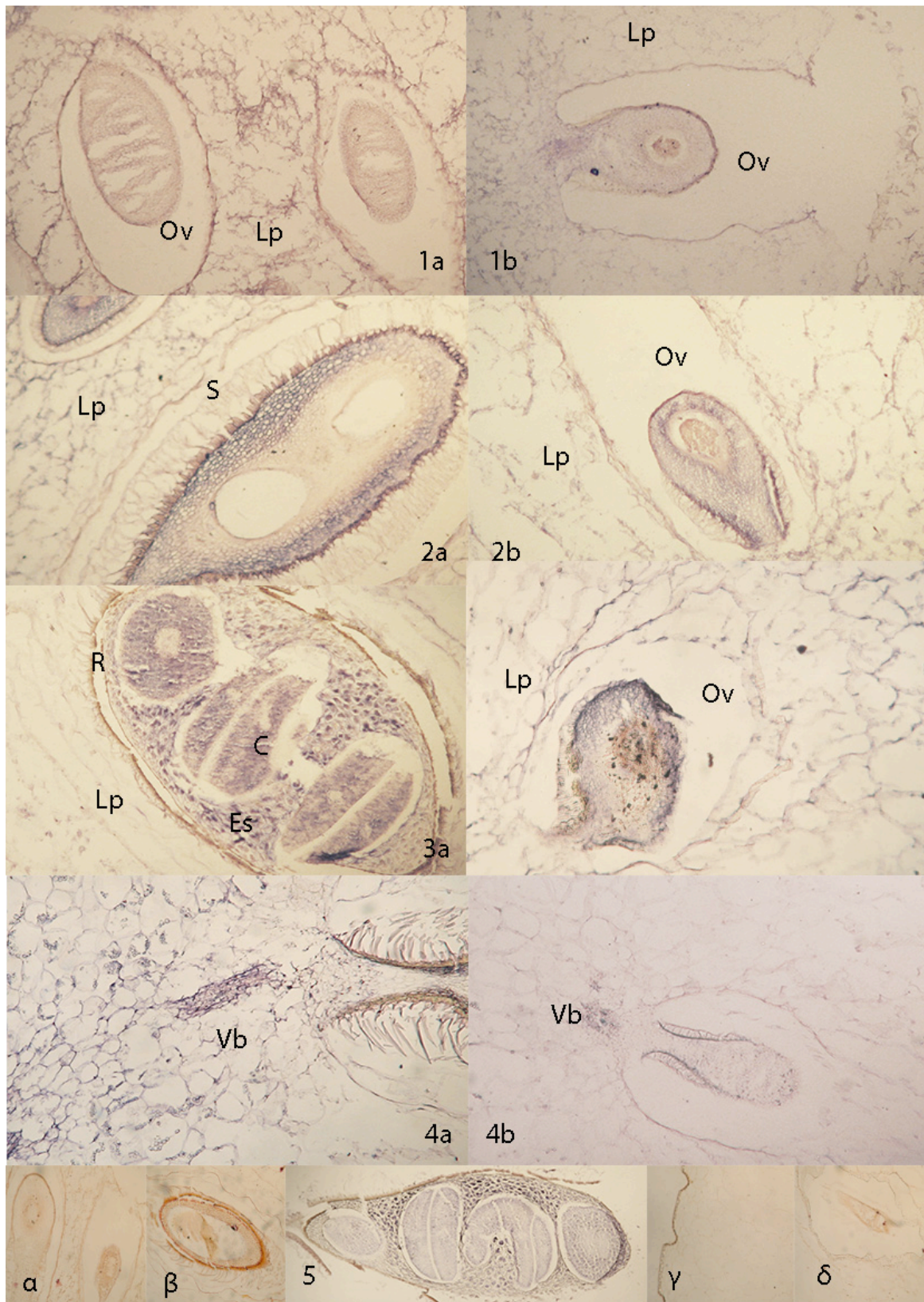
Διαγραμμα 3: Εκατοστιαία αναλογία οξειδωμένου AsA (DHA) προς το ολικό AsA σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί, Mg-ώριμοι

πράσινοι καρποί, Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Η εκατοστιαία αναλογία οξειδωμένου AsA (DHA) προς το ολικό AsA κυμάνθηκε συνολικά από 9 μέχρι 82 % στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς. Με την πρόοδο της ανάπτυξης και της ωρίμανσης των καρπών, το ποσοστό του DHA μειωνόταν σταδιακά ακολουθώντας παρόμοιο πρότυπο στους ένσπερμους παρθενοκαρπικούς καρπούς (Διαγρ. 3).

2.2.3 Ανοσοεντοπισμός GalLDH

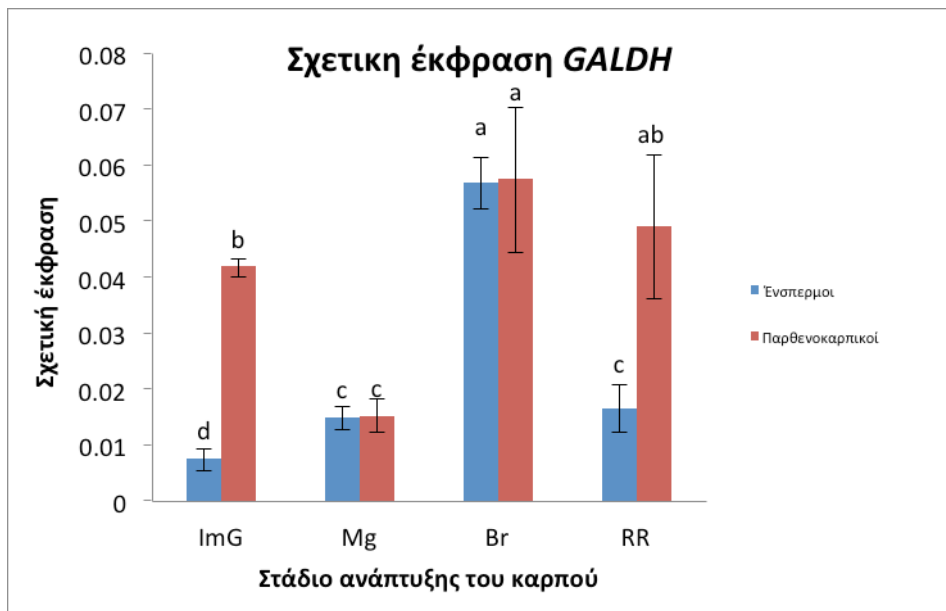
Η ακριβής κατανομή της πρωτεΐνης της GalLDH στους ιστούς της τομάτας, εξετάστηκαν στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς με ανοσοεντοπισμό (Εικ 2, Εικ 3). Η παρουσία του ενζύμου ήταν εντονότερη σε ταχέως αναπτυσσόμενους ιστούς όπως σπερματικές βλάστες και έμβρυα. Το ένζυμο εντοπίστηκαν με ισχυρό σήμα στα αναπτυσσόμενα σπέρματα, το γεγονός αυτό αποτελούσε τη σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των ένσπερμων και των παρθενοκαρπικών καρπών.



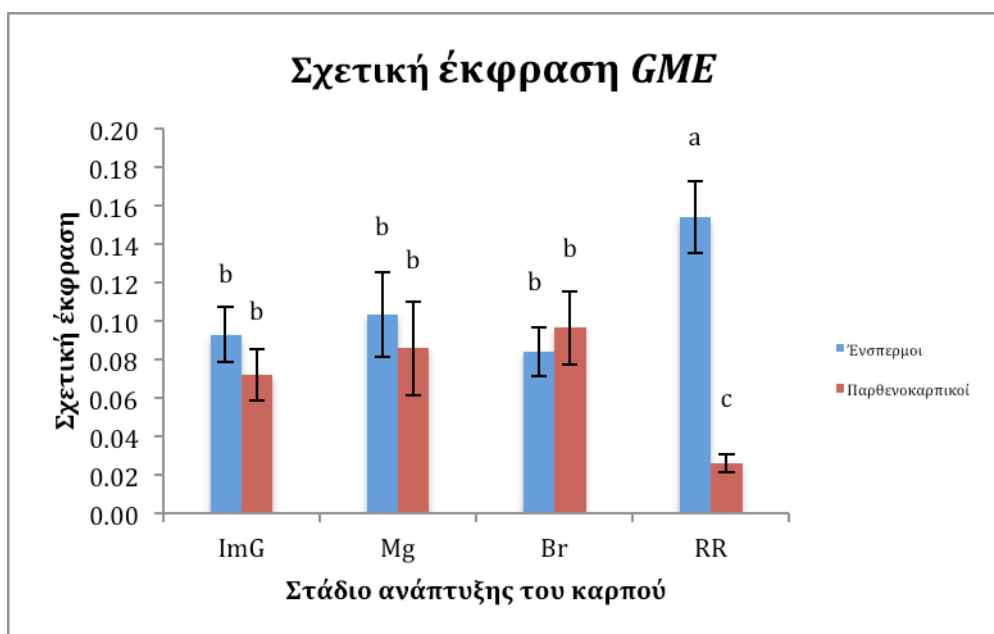
Εικόνα 2: Ανοσοεντοπισμός της GallLDH σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας "cherry". Η παρουσία της πρωτεΐνης καταδεικνύεται με το μπλέ-μωβ χρωματισμό. C : εμβρυακή κοτυληδόνα, Es: ενδοσπέρμιο, LP: ζελατινώδες παρέγχυμα, Ov: ωοθήκη, Vb: ηθμαγγειώδης δεσμίδα. 1-ImG, 2-Mg, 3-Br, 4-RR, 5-σπέρμα. α-ένσπερμοι καρποί, β-παρθενοκαρπικοί καρποί. α-δ μάρτυρας στα τέσσερα στάδια ανάπτυξης ο οποίος έχει χρωματιστεί με σαφρανίνη.

2.3 Μελέτη της πληθώρας των μεταγραφημάτων των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του AsA.

2.3.1 Σχετική έκφραση γονιδίων ενζύμων που σχετίζονται με τον αναβολισμό του AsA.



Διάγραμμα 4: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου της *GALDH* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



Διάγραμμα 5: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου της *GME* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

Η έκφραση της *GalLDH* παρουσίασε διαφορές μεταξύ των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών. Η έκφραση της βρέθηκε σημαντικά αυξημένη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς στο ImG και στο RR ενώ στα στάδια πριν και μετά την κλιμακτήριο Mg και Br, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές της έκφρασης του γονιδίου στα δύο είδη καρπών.

Η έκφραση της *GME* ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης και στα δύο είδη καρπών με περιορισμένη διακύμανση στις δύο επεμβάσεις μέχρι το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης. Στους ώριμους καρπούς (RR) η έκφραση του γονιδίου ήταν σημαντικά αυξημένη στους ένσπερμους καρπούς και σημαντικά μειωμένη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς.

2.4 Συζήτηση

2.4.1 Συγκέντρωση του ολικού AsA (tAsA)

Το AsA είναι ένα χαμηλού μοριακού βάρους αντιοξειδωτικό με παρουσία σε συγκεντρώσεις της τάξεως των mM σε όλους τους φυτικούς ιστούς και συμμετέχει σε διάφορες βιοχημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κυρίως υπό καταστάσεις αβιοτικών ή άλλων καταπονήσεων (Ishikawa and Shigeoka, 2008; Foyer and Noctor, 2011). Λόγω των πολλαπλών φυσιολογικών και βιοχημικών ρόλων του AsA, οι συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού επηρεάζονται μεταξύ των άλλων και από την ηλικία του φυτού, την ώρα της ημέρας και την ένταση του φωτισμού (Zhang et al., 2009; Bartoli et al., 2006). Η συγκέντρωση του tAsA κυμάνθηκε από 1.16 σε 1.78 $\mu\text{mol}/\gamma\text{r}$ NB. Το εύρος τιμών αυτών είναι εντός των ορίων που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Jimenez et al., 2002; Alhagdow et al., 2007).

Εκτός μιας μικρής μείωσης της συγκέντρωσης του tAsA πριν την κλιμακτήριο (Mg), τα επίπεδα του tAsA παρουσίασαν μια σχετική σταθερότητα κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι στους καρπούς υπάρχει ένα μάλλον σταθερό απόθεμα του αντιοξειδωτικού, που αλλάζει την οξειδωτική του κατάσταση ανάλογα με τις ανάγκες των ιστών.

Κατά την ωρίμανση των καρπών το AsA προσδιορίστηκε κυρίως ως ανηγμένο AsA και η αύξηση της συγκέντρωσης του ήταν προοδευτική. Επίσης ανιχνεύθηκε ελαφρά αυξημένη συγκέντρωση του ανηγμένου AsA στους παρθενοκαρπικούς καρπούς σε σχέση με τους ένσπερμους. Παρόμοιο πρότυπο μεταβολής του ανηγμένου AsA κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και ωρίμανσης των καρπών τομάτας διαφόρων ποικιλιών, αναφέρεται και από άλλους ερευνητές (Alhagdow et al., 2007; Gautier et al., 2008; Ioannidi et al., 2009).

Η συγκέντρωση του ανηγμένου AsA κυμάνθηκε στους αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς από 0,2 έως 1,4 $\mu\text{mole}/\gamma\text{r}$ NB. Τα επίπεδα αυτά των συγκεντρώσεων AsA είναι εντός του εύρους τιμών που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία (Gautier et al., 2008; Ioannidi et al., 2009). Καθώς η ανηγμένη μορφή του AsA (βιταμίνη C) είναι σημαντική για τη διατροφή του ανθρώπου, η αυξημένη συγκέντρωση που προσδιορίστηκε στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, είναι ένα επιθυμητό χαρακτηριστικό. Η υψηλότερη συγκέντρωση του AsA στους παρθενοκαρπικούς καρπούς πιθανώς οφείλεται στη

μειωμένη ανάπτυξη του ζελατινώδους παρεγγύματος σε σχέση με το περικάρπιο των παρθενοκαρπικών καρπών δηλ οι παρθενοκαρπικοί καρποί έχουν μεγαλύτερη αναλογία περικαρπίου σε σχέση με τους ένσπερμους. Επειδή η συγκέντρωση του AsA προσδιορίστηκε κατά 20% περίπου υψηλότερη στο περικάρπιο (δεδομένα εκτός αυτής της μελέτης που πρόκειται να δημοσιευθούν) σε σχέση με τη συγκέντρωσή του στο ζελατινώδες παρέγχυμα, η ανατομική αυτή διαφορά πιθανόν να ερμηνεύει την υψηλότερη συγκέντρωση του AsA στους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Παρόμοιες διαφορές της συγκέντρωσης AsA στους ιστούς του καρπού του μήλου αναφέρονται και από τους Li et al., (2010).

Αναφορικά με τη συγκέντρωση του DHA, τα υψηλά επίπεδα στο στάδιο ImG καταδεικνύουν κατά πάσαν πιθανότητα αυξημένη χρήση του ελεύθερου AsA στους αναπτυσσόμενους καρπούς. Κατά την ωρίμανση, οι καρποί φαίνεται ότι έχουν μικρότερες συγκριτικά αντιοξειδωτικές ανάγκες με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται ελεύθερο AsA εις βάρος του DHA. Παρόμοια διακύμανση στη συγκέντρωση οξειδωμένου AsA κατά την διάρκεια της ανάπτυξης και ωρίμανσης των καρπών βρέθηκαν στο ακτινίδιο (Li et al., 2010).

2.4.2 Η έκφραση γονιδίων που σχετίζονται με τον αναβολισμό του AsA.

Παρόλο που η έκφραση της *GalLDH* και της *GME* έχει μελετηθεί στο παρελθόν σε αναπτυσσόμενους καρπούς τομάτας, η επίδραση της παρθενοκαρπίας στην έκφραση των γονιδίων αυτών δεν έχει μελετηθεί μέχρι σήμερα σε βάθος (Alhagdow et al., 2007; Martinelli et al., 2009). Το πρότυπο της έκφρασης του γονιδίου της *GalLDH* υποδηλώνει ότι υπάρχει επίδραση της κλιμακτηριακής αναπνοής στην έκφραση (Alexander and Grierson, 2002), φαινόμενο που παρατηρήθηκε και στους δύο τύπους καρπών. Στους καρπούς πεπονιού (Pateraki et al., 2004) καθώς και στην *Malpighia glabra* (κοιν. ασερόλα) (Badejo et al., 2009) αναφέρεται επίσης αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της *GalLDH* πριν την πλήρη ωρίμανση.

Η αυξημένη έκφραση της *GalLDH* που καταγράφηκε στους παρθενοκαρπικούς καρπούς κατά το στάδιο ImG πιθανώς οφείλεται στη διαφορετική κατανομή της αυξίνης στους καρπούς που στους μεν ένσπερμους παρέχεται σταδιακά από τα αναπτυσσόμενα σπέρματα ενώ στους παρθενοκαρπικούς παρέχεται άπαξ σε μεγάλη δόση.

Η έκφραση της *GME* μελετήθηκε καθώς το ένζυμο αυτό αποτελεί "κόμβο", συμμετέχοντας στα δύο θεωρούμενα σημαντικότερα βιοσυνθετικά μονοπάτια σύνθεσης του AsA στα φυτά δηλ

μέσω της L-γαλακτονο 1,4 λακτόνης ή μέσω της L-γουλουνολακτόνης. Δεδομένου ότι το βιοσυνθετικό μονοπάτι μέσω της L-γουλουνολακτόνης δεν είναι επαρκώς χαρακτηρισμένο, η μελέτη της *GME* επιλέχθηκε ώστε να ερευνηθεί κατά το δυνατόν πληρέστερα η βιοσύνθεση του AsA (Smirnof, 2011). Η έκφραση της *GME* παρουσίασε ομοιότητες με την έκφραση της *GalLDH*. Το πλήθος των μεταγραφημάτων της *GME* στους ένσπερμους και στους παρθενοκαρπικούς καρποί διέφερε σημαντικά μόνο στο στάδιο RR. Η διαφορά αυτή πιθανώς σχετίζεται με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ελευθερού AsA που ανιχνεύτηκε στους παρθενοκαρπικούς καρπούς στο στάδιο αυτό. Είναι πιθανό η συγκέντρωση του AsA να έχει μια σχέση αρνητικής ανατροφοδότησης με την έκφραση του γονιδίου.

2.4.3 Ανοσοεντοπισμός της GalLDH

Ο ακριβής εντοπισμός της πρωτεΐνης της GalLDH έγινε με τη χρήση κατάλληλου αντισώματος. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πληροφορίες που αφορούν τον εντοπισμό του ενζύμου στους φυτικούς ιστούς. Τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού, επαλήθευσαν τη συνεχή παρουσία του ενζύμου σε όλους τους ιστούς των καρπών καθόλα τα στάδια ανάπτυξης τους. Η GalLDH εντοπίστηκε κυρίως στις σπερματικές βλάστες καθώς και στα αναπτυσσόμενα σπέρματα, γεγονός που αποτελεί και τη σημαντικότερη διαφορά μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών. Παρά τον ισχυρό εντοπισμό της GalLDH στα σπέρματα και τη σχετική πληθώρα των σπερμάτων, η συγκέντρωση του ελεύθερου ASA δεν ήταν υψηλότερη στους ένσπερμους καρπούς. Το φαινόμενο αυτό πιθανά οφείλεται στην ταυτόχρονη παρουσία της GalLDH και της APX στα σπέρματα. Η APX οξειδώνει το παραγόμενο από την GalLDH AsA εντός των σπερμάτων. Παρόμοιο εύρημα έχει αναφερθεί για τα σπέρματα κουκιών από τη μελέτη της συγκέντρωσης AsA και της δραστηριότητας της APX (Arrigoni et al., 1992). Παρόλο ότι υπάρχει αναφορά αυξημένης συγκέντρωσης AsA στους μεριστωματικούς ιστούς (Smirnof and Pallanca, 1996) έχει καταγραφεί επίσης μειωμένη συγκέντρωση AsA στα σπέρματα των αναπτυσσόμενων καρπών *Acer platanooides* και *Acer pseudoplatanus*. (Pukacka and Ratajczak, 2010).

2.4.4 Συμπεράσματα

Οι παρθενοκαρπικοί καρποί που προήλθαν από χρήση αυξίνης, δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές με τους ένσπερμους στη συγκέντρωση του ανηγμένου AsA (βιταμίνη C). Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι ένσπερμοι και οι παρθενοκαρπικοί καρποί δεν φάνηκε να είχαν σημαντικές διαφορές στη θρεπτική τους αξία παρόλο που η έκφραση των γονιδίων που μελετήθηκαν παρουσίασαν διαφορές σε κάποια στάδια ανάπτυξης των καρπών.

3. Δεύτερη πειραματική ενότητα

3.1 Εισαγωγή

3.1.1 Οι Ενεργές Μορφές Οξυγόνου (ROS)

Οι ενεργές μορφές οξυγόνου παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της εμπλοκής τους στις διάφορες κυτταρικές λειτουργίες. Είναι ευρύτατα γνωστός ο ρόλος τους κατά τη διάρκεια καταστάσεων καταπόνησης των φυτών όπου υπερπαραγονται, συσσωρεύονται και προκαλούν αλλοιώσεις στα κύτταρα (Gill and Tuteja, 2010). Η δημιουργία των ROS από το μεταβολισμό είναι αναπόφευκτη και οφείλεται στις ιδιότητες του οξυγόνου που έχει δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με τον ίδιο κβαντικό αριθμό σπιν με αποτέλεσμα να «προτιμά» να δέχεται τα ηλεκτρόνια όχι μαζί αλλά ένα κάθε φορά (Gill and Tuteja, 2010).

Στις ROS περιλαμβάνονται το H_2O_2 , το υπεροξειδικό ανιόν (O_2^-), η υδροξυλική ρίζα ($-OH$) και η υπεροξειδική ρίζα RO^* (Mitter et al., 2004). Οι χώροι παραγωγής ROS στα φυτικά κύτταρα εντοπίζονται στους χλωροπλάστες στα φωτοσυστήματα I και II και στα μιτοχόνδρια στο σύμπλεγμα I, το σύστημα CoQ_{10} (ουμπικινόνης) και το σύμπλεγμα III της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων καθώς και στα υπεροξειδωμάτια (del Rio et al., 2006; Navrot et al., 2007). Υπολογίζεται ότι 1-2% του οξυγόνου που αφομοιώνεται από τα φυτά, οδηγείται τελικά στην παραγωγή ROS (Bhattacharjee, 2002). Η πέραν ενός ορίου συγκεντρώσεις ROS είναι τοξικές προκαλώντας αλλοιώσεις στις πρωτεΐνες, στα λιπίδια, στους πολυσακχαρίτες και στο DNA των κυττάρων (Smirnoff and Willer, 2000; Gill and Tuteja, 2010) και εν τέλει οδηγούν στον κυτταρικό θάνατο (Asada and Takahashi, 1987).

Τα φυτά διαθέτουν ένα αρκετά ανεπτυγμένο μηχανισμό προστασίας από τις ROS που αποτελείται από ένζυμα και μη ενζυμικής φύσης παράγοντες. Στα ένζυμα που δρουν ως ασπίδα στις ROS συγκαταλέγονται, η υπεροξειδική δισμουτάση (SOD), η καταλάση (CAT), η υπεροξειδάση του ασκορβικού οξέως APX, η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης GR, η ρεδοκτάση του μονοδιύδροασκορβικού οξέος MDHAR, η ρεδοκτάση του διύδροασκορβικού οξέος DHAR, η υπεροξειδάση της γλουταθειόνης GPX, η υπεροξειδάση τύπου γουαϊακόλης GOPX, και η μεταφοράση της γλουταθειόνης GST. Ως μη ενζυμικής φύσης προστατευτικές ενώσεις χαρακτηρίζονται το ασκορβικό οξύ, η γλουταθειόνη, τα φαινολικά, τα

αλκαλοειδή, τα μη πρωτεϊνικά αμινοξέα και η α-τοκοφερόλη (Mittler et al., 2004; Foyer and Noctor, 2005).

Ο ρόλος των ROS έχει αναγνωριστεί σε διάφορες λειτουργίες των φυτών όπως η ρύθμιση της ανάπτυξης και του κυτταρικού κύκλου, του προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου, της μεταφοράς ορμονικών σημάτων και στη προστασία έναντι βιοτικών και αβιοτικών καταπονήσεων (Dat et al., 2000; Kovtun et al., 2000; Pei et al., 2000; Mullineaux and Karpinski, 2002; Mittler, 2002; Neill et al., 2002; Torres et al., 2002; Foreman et al., 2003; Jiang et al., 2003; Kwak et al., 2003; Tokunaga et al., 2005; Valenti et al., 2007).

Το γεγονός αυτό προσδίδει στις ROS διπλό χαρακτήρα, αφενός του τοξικού παράγοντα για τα κύτταρα, αφετέρου του ρυθμιστή διαφόρων αναπτυξιακών και μεταβολικών διεργασιών. Το σύστημα ενζύμων και των μη ενζυμικών παραγόντων που ελέγχουν τις ROS, έχει ως αποστολή τη ρύθμιση των συγκεντρώσεων ROS σε επίπεδα που ενώ επιτρέπουν τις βιοχημικές διεργασίες που εμπλέκονται να λαμβάνουν χώρα, δεν προκαλούν αλλοιώσεις στα κύτταρα. (Mittler et al., 2004). Παράδειγμα συμμετοχής των ROS στις φυσιολογικές διαδικασίες φαίνεται να είναι η χαλάρωση των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά την ωρίμανση των καρπών αλλά και στην ανάπτυξη του κολεόπτλου. Έχει δειχθεί ότι *in vitro* το OH^- επιδρά στην αποδόμηση των πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων (Fry, 1998; Cheng et al., 2008).

Η αντίδραση Mehler αναγνωρίζεται ως η σημαντικότερη πηγή ROS στους χλωροπλάστες (Asada, 1999). Σε αυτή τη διεργασία, το μοριακό οξυγόνο, ανάγεται με ενέργεια που προσφέρεται από το φώς μέσω του PSI σε ρίζα οξυγόνου O_2^- η οποία γρήγορα μετατρέπεται σε H_2O_2 είτε ενζυμικά μέσω της υπεροξειδικής δισμουτάσης (SOD) είτε μη ενζυμικά (Asada, 1999).

Είναι φανερό ότι η συγκέντρωση των ROS στα κύτταρα πρέπει να ρυθμίζεται με μεγάλη ακρίβεια και σταθερότητα. Στο *Arabidopsis thaliana*, ένα δίκτυο τουλάχιστο 152 γονιδίων εμπλέκεται στη ρύθμιση της συγκέντρωσης των ROS, κωδικοποιώντας πρωτεΐνες που είτε τα παράγουν είτε τα απενεργοποιούν. Αν και ορισμένα ένζυμα κλειδιά έχουν αποκαλυφθεί, πολλά μένουν να ερευνηθούν για τη λειτουργία αυτού του μηχανισμού και το ρυθμιστικό ρόλο που έχει στα φυτά (Mittler et al., 2004).

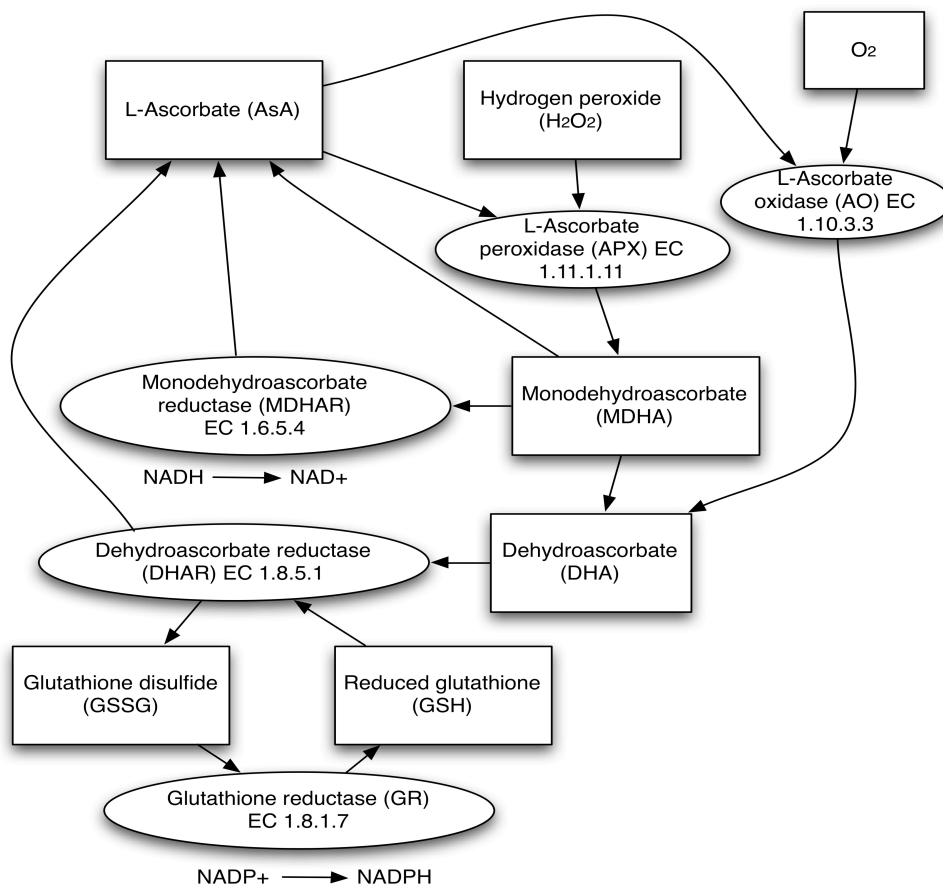
3.1.2 Ο μεταβολισμός του AsA

Τα φυτά έχουν αναπτύξει φυσιολογικούς μηχανισμούς άμυνας απέναντι στις εξαιρετικά δραστικές ενεργές μορφές οξυγόνου (Conklin et al., 1997, Noctor and Foyer 1998, Smirnoff, 2000). Είναι ευρέως αποδεκτό ότι το AsA είναι ένα από τα κύρια αντιοξειδωτικά που δρουν προστατευτικά κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης, της αναπνοής και κάτω από βιοτικές και αβιοτικές καταστάσεις καταπόνησης (Gill and Tuteja, 2010). Ο μεταβολικός κύκλος του AsA στα φυτά αποτελεί έναν πολυεπίπεδο μηχανισμό που αφενός έχει ως σκοπό την εξουδετέρωση του H₂O₂ αφετέρου δε τη διατήρηση των επιπέδων ανηγμένου (φυσιολογικά δραστικού) AsA στα κύτταρα με τη δαπάνη ενέργειας (Smirnoff, 2011).

Οι ενζυμικές αντιδράσεις του μεταβολισμού του AsA έχουν ως εξής (Σχ 5). Το AsA οξειδώνεται ανάγοντας το H₂O₂ σε νερό μέσω της υπεροξειδάσης του AsA (APX, EC 1.11.1.11). Από την παραπάνω αντίδραση παράγεται μία ένωση με περιορισμένη σταθερότητα, το μονοδύδροασκορβικό (MDHA) το οποίο είτε μετατρέπεται πάλι σε ασκορβικό οξύ από τη ρεδοκτάση του MDHA (MDHAR, EC 1.6.5.4) είτε μετατρέπεται μη ενζυμικά σε δεϋδροασκορβικό (DHA). Η ημιζωή του MDHA στους 37°C είναι περίπου 6 λεπτά αν και επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως η συγκέντρωσή του, το pH, η θερμοκρασία και το φως (Davey et al., 2000; Smirnoff, 2011). Το DHA υδρολύεται σε 2,3-δικετογκουλονικό οξύ ή ανακυκλώνεται σε ασκορβικό οξύ από τη ρεδοκτάση του δευδροασκορβικού (DHAR EC 1.8.5.1), η οποία χρησιμοποιεί τη γλουταθειόνη ως αναγωγικό μέσο (Asada, 1999; Zoo et al., 2006; Zhang et al., 2010). Παράλληλα, το AsA είναι δυνατόν να μετατραπεί σε DHA μέσω της αποπλαστικής οξειδάσης του AsA (EC 1.10.3.3) η οποία χρησιμοποιεί μοριακό οξυγόνο για την απευθείας οξείδωση του AsA. Η δραστικότητα του ενζύμου έχει μεγάλη επίδραση στα επίπεδα του AsA στον αποπλάστη αλλά μικρή στα επίπεδα του αντιοξειδωτικού εντός του κυττάρου (Pignocchi et al., 2003). Η λειτουργία της οξειδάσης του AsA (AO) ενός ενζύμου που εμπλέκεται στον καταβολισμό του ASA, δεν φαίνεται ότι σχετίζεται με την άμυνα απέναντι στις ROS, αλλά με την παραγωγή σημάτων και σε αναπτυξιακές διεργασίες (Pignocchi et al., 2006; Fotopoulos et al., 2006).

Τα παραπάνω ένζυμα φαίνεται πως δρουν ως σύστημα που ρυθμίζει την οξειδαναγωγική ικανότητα των φυτών. Έχει αναφερθεί στον καπνό ότι υπερέκφραση της AO, οδηγεί σε σημαντική μείωση της δραστικότητας της APX σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης (Pignocchi et

al., 2006). Μείωση της δραστικότητας της DHAR, οδηγεί σε αύξηση του H₂O₂, στα συνοδά κύτταρα του ηθμού των φύλλων του καπνού (Chen and Gallie, 2004).

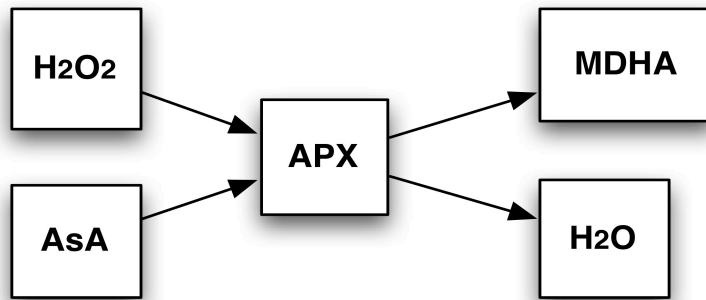


Σχήμα 5: Ο μεταβολισμός του AsA. Η υπεροξειδάση του AsA (APX EC 1.11.1.11) καταλύει την εξουδετέρωση του H₂O₂ με ταυτόχρονη οξείδωση του AsA προς μονοδεϋδροασκορβικό οξύ (MDHA). Το MDHA είτε αντιδρά αυθόρμητα δίνοντας AsA και δεϋδροασκορβικό οξύ (DHA) είτε ανάγεται ενζυμικά προς AsA από τη ρεδοκτάση του MDHA (MDHAR EC 1.6.5.4), χρησιμοποιώντας το NADH (ή σπανιότερα NADPH) ως αναγωγικό μέσο. Το DHA είναι υπόστρωμα της ρεδοκτάσης του DHA (DHAR EC 1.8.5.1) που ανάγει το DHA σε AsA, χρησιμοποιώντας τη γλουταθειόνη ως αναγωγικό μέσο. Το δισουλφίδιο της γλουταθειόνης (GSSG) (οξειδωμένη μορφή της γλουταθειόνης) παράγεται από τη δραστικότητα της DHAR. Το GSSG ανάγεται σε γλουταθειόνη (GSH) από τη ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR EC 1.8.1.7) καταναλώνοντας NADP⁺. Η οξείδωση του AsA (EC 1.10.3.3) οξειδώνει το AsA απευθείας προς DHA χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο (Smirnoff, 2011; Badejo *et al.*, 2012).

3.2 Τα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό του AsA

3.2.1 Η υπεροξειδάση του ασκορβικού (APX, EC 1.11.1.11)

Η υπεροξειδάση του ασκορβικού καταλύει την αντίδραση



Η APX κατέχει έναν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση των επιπέδων των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) απενεργοποιώντας μια σημαντική τους μορφή, το υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂. Για την αντίδραση αυτή το ένζυμο χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων το AsA μετατρέποντας το σε μόνοδεϋδροασκορβικό οξύ με τη μεταφορά τεσσάρων ηλεκτρονίων από το AsA στο οξυγόνο (Ishikawa and Shigeoka, 2008; Mittler and Poulos, 2005). Η παρουσία AsA είναι απαραίτητη για τη δραστηριότητα του ενζύμου καθώς αυτή φαίνεται να χάνεται γρήγορα όταν η συγκέντρωση του AsA είναι μικρότερη των 20μM (Yoshimura *et al.*, 2000).

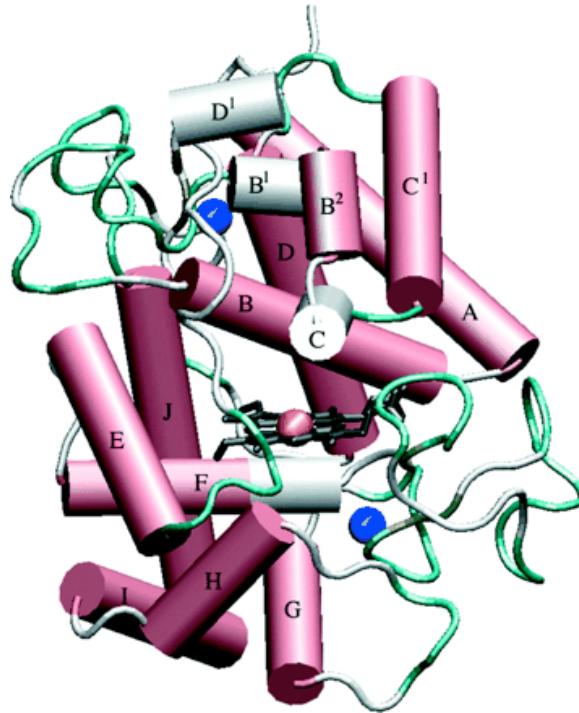
Σχετικά πρόσφατα ευρήματα αναφέρουν ότι, τουλάχιστο στη περίπτωση της καταπόνησης από υψηλή ακτινοβολία, η APX εκτός από την απευθείας ρύθμιση των επιπέδων H₂O₂ ρυθμίζει την έκφραση και άλλων γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα απέναντι στο H₂O₂ (Maruta *et al.*, 2010). Δεδομένου του ρόλου της APX απέναντι στις ενεργές μορφές οξυγόνου, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι το ένζυμο επηρεάζει άμεσα την οξειδοαναγωγική κατάσταση των κυττάρων (Ishikawa and Shigeoka, 2008; Maruta *et al.*, 2010; Foyer and Noctor, 2011).

Τα ισoenζυμα της APX που έχουν χαρακτηριστεί στη τομάτα εκτός από το κυτόπλασμα εντοπίζονται και στα οργανίδια. Ο εντοπισμός του ενζύμου παραπέμπει στο συμπληρωματικό ρόλο του ενζύμου σε σχέση με την υπεροξειδάση της γουαϊακόλης (Asada, 1992). Αναφέρεται ότι από τα επτά ισoenζυμα της APX στη τομάτα, τα πέντε εντοπίζονται στο κυτόπλασμα (cAPX) και δύο στα πλαστίδια (ένα στο στρώμα (sAPX) και ένα στις θυλακοειδείς μεμβράνες {tAPX})

(Najami et al., 2008; Aoki et al., 2010). Επίσης έχει βρεθεί δραστικότητα του ενζύμου και στα μιτοχόνδρια (Mittova et al., 2002; Shigeoka et al., 2002; Najami et al., 2008). Τα ισοένζυμα της APX έχουν μεγάλο βαθμό ομολογίας. Μεταξύ των κυτοπλασματικών ισομορφών υπάρχει 70-90% ομολογία, ενώ μεταξύ των κυτοπλασματικών και πλαστιδιακών APX η ομολογία κυμαίνεται στο 50-70%. Με εξαίρεση το ισοένζυμο που εντοπίζεται στις θυλακοειδείς μεμβράνες των πλαστιδίων το οποίο διαθέτει C-τελικό άκρο με το οποίο προσδέεται στη μεμβράνη, τα υπόλοιπα ισοένζυμα της APX είναι διαλυτά (Shigeoka et al., 2002; Mittler and Poulos, 2005; Ishikawa and Shigeoka, 2008). Η σπουδαιότητα του ενζύμου υπογραμμίζεται από τις υψηλές συγκεντρώσεις του ενζύμου και του υποστρώματος του, από το μεγάλο αριθμό ισοτύπων του καθώς και από τον υψηλό βαθμό εξειδίκευσης του ενζύμου στα οργανίδια των φυτικών κυττάρων (Lazzarotto et al., 2011; Shigeoka et al., 2002).

Όλοι οι ισότυποι της APX φαίνεται ότι χάνουν γρήγορα τη δραστικότητά τους και τη σταθερότητά τους σε συγκεντρώσεις AsA χαμηλότερες των 20μM. Το γεγονός της εξάρτησης σε τέτοιο βαθμό από το υπόστρωμα διαφοροποιεί το ένζυμο από άλλες υπεροξειδάσες (Yoshimura et al., 1998; Shigeoka et al., 2002). Αναφέρεται ακόμα ότι πιθανότατα η ρύθμιση των κυτοπλασματικών ισοενζύμων της APX γίνεται μετα-μεταγραφικά (Pang and Wang, 2010).

Αρκετά πειράματα που αφορούν σίγηση του γονιδίου, καταλήγουν ότι η μειωμένη έκφραση των γονιδίων της APX αυξάνει τα επίπεδα των ROS και τα φυτά που έχουν υποστεί τέτοιου είδους επέμβαση παρουσιάζουν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης και μειωμένη αντοχή στις καταπονήσεις. Τα φυτά που προέκυψαν μετά από την απενεργοποίηση της κυτοπλασματικής APX είχαν μικρότερη αντοχή στην οξειδωτική καταπόνηση στον καπνό (Rizhsky et al., 2002). Επίσης, οι Kangasjärvi et al., (2008) αναφέρουν ότι στο στάδιο του πρασινίσματος των φύλλων η sAPX είναι η πιο σημαντική για την προστασία από η φωτοοξειδωτική καταπόνηση.



Σχήμα 6: Σχηματική παράσταση της δομής του ενζύμου της APX από φυτά καπνού. Οι ερυθροί και λευκοί κύλινδροι αντιπροσωπεύουν τις α - και 3_{10} έλικες αντίστοιχα, το άτομο σιδήρου εμφανίζεται ως ερυθρή σφαίρα και τα άτομα νατρίου ως μπλε σφαίρες Wada et al., 2003

3.2.2 Η έκφραση των γονιδίων και η δραστηριότητα της APX

Η έκφραση του ισότυπου της APX που εντοπίζεται στις θυλακοειδείς μεμβράνες των πλαστιδίων έχει μελετηθεί με ημιποσοτικό PCR σε καρπούς τομάτας. Τα μεταγραφήματα ανιχνεύτηκαν αρχικά μια εβδομάδα μετά την άνθηση και η έκφραση παρέμεινε σταθερή μέχρι το στάδιο της αλλαγής του χρώματος όπου παρατηρήθηκε μείωση (Ioannidi et al., 2008).

Στη φράουλα, οι Yan-Xia et al., (2009), επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα των Kim and Chung, (1997) αναφέρουν ότι η συνολική έκφραση των ισοτύπων της APX κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των ταξικαρπιών, αυξανόταν με την πρόοδο της ωρίμανσης τους.

Η έκφραση των γονιδίων της APX έχει μελετηθεί και υπό συνθήκες καταπόνησης. Στο ρύζι και την τομάτα υπό συνθήκες αλατότητας, τα μεταγραφήματα ορισμένων ισοτύπων της APX αυξήθηκαν. Μεγαλύτερη ήταν η αύξηση των μεταγραφημάτων των πλαστιδιακών ισοτύπων των APX, αλλά όχι των υπολοίπων ισοτύπων της APX πράγμα που υπογραμμίζει την πολυπλοκότητα του συγκεκριμένου αντιοξειδωτικού συστήματος (Yamane et al., 2010; Manaa, 2011). Φυτάρια ρυζιού υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας, παρουσίασαν αύξηση του πλήθους

των μεταγραφημάτων των κυτοπλασματικών APX και μείωση των πλαστιδιακών (Kim et al., 2007). Στο σπανάκι όμως, σε συνθήκες υψηλής αλατότητας, η έκφραση των γονιδίων της APX παρέμενε σχετικά σταθερή (Yoshimura et al., 2000). Επίσης, οι χαμηλές θερμοκρασίες δεν είχαν σημαντική επίδραση στην έκφραση των γονιδίων της APX στην κολοκυθιά, ενώ αντίθετα η δραστικότητα του ενζύμου αυξήθηκε σημαντικά σε σχέση με το μάρτυρα (Zheng et al., 2008). Τέλος, υπό συνθήκες υψηλής έντασης φωτισμού, το πλήθος των μεταγραφημάτων της κυτοπλασματικής APX αυξήθηκε σημαντικά και στο *Arabidopsis thaliana* (Karpinski et al., 1997).

Δραστικότητα της APX μετρήθηκε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των σπερμάτων στο μπιζέλι σε τέσσερα φυσιολογικά στάδια ανάπτυξης, παρουσιάζοντας αύξηση στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των σπερμάτων και μείωση στα επόμενα (Murtaza et al., 2010).

Στη τομάτα, η δραστικότητα του ενζύμου σε συνθήκες καταπόνησης από υψηλή αλατότητα, αυξάνεται σημαντικά (Mittova et al., 2002). Σε ορισμένα άλλα φυτικά είδη, όπως στη σόγια (Vaidyanathan et al., 2003), στο σιτάρι (Sairam et al., 2005), στο βαμβάκι (Desingh and Kanagaraj, 2007) κ.α. παρουσιάζεται αύξηση της δραστικότητας υπό τις συνθήκες αυτές. Οι Aghaei et al., (2009) αναφέρουν ότι η ενδεχόμενη μείωση της δραστικότητας της APX σε συνθήκες καταπόνησης αλατότητας, πιθανά συνδέεται με μειωμένη αντοχή στην καταπόνηση αυτή. Παρόμοια ευρήματα αναφέρονται και σε περιπτώσεις υδατικής καταπόνησης του σίτου και της τομάτας αντίστοιχα (Selote and Khanna-Chopra, 2010; Ünaygar et al., 2005), όπου βρέθηκε μειωμένη δραστικότητα του ενζύμου στις ευαίσθητες ποικιλίες και αυξημένη στις ανθεκτικές.

Υψηλές συγκεντρώσεις καδμίου προκάλεσαν σημαντική μείωση της δραστικότητας του ενζύμου στον ηλίανθο κατά τις πρώτες 24 ώρες η οποία ακολουθήθηκε από σημαντική αύξηση μετά από άλλες 24 ώρες. Στις 96 ώρες από την επέμβαση, η δραστικότητα της APX μειώθηκε ξανά (Hatata and Abdel-Aal, 2008).

Αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου αναφέρεται και μετά από επίδραση υψηλής εντάσεως ακτινοβολίας σε φύλλα κριθαριού (Kozel and Shalygo, 2009). Επίσης, υψηλή συγκέντρωση όζοντος προκάλεσε αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου σε φυτάρια ρυζιού στις ευαίσθητες ποικιλίες ενώ μείωση στις ανθεκτικές (Lin et al., 2001).

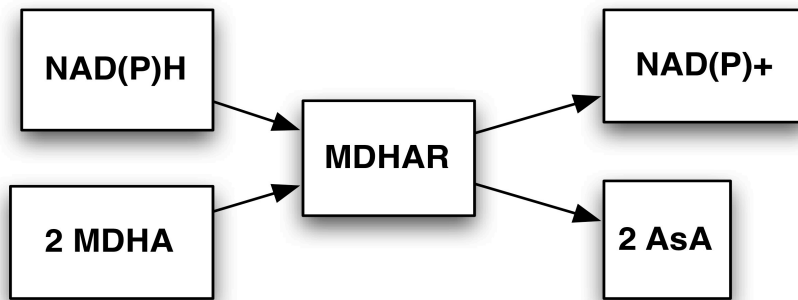
Συνεργιστική δράση της APX, της SOD και της καταλάσης αναφέρεται από τους Ahmad *et al.*, 2010 σε απομονωμένους χλωροπλάστες πατάτας από φυτά που υπερέκφραζαν τα παραπάνω γονίδια. Η υπερ-έκφραση τους οδήγησε σε αυξημένη αντοχή σε αλατότητα καθώς και υπό συνθήκες υδατικής καταπόνησης.

Η μελέτη του ρόλου του ενζύμου στη φυσιολογία των φυτών έχει μελετηθεί και μέσω της σίγησης των ισοτύπων του. Σίγηση με RNAi της έκφρασης του γονιδίου της μιτοχονδριακής APX, οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του AsA στους καρπούς της τομάτας (Zhang *et al.*, 2011). Ακόμη, η σίγηση του γονιδίου της κυτοπλασματικής APX που φαίνεται να υπάρχει σε μεγαλύτερη σχετική αφθονία από τους υπόλοιπους ισότυπους, οδηγεί όντως σε αύξηση των ROS στο *Arabidopsis thaliana*. Επί πλέον οι καταστάσεις καταπόνησης (αυξημένη θερμοκρασία και ξηρασία) αυξάνουν τα μεταγραφήματα της κυτοπλασματικής APX (Koussevitzky *et al.*, 2008).

Από τους δύο ισοτύπους της APX που εντοπίζονται στους χλωροπλάστες, την sAPX (στο στρώμα) και την tAPX (στα θυλακοειδή) η tAPX φαίνεται, σε πείραμα σίγησης των δύο γονιδίων χωριστά, ότι προστατεύει περισσότερο από τη φωτοοξειδωτική καταπόνηση και την αύξηση της συγκέντρωσης H₂O₂ (Murata *et al.*, 2010). Όμως αυτό ενδεχομένως εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξης των φυτών, αφού οι Kangasjärvi *et al.*, (2008) αναφέρουν ότι στο στάδιο του πρασινίσματος των φύλλων η sAPX είναι η πιο σημαντική για την προστασία από η φωτοοξειδωτική καταπόνηση.

Εν κατακλείδι, συνάγεται ότι δραστηριότητα και το πλήθος των μεταγραφημάτων της APX κάθε φυτικού είδους ή ποικιλίας απέναντι στον κάθε παράγοντα καταπόνησης, εξαρτάται εκτός των άλλων και από την ανθεκτικότητα του συγκεκριμένου φυτικού είδους ή ποικιλίας στον παράγοντα αυτό (Pang and Wang, 2010).

3.2.3 Ρεδουκτάση του μόνοδεϋδρο ασκορβικού (MDHAR) EC 1.6.5.4



Η MDHAR αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα στον κύκλο του AsA/γλουταθειόνης αναγεννώντας τα αποθέματα του ελεύθερου AsA. Ο ρόλος του αυτός την κατατάσσει ως ένα από τα σημαντικά ένζυμα της αντιοξειδωτικής άμυνας των φυτών (Eltelib et al., 2012). Το ένζυμο ανάγει την ατελώς οξειδωμένη μορφή του AsA (MDHA) που παράγεται από τη δράση της APX. Επειδή το MDHA είναι εξαιρετικά ασταθές μόριο ανιχνεύεται κυρίως στους χλωροπλάστες με χρήση φασματοσκοπίας EPR, η συγκέντρωσή του όμως αυξάνεται κάτω από συνθήκες καταπόνησης (Smirnoff, 2012).

α) Χαρακτηριστικά και ιδιότητες του ενζύμου.

Το ένζυμο χρησιμοποιεί ως δότη ηλεκτρονίων το NADH ή το NADPH (παρόλο η δραστηριότητά του είναι υψηλότερη όταν χρησιμοποιεί ως υπόστρωμα το NADH), ενώ πιθανολογείται ότι χρησιμοποιεί το FAD ως συμπαραγοντα. (Dalton et al., 1992; Murthy et al., 1994; de Leonaridis et al., 1995). Στην τομάτα έχουν χαρακτηριστεί ένας κυτοπλασματικός (MDHAR1) και ένας πλαστιδιακός (MDHAR2) (Ioannidi et al., 2009) ισότυπος του ενζύμου. Ο κυτοπλασματικός ισότυπος έχει χαρακτηριστεί στο αγγούρι (Hossain and Asada, 1985), στη σόγια (Dalton et al., 1992) και στη πατάτα (Borraccino et al., 1986) ενώ ο πλαστιδιακός στο σπανάκι (Sano et al., 2005). Δραστηριότητα της MDHAR έχει εντοπιστεί εκτός από το κυτόπλασμα και τα πλαστίδια, στα υπεροξυσώματα και στα μιτοχόνδρια (Jimenez et al., 1997, Leterrier et al., 2005). Το ένζυμο είναι πιθανότατα μονομερές και εκτός από το ενεργό κέντρο διαθέτει θέσεις δέσμευσης με το NAD(P)H και το FAD (Jimenez et al., 1997; Leterrier et al., 2005; Li et al., 2010). Για τη διατήρηση της δομής και της καταλυτικής δράσης του ενζύμου σημαντικό ρόλο

φαίνεται να παίζει το κατάλοιπο κυστεΐνης στη θέση 117 όπως έχει φανεί από μελέτες αντικατάστασης της με σερίνη και αλανίνη (Li et al., 2010).

β) Έκφραση του γονιδίου και δραστικότητα του ενζύμου.

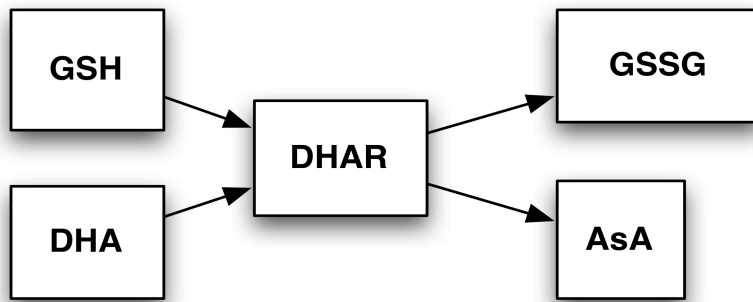
Σε μελέτες καρπών τομάτας, οι δύο ισότυποι της MDHAR επέδειξαν διαφορετική συμπεριφορά έκφρασης. Η *MDHAR1* εκφράστηκε μόνο κατά την ανάπτυξη του καρπού, ενώ η *MDHAR2* είχε μικρή αλλά συνεχή έκφραση σε όλα τα στάδια μέχρι την πλήρη ωρίμανση του καρπού (Ioannidi et al., 2009). Η έκφραση των γονιδίων της MDHAR αυξάνεται σε συνθήκες υψηλού φωτισμού και αυτό πιθανά οφείλεται στην ύπαρξη προωθητή που εξαρτάται από το φως (Leterrier et al., 2005; Ioannidi et al., 2009).

Σημαντικό πεδίο της έρευνας του ενζύμου είναι η μελέτη της έκφρασης του σε καταστάσεις καταπόνησης καθώς και η μελέτη των συνεπειών στα φυτά μετά από επεμβάσεις στην έκφραση γονιδίου κάτω από αυτές τις συνθήκες (Etelib et al., 2012). Καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών φύλλων μπιζελιού προώθησε την έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων της MDHAR. (Leterrier et al., 2005).

Η δραστικότητα του ενζύμου αυξάνεται υπό συνθήκες καταπόνησης. Στη τομάτα αναφέρεται αύξηση της δραστικότητας υπό συνθήκες υψηλής αλατότητας (Gautier et al., 2010), χαμηλών θερμοκρασιών, και τραυματισμού (Grantz et al., 1995; Stevens et al., 2008). Στη *Malpighia puniceifolia* υπό συνθήκες είτε χαμηλών θερμοκρασιών είτε υψηλής αλατότητας, αναφέρεται επίσης σημαντική αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου (Etelib et al., 2012) όπως και στο μπιζέλι, σε υψηλή ένταση φωτισμού (Leterrier et al., 2005). Αντίθετα, στο *Arabidopsis* καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών και αλατότητας δεν αύξησε σημαντικά τη δραστικότητα του ενζύμου (Kubo et al., 1999).

Υπερέκφραση τόσο της πλαστιδιακής (Kavitha et al., 2010) όσο και της κυτοπλασματικής MDHAR (Eltagheb et al., 2007), έδειξαν αύξηση της αναλογίας του ανηγμένου AsA καθώς και αυξημένη αντοχή σε καταστάσεις καταπόνησης όπως αλατότητα και ψύχος (Smirnoff, 2012)

3.2.4 Ρεδοκτάση του δεϋδρο ασκορβικού (DHAR) EC 1.8.5.1



Το ένζυμο κατατάσσεται στην υπέρ-οικογένεια των τρανσφερασών της γλουταθειόνης και καταλύει την αναγωγή του DHA σε AsA χρησιμοποιώντας τη γλουταθειόνη ως αναγωγικό μέσο προλαμβάνοντας τη μη αντιστρεπτή υδρόλυση του DHA σε 2,3 δικετογουλονικό οξύ (Dixon et al., 2002; Qin et al., 2011). Το ένζυμο δρα επικουρικά της αυθόρμητης αναγωγής του DHA από τη γλουταθειόνη η οποία λαμβάνει χώρα υπό ευνοϊκές συνθήκες στο κυτόπλασμα και στο στρώμα των χλωροπλαστών (Dixon et al., 2002). Το ένζυμο απαντά εκτός από τα φυτά, στα ζώα και στον άνθρωπο (Ushimaru et al., 2006).

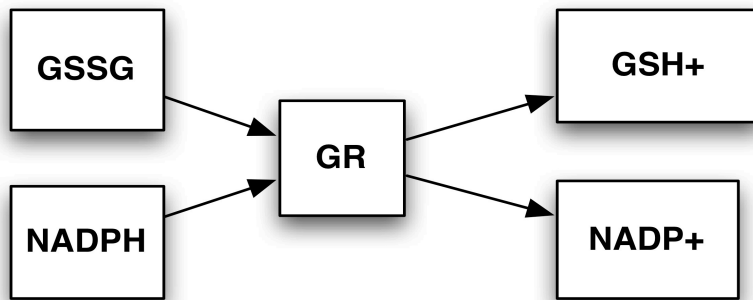
Από μελέτες υπέρ-έκφρασης, το ένζυμο έχει συνδεθεί με την άμυνα απέναντι σε διάφορες αβιοτικές καταπονήσεις όπως αλατότητα (Ushimaru et al., 2006), ξηρασία (Eltayeb et al., 2006), όζον (Chen and Gallie, 2005) και βαρέα μέταλλα (Yin et al., 2010). Είναι ενδιαφέρον ότι στην πλειοψηφία των περιπτώσεων τα πειράματα υπερέκφρασης της DHAR δεν αναφέρουν μειωμένα επίπεδα DHA. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η DHAR πιθανά προστατεύει το DHA από την αποδόμηση αυξάνοντας τα επίπεδα του ολικού AsA (Smirnoff, 2012).

Στη τομάτα η υπερέκφραση της DHAR, αύξησε τα επίπεδα AsA στους καρπούς αλλά όχι στα φύλλα (Haroldsen et al., 2011). Επίσης, πειράματα παρεμπόδισης της έκφρασης των γονιδίων της DHAR έδειξαν μείωση των επιπέδων ολικού AsA στο *Arabidopsis* (Yoshida et al., 2006).

Λεπτομερείς μελέτες παρεμπόδισης της έκφρασης των γονιδίων της DHAR έδειξαν ότι η μειωμένη δραστηριότητα του ενζύμου οδηγεί σε μειωμένο ρυθμό ανάπτυξης, μειωμένη φωτοσύνθεση, αύξηση των επιπέδων H₂O₂, επίδραση στο άνοιγμα των στοματίων, στην

αντίδραση στο ABA και στην ικανότητα των φυτών για μη φωτοχημική απόσβεση (Chen and Gallie, 2004, 2005, 2006, 2008).

3.2.5 Ρεδοκτάση της γλουταθειόνης (GR EC 1.8.1.7)

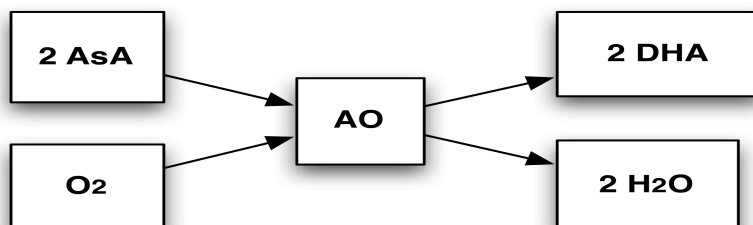


Ο έλεγχος της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων είναι ιδιαίτερος σημαντικός για την προστασία από οξειδωτική ζημιά και για την ομαλή λειτουργία του μεταβολισμού. Σε πολλούς οργανισμούς όπως στα ανώτερα φυτά αλλά και στα ζώα και στον άνθρωπο ένας από τους τρόπος έλεγχου της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των κυττάρων πραγματοποιείται μέσω του ελέγχου του βαθμού οξείδωσης της γλουταθειόνης (GSH) (Grant *et al.*, 1996). Κάτω από φυσιολογικές συνθήκες η αναλογία GSH/GSSG στα κύτταρα κυμαίνεται πάνω από 0,9 ενώ η συγκέντρωση της GSH στρώμα των χλωροπλαστών (όπου παρατηρείται η μέγιστη συγκέντρωση) είναι κοντά στα 5mM. Τα παραπάνω δεδομένα υποδηλώνουν ότι η γλουταθειόνη είναι ιδιαίτερος σημαντική για τη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης αποτρέποντας την αδρανοποίηση των ενζύμων προστατεύοντας τις πρωτεϊνικές θειολικές ομάδες. Επίσης αναφέρεται ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση της GSH λειτουργεί ως μήνυμα για την ενεργοποίηση μηχανισμών άμυνας απέναντι στις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου (Noctor *et al.*, 1998; Foyer and Noctor, 2011). Η ρεδοκτάση της γλουταθειόνης καταναλώνοντας ενέργεια υπό τη μορφή NADPH, συμμετέχει στο μηχανισμό ρύθμισης της οξειδοαναγωγικής κατάστασης της GSH ανάγοντας ενζυμικά το GSSG σε GSH (Chen *et al.*, 2003; Marty *et al.*, 2009). Επιπρόσθετα η GR αναγνωρίζεται ότι συμμετέχει στον κύκλο του μεταβολισμού του AsA (κύκλο Foyer-Halliwel-Asada) αφού η GSH είναι απαραίτητη για την ανακύκλωση του DHA από τη DHAR προσφέροντας το αναγκαίο αναγωγικό δυναμικό (Foyer and Noctor, 2011). Αναφέρεται ότι στο γονιδίωμα του *Arabidopsis* υπάρχουν δύο χαρακτηρισμένα ισοένζυμα της

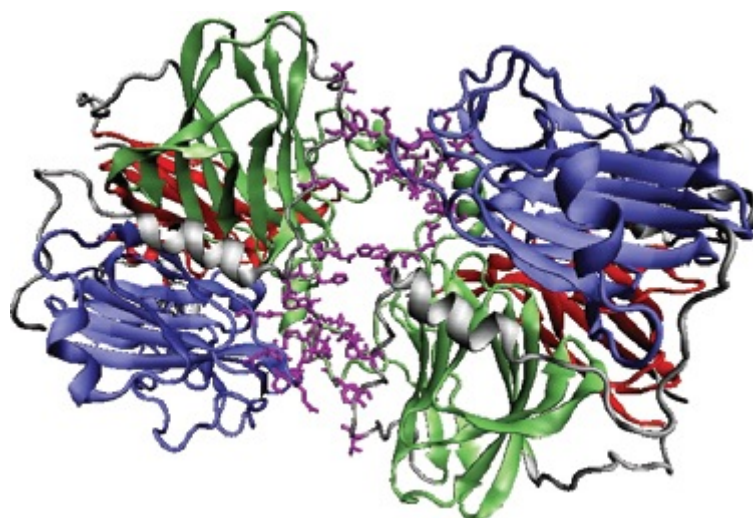
GR, η μία εντοπίζεται στο κυτόπλασμα, ενώ η άλλη εντοπίζεται στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια (Marty *et al.*, 2009).

Παράγοντες καταπόνησης όπως η υπερβολική συγκέντρωση καδμίου και αυξημένη αλατότητα αύξησαν τη δραστικότητα της GR (Paradiso *et al.*, 2008; Hong *et al.*, 2009). Επιπρόσθετα ανάλυση της έκφρασης των γονιδίων της κυτοπλασματικής GR με μικροσυστοιχίες έδειξε ότι η έκφραση της GR αυξάνεται κάτω από διάφορους παράγοντες καταπόνησης (Zimmermann *et al.*, 2004).

3.2.6 Η οξειδάση του AsA (AO, EC 1.10.3.3)



Η AO είναι διμερές ένζυμο μοριακής μάζας περίπου 140 kD και με πολλές ενεργές περιοχές (di Venere *et al.*, 2011). Οι υπομονάδες του ενζύμου αποσπώνται σε έντονα αλκαλικό περιβάλλον (Avigliano *et al.*, 1983; di Venere *et al.*, 2011).



Σχήμα 7: Τρισδιάστατη απεικόνιση υπομονάδας του ενζύμου της AO. Χρωματίζονται διαφορετικά οι τρεις ενεργές περιοχές (di Venere *et al.*, 2011).

Κάθε υπομονάδα της ΑΟ περιέχει τρεις διαφορετικές περιοχές και σε κάθε μία από αυτές δεσμεύονται τέσσερα άτομα χαλκού σχηματίζοντας μια δομή που καλείται «τριπύρρηνο κέντρο» (Messerschmidt et al., 1989, 1992, Caruto et al., 2010; di Venere et al., 2011). Το ένζυμο καταλύει την οξειδωση του AsA σε δέϋδροασκορβικό (DHA)(Deutsch, 2000). Η αντίδραση αυτή επίσης μετατρέπει το μοριακό οξυγόνο σε νερό (de Tullio et al., 2007).

Στα φυτά το ένζυμο έχει εντοπιστεί στα κυτταρικά τοιχώματα και στο χυμοτόπιο (Chichiricco et al., 1989; Liso et al., 2004; Zhang, 2010). Το ένζυμο φαίνεται ότι χάνει μεγάλο μέρος της δραστηριότητας του αν η θερμοκρασία είναι υψηλότερη των 55°C (Munyaka et al., 2010). Υπάρχουν αναφορές που υποδεικνύουν τον κρίσιμο ρόλο της αποπλαστικής οξειδοαναγωγικής κατάστασης σε σχέση με την απόκριση σε περιβαλλοντικά ερεθίσματα. Στον καπνό αναφέρεται ότι η οξειδοαναγωγική κατάσταση στον αποπλάστη ρυθμίζεται κυρίως από το ασκορβικό οξύ ενώ η ΑΟ είναι το ένζυμο που κυρίως δρα στο χώρο αυτό. Επειδή στον αποπλαστικό χώρο δεν υπάρχει NAD(P)H ή γλουταθειόνη η δράση του ενζύμου αυτού είναι καθοριστική στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του χώρου αυτού (Pignocchi et al., 2003; Foyer and Noctor, 2005). Η ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης του αποπλαστικού χώρου επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες όπως εξωγενή ορμονικά σήματα και φως (Pignocchi et al., 2003).

α) Δραστηριότητα του ενζύμου και έκφραση του γονιδίου της ΑΟ.

Η δραστηριότητα του ενζύμου καθώς και η έκφραση του γονιδίου έχουν συσχετιστεί με την αύξηση των κυττάρων (Kato and Esaka, 2000). Το πλήθος των μεταγραφημάτων αυξάνεται με εφαρμογή προωθητών ανάπτυξης (πχ αυξίνες και ιασμονικό οξύ), ενώ μειώνεται με αναστολείς της ανάπτυξης (πχ σαλικυλικό οξύ) (Sanmartin, 2002; Pignocchi et al., 2003). Επιπρόσθετα, αναφέρεται ότι η ΑΟ καταλύει και την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση της αυξίνης (Kerk and Feldman, 2000). Τα παραπάνω ευρήματα υποδεικνύουν την πιθανή συμμετοχή του ενζύμου στο χαλάρωμα των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά την αύξηση των κυττάρων (Fotopoulos et al., 2006).

Υπερέκφραση του γονιδίου της ΑΟ στο αγγούρι, έδειξε μειωμένη ανθεκτικότητα στην αυξημένη συγκέντρωση όζοντος (Sanmartin et al., 2003). Παρόμοια ευρήματα αναφορικά με τη σχέση της δραστηριότητας της ΑΟ και την ανθεκτικότητα σε καταστάσεις καταπόνησης έχουν

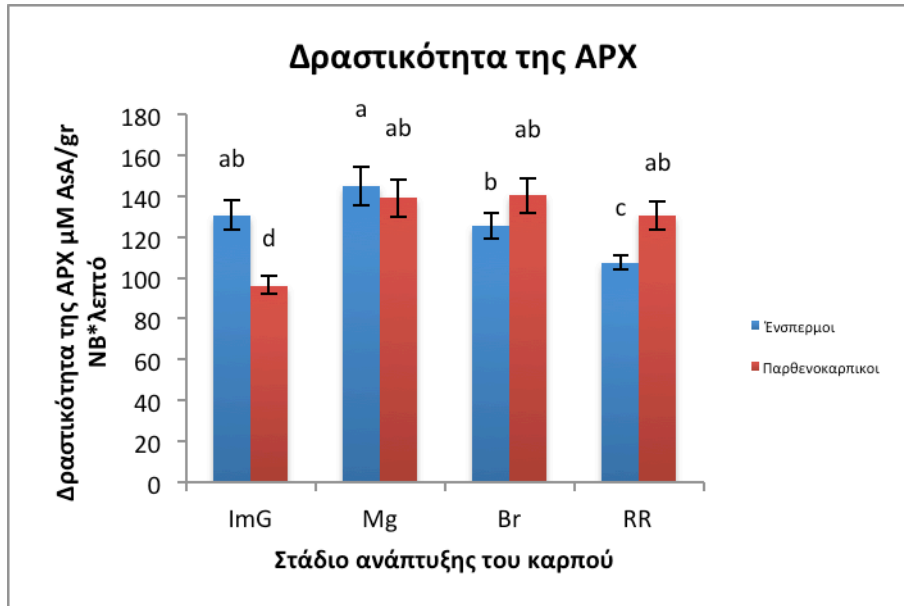
αναφερθεί και από άλλους ερευνητές (Conklin et al., 1999; Fotopoulos et al., 2008). Η υπερέκφραση της ΑΟ έδειξε ότι συμβαδίζει με την ενεργοποίηση άλλων γονιδίων που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών το κλείσιμο των στοματίων και την παραγωγή σημάτων στα φυτά καπνού (Pignocchi et al., 2006, Fotopoulos et al., 2008). Επίσης η υπερέκφραση του γονιδίου της ΑΟ στον καπνό, οδήγησε στην εξάντληση (οξειδωση) ολόκληρου του αποθέματος AsA περιοχή των κυτταρικών τοιχωμάτων (Sanmartin et al., 2003). Έκφραση μιας αντινοσηματικής ΑΟ, οδήγησε στην αύξηση της συγκέντρωσης του αποπλαστικού AsA στον καπνό (Pignocchi et al., 2003).

Η ΑΟ έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται (μαζί με το αποπλαστικό AsA) στο μηχανισμό της μεταφοράς ορμονικών σημάτων μεταβάλλοντας την ευαισθησία των ιστών στα σήματα αυτά. Επίσης εφαρμογή εξωγενούς αυξίνης οδήγησε στην αύξηση των μεταγραφημάτων της ΑΟ. (Pignocchi et al., 2003, 2006). Φύλλα τομάτας στα οποία είχε κατασταλεί η έκφραση της ΑΟ, είχαν διαφορετική μορφολογία από το μάρτυρα, πράγμα που πιθανά ενισχύει την παραπάνω υπόθεση (Zhang et al., 2010). Επίσης, τα ίδια φυτά είχαν αυξημένη συγκέντρωση του AsA και παρουσίασαν αυξημένη φωτοσυνθετική ικανότητα σε καταστάσεις καταπόνησης από έλλειψη νερού (Zhang et al., 2010). Σύμφωνα με τους (Esaka et al., 1992) η δραστηριότητα του ενζύμου βαίνει μειούμενη κατά την ωρίμανση των καρπών στην κολοκυθιά.

3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Δραστικότητα της APX και της DHAR στους αναπτυσσόμενους καρπούς.

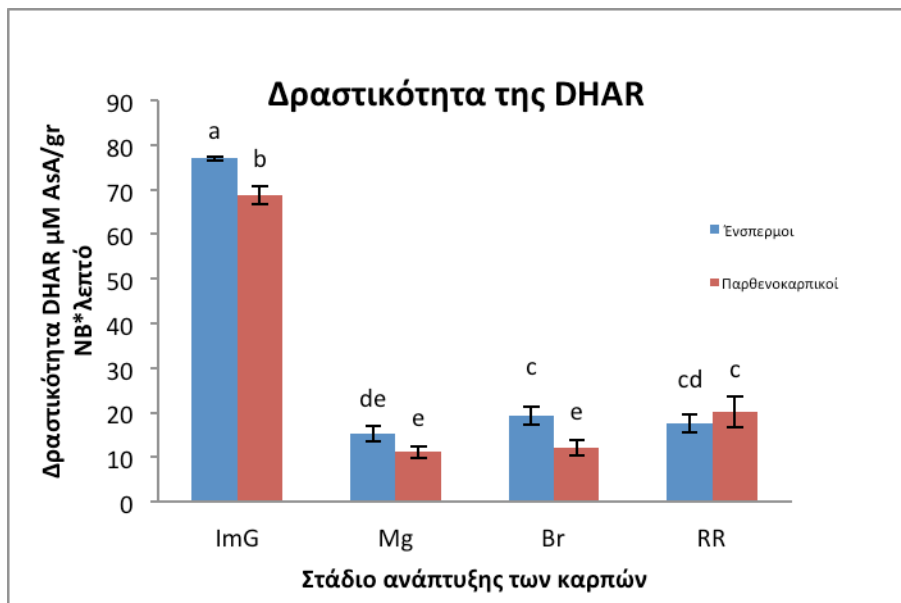
α) Δραστικότητα της APX



Διαγραμμα 6: Η δραστικότητα της APX σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί, Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί, Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Το πρότυπο της μεταβολής της δραστικότητας της APX κατά την ανάπτυξη και την ωρίμανση του καρπού, ήταν διαφορετικό στους ένσπερμους από τους παρθενοκαρπικούς. Στους ένσπερμους καρπούς η δραστικότητα ήταν σχετικά υψηλή στα αρχικά στάδια (ImG, Mg), και στη συνέχεια παρατηρήθηκε σταδιακή αποκλιμάκωσή της κατά την ωρίμανση του καρπού. Στους παρθενοκαρπικούς υπήρξε μία αύξηση της δραστικότητας από το ImG στο Mg και στα επόμενα στάδια η δραστικότητα παρέμενε σταθερή. Συνολικά η δραστικότητα της APX κυμάνθηκε από 95 στα 142 $\mu\text{M ASA/g NB}^*\text{λεπτό}$ σε όλους τους καρπούς που εξετάστηκαν (Διαγρ. 6).

β) Δραστικότητα της DHAR

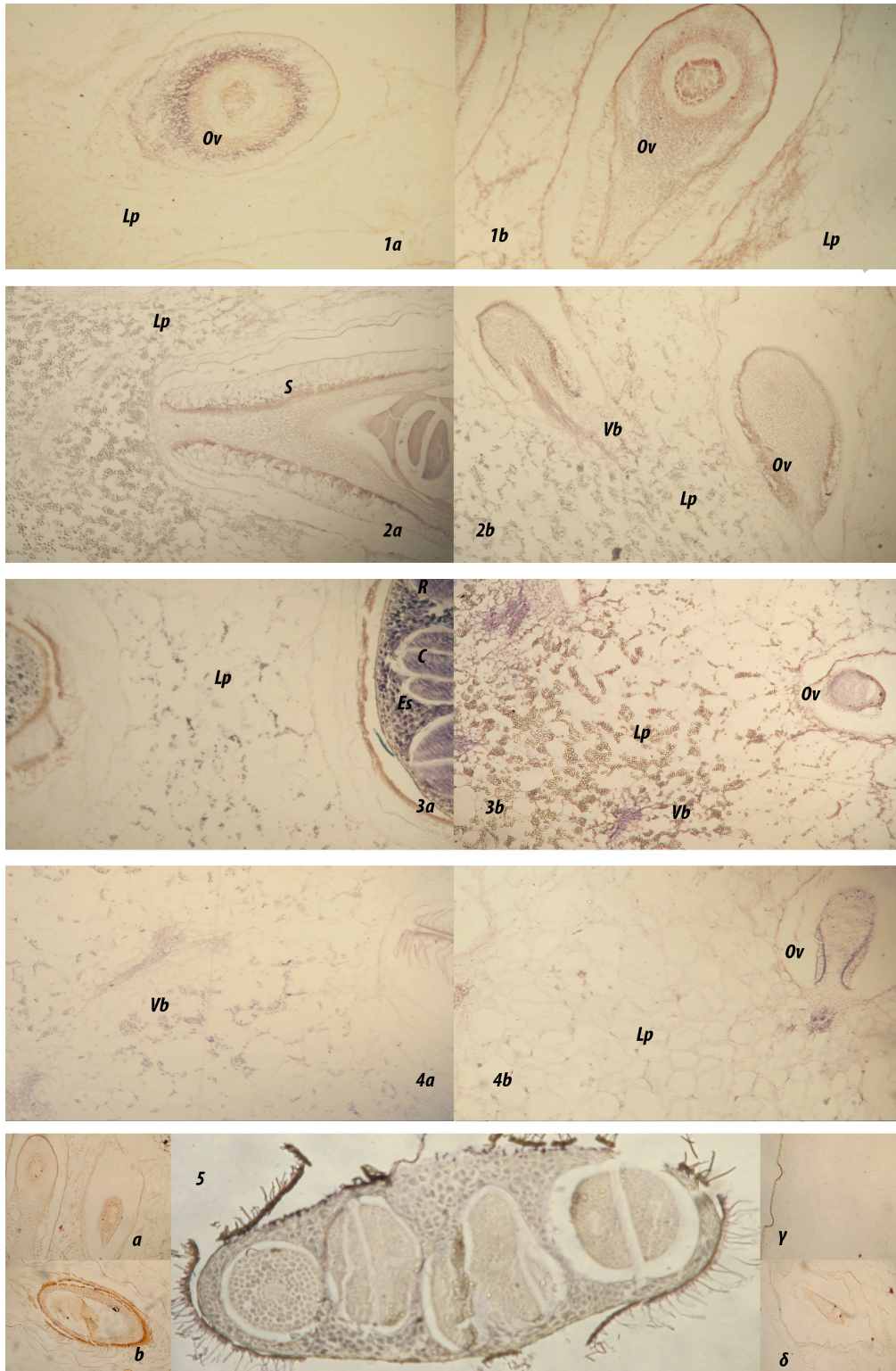


Διαγραμμα 7. Δραστικότητα της DHAR σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί, Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί, Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Η δραστικότητα της DHAR ακολούθησε παρόμοια πρότυπο στους ένσπερμους και τους παρθενοκαρπικούς καρπούς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους (Διαγρ. 7). Παρατηρήθηκε τετραπλάσια σχεδόν δραστικότητα στο στάδιο ImG σε σχέση με τα υπόλοιπα στάδια ανάπτυξης των καρπών. Μετά το στάδιο ImG η δραστικότητα παρέμεινε σε συγκριτικά χαμηλά επίπεδα. Συνολικά η δραστικότητα κυμάνθηκε μεταξύ 10 και 78 $\mu\text{M ASA/g NB}^*\text{λεπτό}$

3.3.2 Ανοσοεντοπισμός της APX

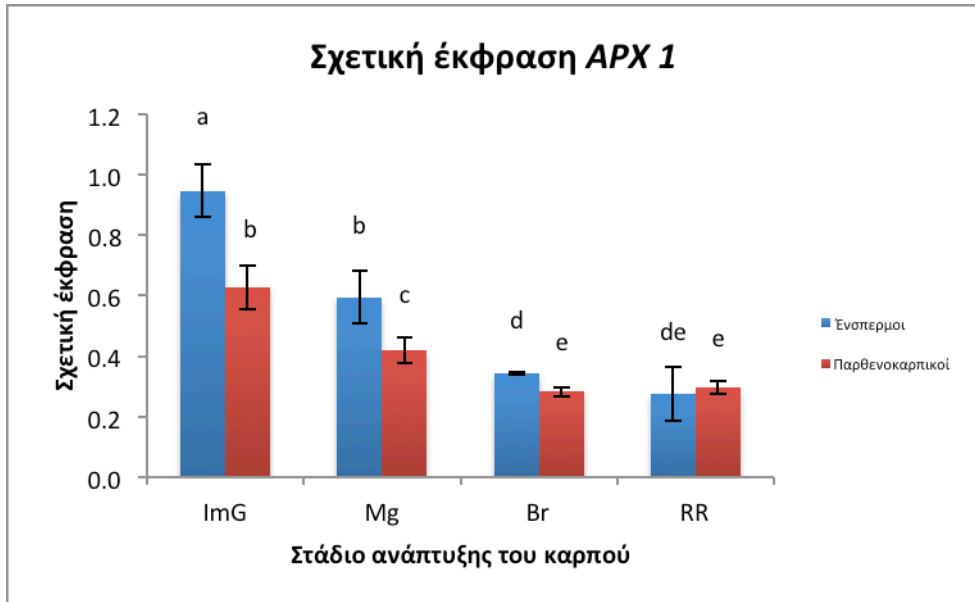
Η ακριβής κατανομή της πρωτεΐνης της κυτοπλασματικής APX στους ιστούς της τομάτας, εξετάστηκαν στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς με ανοσοεντοπισμό (Εικ 3). Η παρουσία του ενζύμου ήταν εντονότερη σε ταχέως αναπτυσσόμενους ιστούς όπως σπερματικές βλάστες και έμβρυα. Το ένζυμο εντοπίστηκε με ισχυρό σήμα στα αναπτυσσόμενα σπέρματα, το γεγονός αυτό αποτελούσε τη σημαντικότερη διαφορά μεταξύ των ένσπερμων και των παρθενοκαρπικών καρπών.



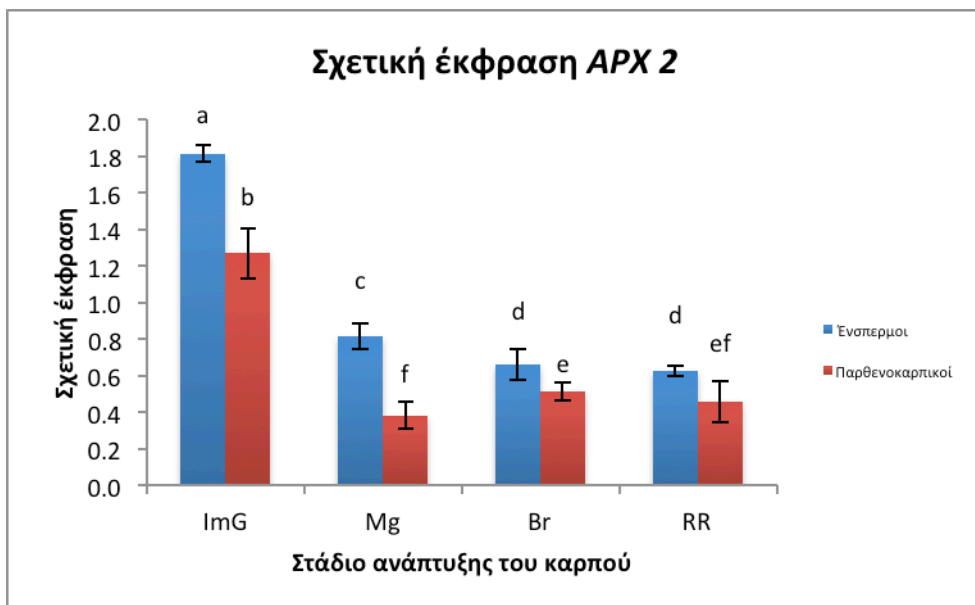
Εικόνα 3: Ανοσοεντοπισμός της APX σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας "cherry". Η παρουσία της πρωτεΐνης καταδεικνύεται με το μπλέ-μωβ χρωματισμό. C : εμβρυακή κοτυληδόνα, Es: ενδοσπέρμιο, LP: ζελατινώδες παρέγχυμα, Ov: ωθήκη, Vb: ηθμαγγειώδης δεσμίδα. 1-ImG, 2-Mg, 3-Br, 4-RR, 5-σπέρμα. α-ένσπερμοι καρποί, β-παρθενοκαρπικοί καρποί. In 1-4, μάρτυρας στα τέσσερα στάδια ανάπτυξης ο οποίος έχει χρωματιστεί με σαφρανίνη.

Μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον καταβολισμό και την ανακύκλωση του AsA.

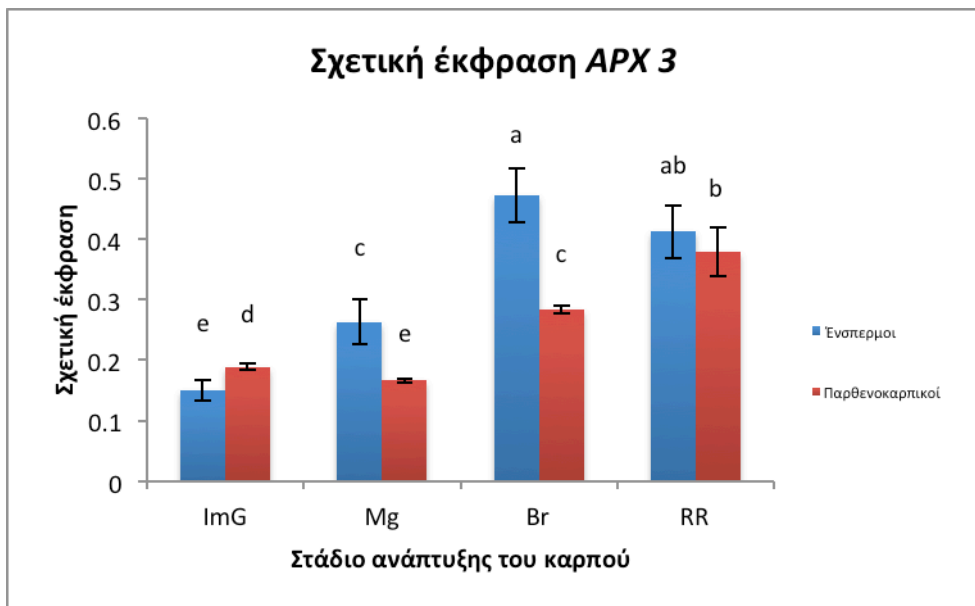
3.3.2 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της APX



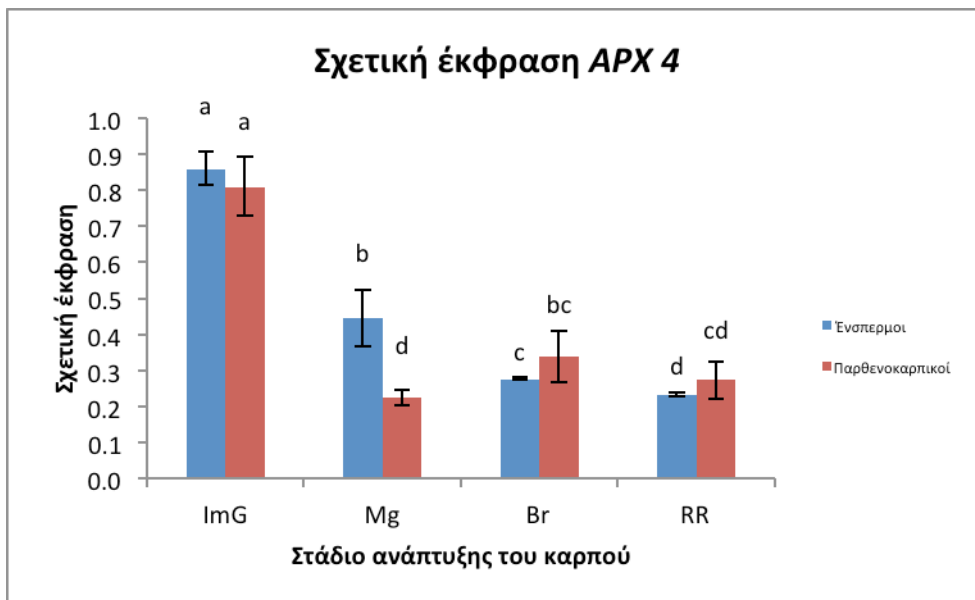
Διάγραμμα 8: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του κυτοπλασματικού ισοενζύμου *APX1* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



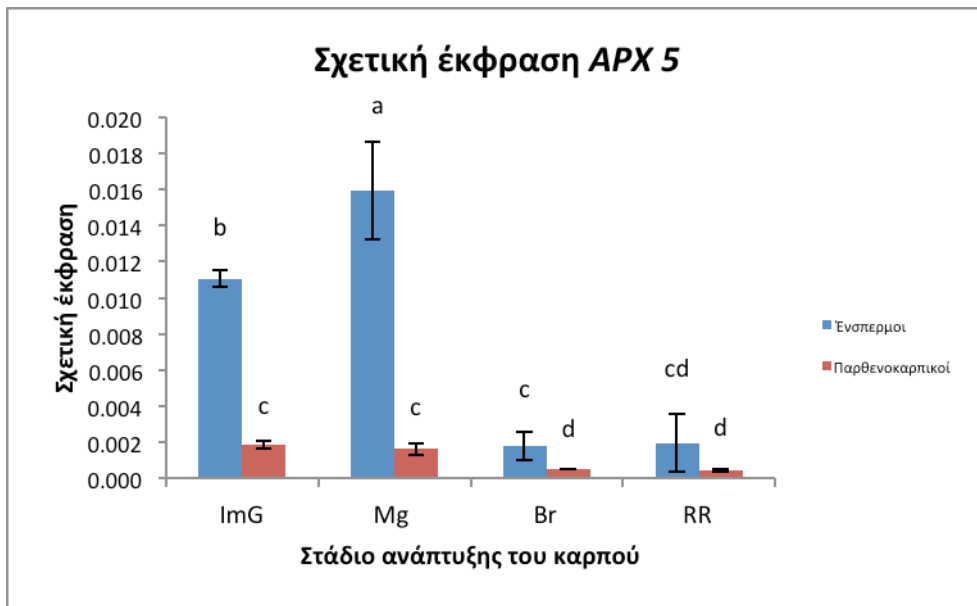
Διάγραμμα 9: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του κυτοπλασματικού ισοενζύμου *APX2* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



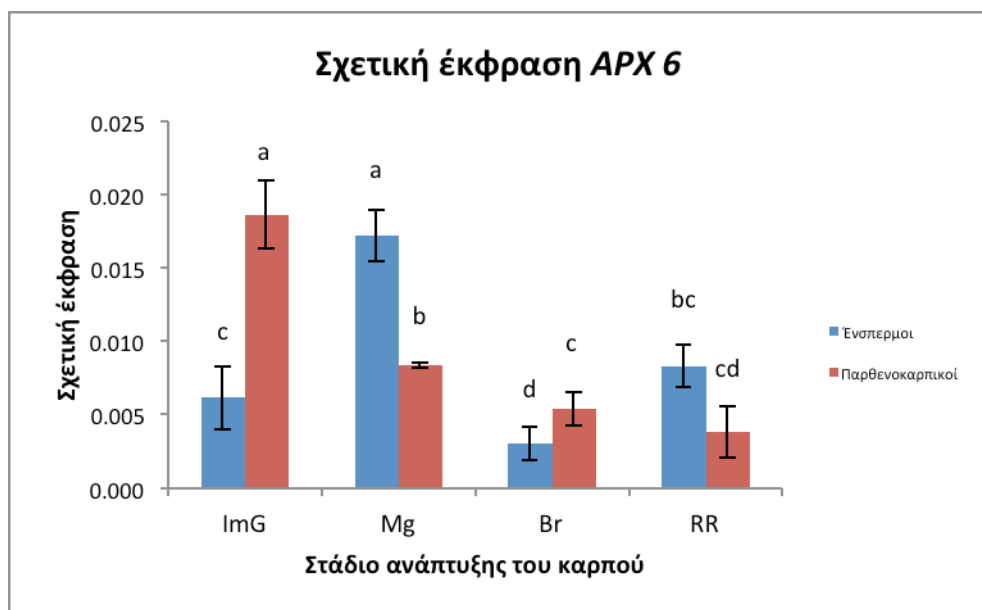
Διάγραμμα 10: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του κυτοπλασματικού ισοενζύμου *APX3* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



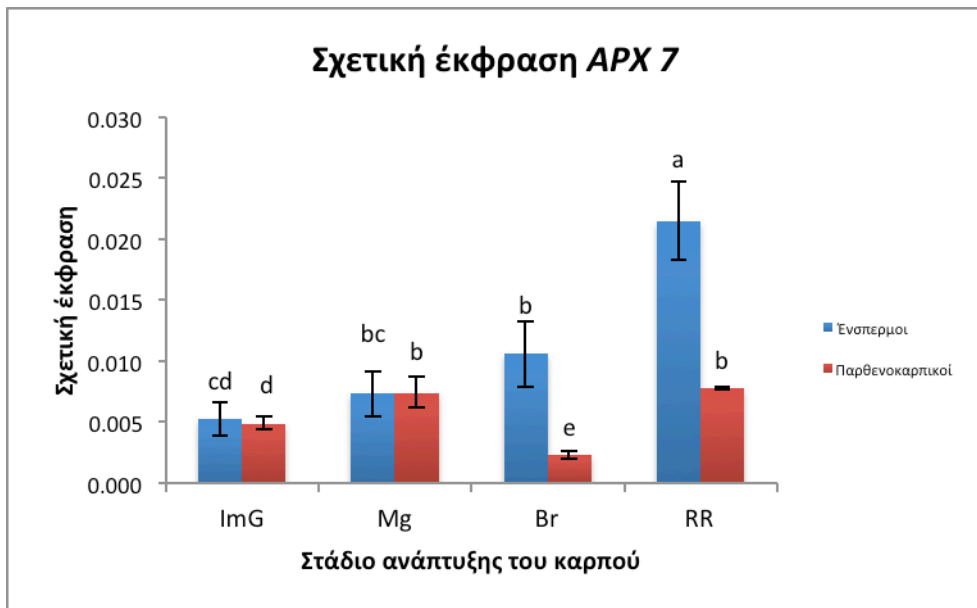
Διάγραμμα 11: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του κυτοπλασματικού ισοενζύμου *APX4* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



Διάγραμμα 12: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του κυτοπλασματικού ισοενζύμου APX5 σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



Διάγραμμα 13: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του πλαστιδιακού ισοενζύμου APX6 σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



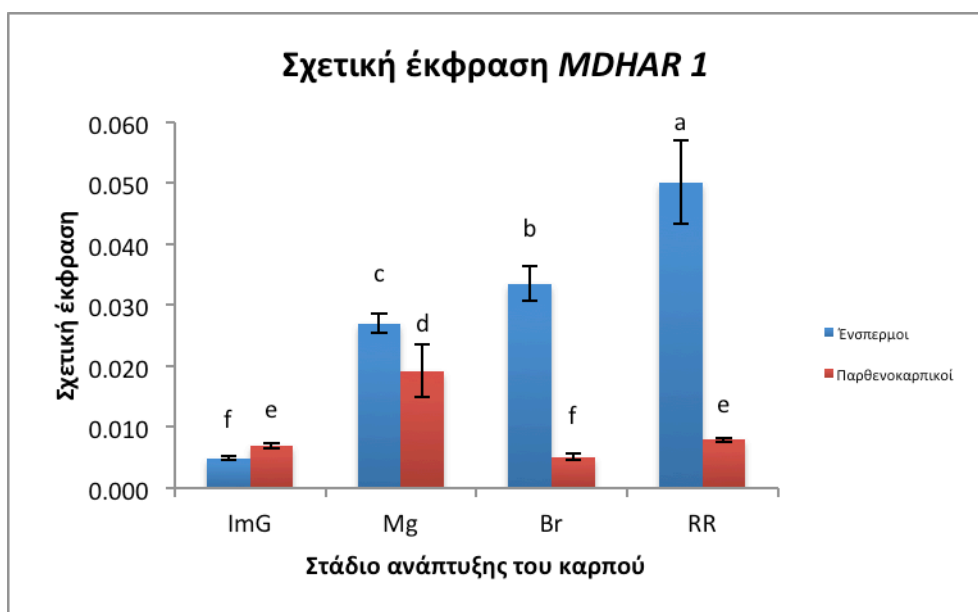
Διάγραμμα 14: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του πλαστιδιακού ισοενζύμου *APX7* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

Η έκφραση των κυτοπλασματικών *APX1*, *APX2* και *APX4* παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο διακύμανσης σε συγκρίσιμη σχετική έκφραση (Διάγρ. 8,9,11). Σε κάθε περίπτωση η έκφραση ήταν μεγαλύτερη στο ImG βαίνοντας μειούμενη όσο ο καρπός ωρίμαζε. Η έκφραση της *APX1* ήταν μεγαλύτερη στους ένσπερμους καρπούς συγκριτικά με τους παρθενοκαρπικούς αλλά όχι στην πλήρη ωρίμανση (RR). Η έκφραση της *APX2* ήταν σταθερά μεγαλύτερη στους ένσπερμους καρπούς σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς. Αναφορικά με την *APX4*, η μόνη διαφορά στο πλήθος των μεταγραφημάτων εντοπίστηκε στο στάδιο Mg, όπου οι ένσπερμοι παρουσίασαν τη υψηλότερο πλήθος μεταγραφημάτων σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς.

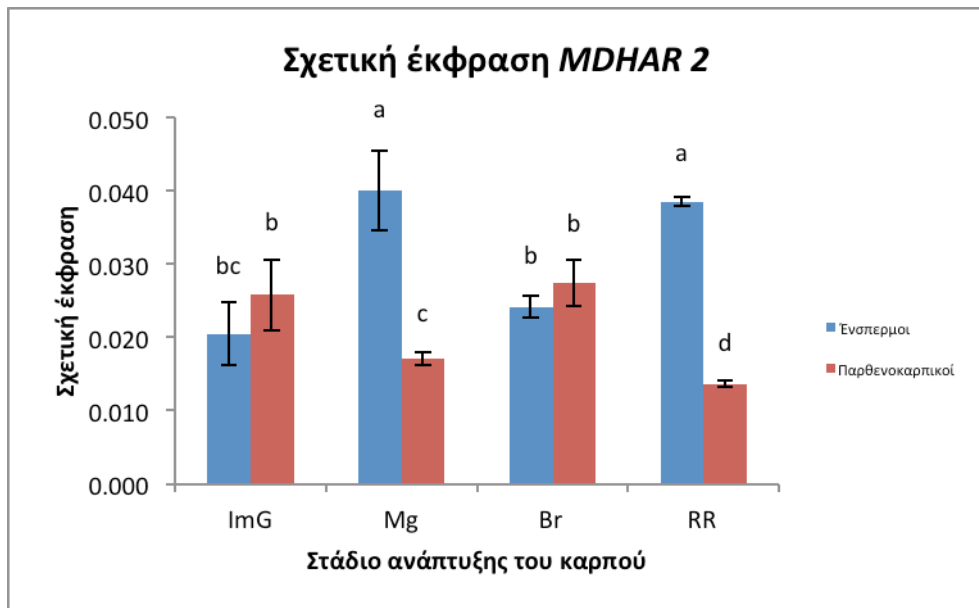
Η *APX3* παρουσίασε εντελώς διαφορετικό πρότυπο διακύμανση σε σχέση με τα άλλα κυτοπλασματικά ισοένζυμα με σταδιακή αύξηση της πληθώρας των μεταγραφημάτων μετά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης των καρπών (Διάγρ. 10). Οι ένσπερμοι καρποί παρουσίασαν μέγιστο στο στάδιο Br ενώ ακολούθησε μία μικρή αλλά όχι στατιστικά σημαντική πτώση στο στάδιο RR. Το ίδιο πρότυπο μεταβολής των μεταγραφημάτων παρουσίασαν και οι παρθενοκαρπικοί καρποί με τη διαφορά ότι το πλήθος των μεταγραφημάτων στο στάδιο ImG ήταν υψηλότερο από ότι στο στάδιο MG. Η πληθώρα των μεταγραφημάτων της *APX5* ήταν μεγαλύτερη στα προ-κλιμακτηριακά στάδια ανάπτυξης των καρπών ImG και Mg ενώ ακολούθησε σημαντική

πτώση της έκφρασης του γονιδίου στο μετά-κλιμακτηριακά στάδια Br και RR (Διάγρ. 12). Η έκφραση της *APX5* ήταν σημαντικά υψηλότερη στους ένσπερμους καρπούς ιδίως στα στάδια ImG και Mg. Εκτός από τη σταδιακή αύξηση της έκφρασης της *APX7* κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και ωρίμανσης του καρπού, δεν βρέθηκε κάποιο άλλο σταθερό πρότυπο στην έκφραση των *APX6* και *APX7* (και στις δύο κατηγορίες καρπών) (Διάγρ. 13,14).

3.3.3 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της MDHAR



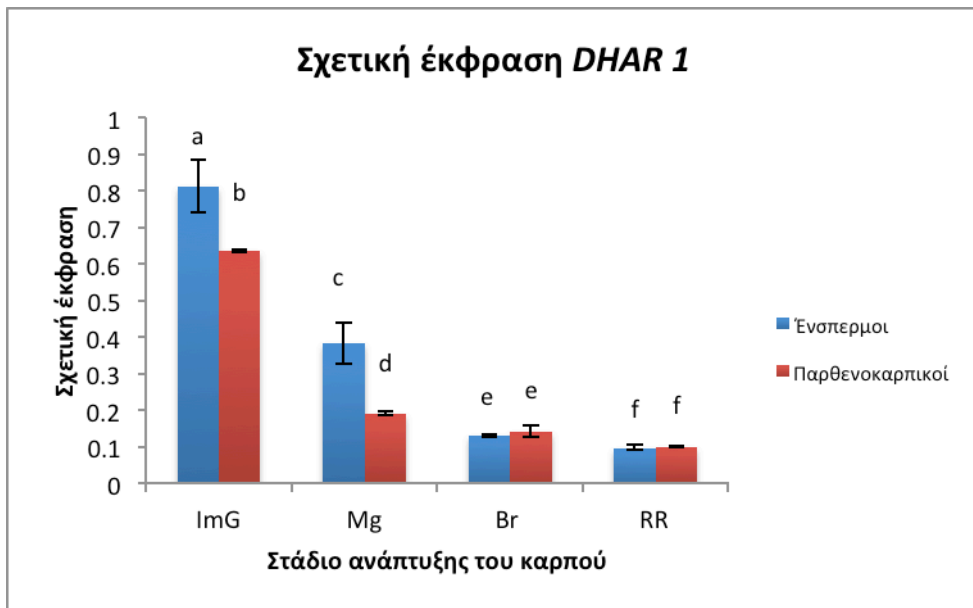
Διάγραμμα 15: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του κυτοπλασματικού ισοενζύμου *MDHAR1* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



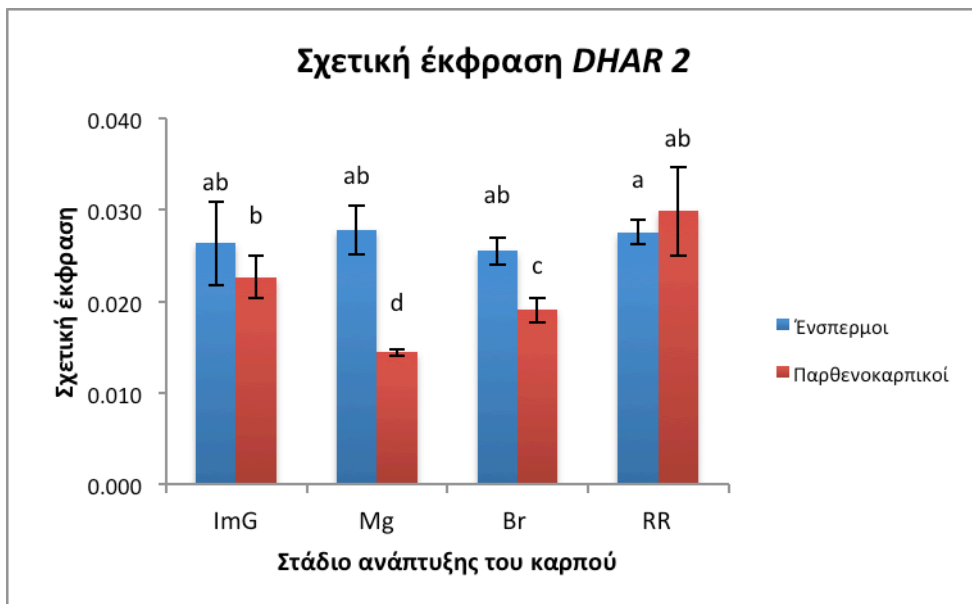
Διάγραμμα 16: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του πλαστιδιακού ισοενζύμου *MDHAR2* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

Το πρότυπο της έκφρασης της *MDHAR1* ήταν διαφορετικό στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς (Διάγρ. 15). Στους ένσπερμους καρπούς τα μεταγραφήματα του γονιδίου αυξάνονταν σταδιακά κατά την αύξηση και ωρίμανση των καρπών. Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς παρατηρήθηκε μέγιστο στο στάδιο Mg ενώ στα υπόλοιπα στάδια (ImG, Br και RR), η έκφραση του γονιδίου ήταν χαμηλή. Η έκφραση του γονιδίου της *MDHAR* ήταν υψηλότερη στους ένσπερμους καρπούς σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης των καρπών. Η έκφραση της *MDHAR2* στις δύο μεταχειρίσεις ήταν παρόμοια με τους ένσπερμους καρπούς να παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση στα στάδια Mg και RR (Διάγρ. 16).

3.3.4 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της DHAR



Διάγραμμα 17: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του κυτοπλασματικού ισοενζύμου *DHAR1* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

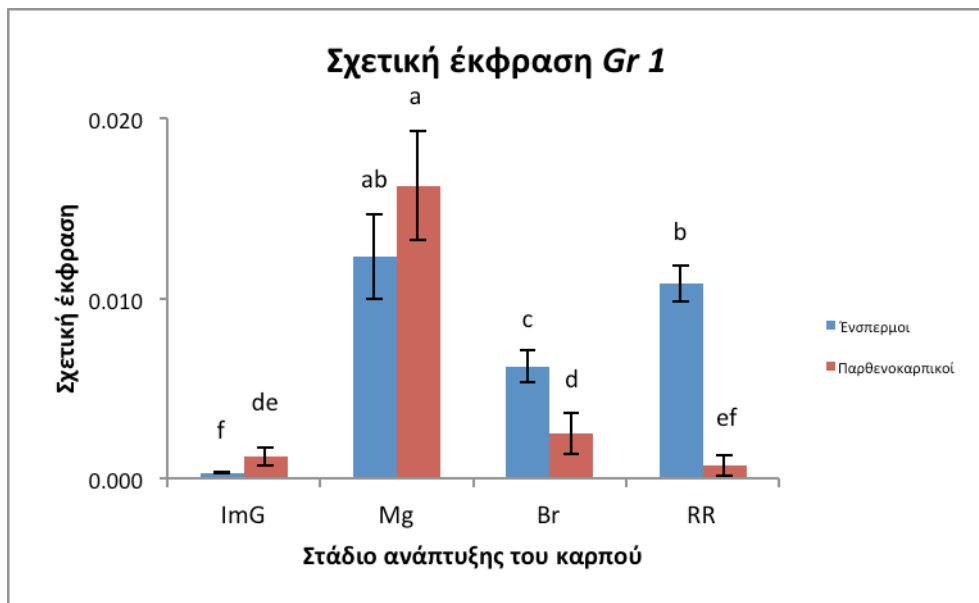


Διάγραμμα 18: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του πλαστιδιακού ισοενζύμου *DHAR2* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

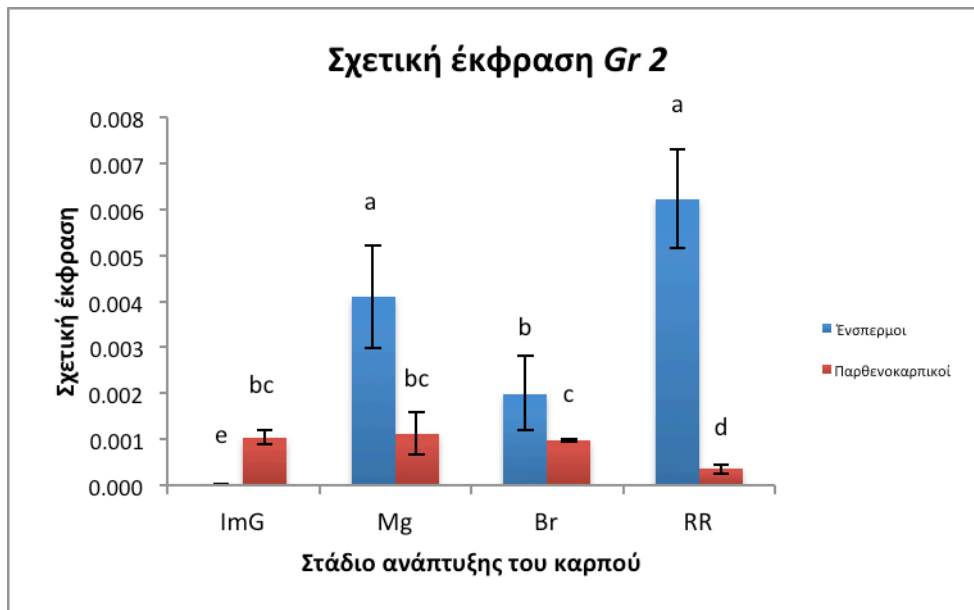
Η κυτοπλασματική *DHAR* ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο έκφρασης τους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς με προοδευτικά μειούμενη έκφραση από το στάδιο ImG μέχρι το

στάδιο Br (Διαγρ. 17). Η έκφραση του γονιδίου ήταν υψηλότερη στους ένσπερμους καρπούς στα προ-κλιμακτηριακά στάδια ανάπτυξης του καρπού (ImG και Mg) ενώ παρέμεινε περίπου σταθερή στα μετακλιμακτηριακά στάδια. Συνολικά συνεπώς το πρότυπο έκφρασης της *DHAR1* ήταν παρόμοιο με αυτό των κυτοπλασματικών *APX1*, 2 και 4. Η έκφραση της πλαστιδιακής *DHAR2* ήταν σημαντικά χαμηλότερη από αυτή της κυτοπλασματικής *DHAR1*. Η έκφραση της *DHAR2* παρουσίασε μικρή διακύμανση στους ένσπερμους καρπούς, ενώ στους παρθενοκαρπικούς παρουσίασε μέγιστο στα στάδια αμέσως πριν και αμέσως μετά την κλιμακτήριο (Mg και Br) (Διάγρ. 18).

3.3.5 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της GR



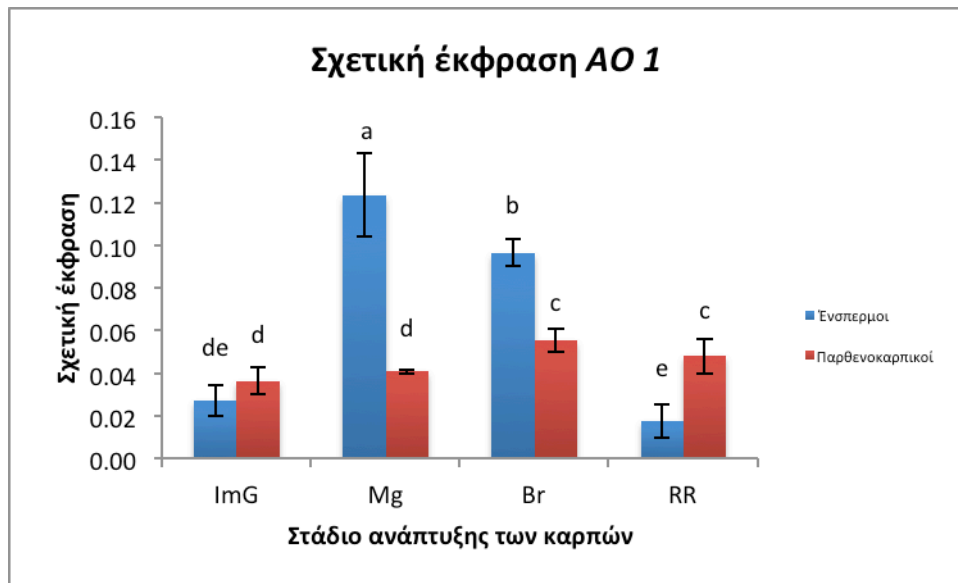
Διάγραμμα 19: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του κυτοπλασματικού ισοενζύμου *GR1* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



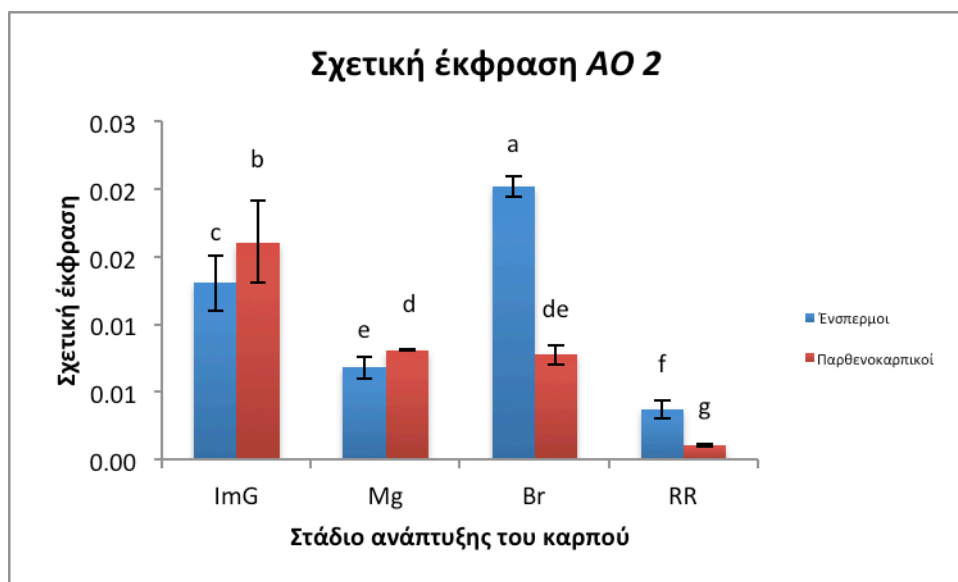
Διάγραμμα 20: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου του πλαστιδιακού ισοενζύμου *GR2* σε αναπτυσσόμενους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

Η έκφραση της *GR1* ακολούθησε παρόμοιο πρότυπο στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς. Η έκφραση βρέθηκε χαμηλή πριν από την ωρίμανση των καρπών (ImG) αλλά αυξήθηκε περισσότερο από 10 φορές πριν από την κλιμακτήριο (στάδιο Mg). Μετά την κλιμακτήριο παρουσιάστηκε μείωση σε χαμηλά επίπεδα (Br) που ενώ συνεχίστηκε στο στάδιο RR στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, ακολουθήθηκε από σημαντική αύξηση στους ένσπερμους (Διάγρ. 19). Η πλαστιδιακή *GR2* βρέθηκε εξαιρετικά χαμηλή στους ένσπερμους καρπούς στο στάδιο ImG αλλά αυξήθηκε σημαντικά στο στάδιο Mg και παρόλο που παρατηρήθηκε μια μείωση της έκφρασης στο Br διατηρήθηκε υψηλά και στο RR. Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς παρατηρήθηκε σχετικά μειωμένη διακύμανση στην έκφραση της *GR2* μέχρι το στάδιο Br, ενώ ακολούθησε σημαντική μείωση στο RR. Η έκφραση της *GR2* μετά το ImG ήταν σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς καρπούς (Διάγρ. 20). Η έκφραση των γονιδίων της GR ήταν σημαντικά χαμηλότερη σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια που κωδικοποιούν τα ένζυμα που συμμετέχουν στον κύκλο Foyer–Halliwell–Asada.

3.3.6 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της ΑΟ



Διάγραμμα 21: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου της ΑΟ1 σε αναπτυσσόμενους ένοςπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.



Διάγραμμα 22: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων γονιδίου της ΑΟ2 σε αναπτυσσόμενους ένοςπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry". ImG-ανώριμοι πράσινοι καρποί (25 HMA), Mg-ώριμοι πράσινοι καρποί (38 HMA), Br-στάδιο αλλαγής του χρώματος (44 HMA), RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί (52 HMA). Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις τεχνικές επαναλήψεις.

Η έκφραση της *AO1* ακολούθησε διαφορετικό πρότυπο στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς. Στους ένσπερμους καρπούς παρουσιάστηκε αυξημένη έκφραση πριν και μετά την κλιμακτήριο (στάδια Mg και Br), ενώ στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η έκφραση παρουσίασε χαμηλή διακύμανση κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών (Διάγρ. 21). Η έκφραση της *AO2* ακολούθησε και αυτή παρόμοιο πρότυπο διακύμανσης στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς με εξαίρεση το μετά-κλιμακτηριακό στάδιο ανάπτυξης των καρπών (Br) όπου παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση στην έκφραση του γονιδίου (Διάγρ. 22). Με εξαίρεση το στάδιο Br των ένσπερμων καρπών, η έκφραση του γονιδίου στις δύο μεταχειρίσεις μειωνόταν καθώς ο καρπός αναπτυσσόταν και ωρίμαζε, το πρότυπο ήταν παρόμοιο με αυτό των *APX1,2,4* και *DHAR 1*.

3.4 Συζήτηση

3.4.1 Έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων της APX και της AO

Η οικογένεια της APX αποτελείται στα περισσότερα φυτικά είδη από μεγάλο αριθμό ισοενζύμων. Επτά γονίδια αναφέρονται στη τομάτα από τα οποία πέντε εδράζονται στο κυτόπλασμα ενώ δύο εδράζονται στα πλαστίδια (Aoki et al., 2010). Ο διαφορετικός υποκυτταρικός εντοπισμός των ισοενζύμων και οι συγκεκριμένοι ρόλοι που έχουν απέναντι σε διαφορετικές αντιοξειδωτικές ανάγκες των κυττάρων πιθανώς συνεπάγεται και διαφορετική ρύθμιση της έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ισοένζυμα αυτά (Ishikawa and Shigeoka, 2008).

Στη μελέτη αυτή αποπειράθηκε για πρώτη φορά η ταυτόχρονη μελέτη της έκφρασης των γονιδίων όλων των χαρακτηρισμένων ισοενζύμων της APX κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών της τομάτας.

Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων, επηρεάζεται σημαντικά από τον υποκυτταρικό εντοπισμό τους. Σε γενικές γραμμές, τα ισοένζυμα APX 1, 2, 4 παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στο οποίο παρατηρήθηκε μείωση του πλήθους των μεταγραφημάτων με την πρόοδο της ωρίμανσης του καρπού. Η έκφραση της κυτοπλασματικής APX5 ήταν αυξημένη και στο στάδιο Mg ακολουθώντας όμως σε γενικές γραμμές το παραπάνω πρότυπο. Το πλήθος των μεταγραφημάτων της APX5 ήταν μία τάξη μεγέθους υψηλότερο στους ένσπερμους καρπούς σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς, παρόλο που ακολουθούσαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης. Οι Jimenez et al., (2002) αναφέρουν σημαντικά αυξημένα επίπεδα μεταγραφημάτων μιας κυτοπλασματικής και μιας πλαστιδιακής APX στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης και ωρίμανσης των καρπών μεγαλόκαρπης τομάτας.

Έχει προταθεί ότι τόσο η κυτοπλασματική APX όσο και η πλαστιδιακή APX προστατεύουν τις πρωτεΐνες των πλαστιδίων από οξειδωση. Κατά τη διάρκεια της φωτοσυνθετικής φάσης των καρπών, μπορεί να υποθεθεί ότι η αυξημένη έκφραση των ισοενζύμων αυτών συνδέεται με τη φωτοσυνθετική λειτουργία των καρπών. (Davletova et al., 2005).

Η έκφραση της κυτοπλάσματικής *APX3* (η οποία από δεδομένα μελέτης μας που πρόκειται να δημοσιευθούν, εκφράζεται κατά κύριο λόγο στα άνθη και τους καρπούς) ακολούθησε διαφορετικό πρότυπο έκφρασης από τις *APX 1, 2, 4, 5* παρουσιάζοντας σταδιακή αύξηση μεταγραφημάτων κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών. Παρόμοιο πρότυπο αναφέρεται από τους Kim and Chung (1997) για την υποτιθέμενη πλαστιδιακή *APX* στη φράουλα. Η πιθανή ερμηνεία του φαινομένου είναι ότι η *APX3* συμμετέχει σε διαφορετικά μεταβολικά μονοπάτια από τις υπόλοιπες κυτοπλασματικές και πιθανώς το ισοένζυμο αυτό είναι σημαντικό για τη διατήρηση των επιπέδων δραστηριότητας της *APX* κατά την ωρίμανση των καρπών. Η μειωμένη διακύμανση της δραστηριότητας της *APX* είναι ένα δεδομένο που υποστηρίζει την παραπάνω άποψη.

Το πρότυπο έκφρασης των πλαστιδιακών ισοενζύμων που μελετήθηκαν ήταν διαφορετικό από αυτό των κυτοπλασματικών. Η *APX6* (εντοπισμένη στις θυλακοειδείς μεμβράνες των πλαστιδίων) παρουσίασε σημαντικά αυξημένο πλήθος μεταγραφημάτων κατά τα στάδια ImG και Mg, στα στάδια δηλαδή στα οποία οι χλωροπλάστες ήταν ενεργοί. Το πρότυπο αυτό της έκφρασης πιθανόν να σημαίνει ότι το ισοένζυμο *APX6* συμμετέχει σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις εντός των χλωροπλαστών των καρπών. Η *APX7* η οποία πιθανώς εντοπίζεται στο στρώμα των πλαστιδίων, παρουσίασε διαφορετικό πρότυπο έκφρασης στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς. Στους ένσπερμους η έκφραση αυξανόταν με την αύξηση και ωρίμανση του καρπού, ενώ στους παρθενοκαρπικούς η έκφραση ήταν σχετικά σταθερή με εξαίρεση το στάδιο αλλαγής του χρώματος (Br) όπου παρουσιάστηκε μειωμένη έκφραση. Η διαφορά αυτή σχετίζεται πιθανώς με την ανάπτυξη και τη μετέπειτα αφυδάτωση του εμβρύου.

Τα παραπάνω ευρήματα καθώς και ευρήματα που αναφέρονται σε άλλες μελέτες (Panchuk et al., 2002; Ishikawa and Shigeoka, 2008), οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η ρύθμιση του αντιοξειδωτικού συστήματος και συγκεκριμένα της *APX* στους καρπούς, είναι εξαιρετικά πολύπλοκη και επηρεάζεται από πληθώρα παραγόντων ένας από τους οποίους είναι και η ύπαρξη ή απουσία σπέρματος και το στάδιο ανάπτυξης των καρπών.

Αναφορικά με την *AO*, η διαφορετική έκφραση κυρίως της *AO1* αλλά και σε ένα βαθμό και της *AO2*, μεταξύ των ένσπερμων και των παρθενοκαρπικών καρπών που ανιχνεύτηκε στην παρούσα μελέτη, πιθανά εξηγείται από τις διαφορές στα επίπεδα αυξίνης

στα δύο είδη καρπών. Οι Pignocchi et al., (2003), αναφέρουν ότι τα μεταγραφήματα των γονιδίων της AO αυξάνονται με επίδραση αυξίνης.

3.4.2 Έκφραση των γονιδίων της ανακύκλωσης του AsA

Τα δύο γονίδια της *MDHAR* που εξετάστηκαν είχαν διαφορετικό πρότυπο έκφρασης. Επιπρόσθετα, οι ένσπερμοι και παρθενοκαρπικοί καρποί εμφάνισαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση της *MDHAR*. Η έκφραση της *MDHAR1* αυξανόταν σταδιακά καθώς οι ένσπερμοι καρποί αναπτύσσονταν και ωρίμαζαν ενώ οι παρθενοκαρπικοί παρουσίασαν μέγιστο έκφρασης πριν από την κλιμακτήριο (Mg). Αντίθετα η έκφραση της πλαστιδιακής *MDHAR2* παρουσίασε μειωμένη διακύμανση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού. Οι ένσπερμοι καρποί παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη έκφραση από τους παρθενοκαρπικούς στα στάδια Mg και RR.

Τα ευρήματα της παρούσας μελέτης είναι σε συμφωνία με αυτά των Eltelib et al., (2012) και των Bulley et al., (2009) που αναφέρουν μέγιστο έκφρασης της *MDHAR* στους ώριμους καρπούς. Αναφορικά με την έκφραση του πλαστιδιακού ισοενζύμου, η σύνδεση της με καταστάσεις καταπόνησης έχει ήδη αναφερθεί (Bulley et al., 2009) και δεδομένου ότι τα πλαστίδια λειτουργούν συνεχώς σε συνθήκες έντονου μεταβολισμού, η μειωμένη διακύμανση της έκφρασης είναι σε ένα βαθμό αναμενόμενη.

Η έκφραση του γονιτίου της πλαστιδιακής *DHAR2* παρουσίασε μειωμένη διακύμανση συγκρίσιμη με την διακύμανση της πλαστιδιακής *MDHAR*. Αντιθέτως η κυτοπλασματική *DHAR1* εμφάνισε διαφορετικό πρότυπο έκφρασης από την κυτοπλασματική *MDHAR1* γεγονός που υποδηλώνει ότι η ρύθμιση της έκφρασης των δύο γονιδίων είναι πιθανόν διαφορετική. Παρόμοιο πρότυπο έκφρασης της κυτοπλασματικής *DHAR* κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών της ασερόλα αναφέρουν και οι Eltelib et al., (2012). Η μελέτη της έκφρασης της *DHAR1* δεν κατέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ένσπερμων και των παρθενοκαρπικών καρπών. Τα αποτελέσματα μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει σημαντική σύνδεση μεταξύ της έκφρασης του γονιδίου της κυτοπλασματικής *DHAR1*, της δραστηριότητας του ενζύμου και της συγκέντρωσης DHA των καρπών. Η ανάγκη για αντιοξειδωτικό δυναμικό κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης των καρπών οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της *DHAR1* και υψηλότερη δραστηριότητα της DHAR. Ο ρόλος της DHAR στη διατήρηση των επιπέδων

ανηγμένου AsA, έχει καταδειχτεί στον καπνό και στον αραβόσιτο. Οι Chen et al., (2003) χρησιμοποιώντας φυτά που υπερέκφραζαν την κυτοπλασματική DHAR, διαπίστωσαν σημαντική (διπλάσια έως τετραπλάσια) αύξηση των επιπέδων ανηγμένου AsA. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανακύκλωση του AsA είναι μια ιδιαιτέρως σημαντική διεργασία που θεωρητικά και με τους κατάλληλους χειρισμούς θα μπορούσε να οδηγήσει σε φυτά με αυξημένη συγκέντρωση AsA. Επειδή τόσο το πλήθος των μεταγραφημάτων όσο και η δραστηριότητα της DHAR είναι κατά πολύ υψηλότερα του πλήθους των μεταγραφημάτων και της δραστηριότητας της MDHAR μπορούμε με σχετική ασφάλεια να υποθέσουμε ότι η DHAR αναλαμβάνει το κύριο βάρος της ανακύκλωσης του AsA. Πράγματι, και οι Haroldsen et al., (2011) αναφέρουν τετραπλάσια δραστηριότητα της DHAR από την MDHAR στα φύλλα τομάτας, ενώ η αναλογία αυτή καταγράφηκε στην παρούσα μελετέτη ακόμη μεγαλύτερη στους καρπούς.

Η μελέτη της έκφρασης της πλαστιδιακής GR2 κατέδειξε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ένσπερμων και των παρθενοκαρπικών καρπών. Παρόλα αυτά η μελέτη της έκφρασης των ισοενζύμων της GR δεν έδειξε κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο έκφρασης κατά την αύξηση και ωρίμανση των καρπών της τομάτας "cherry". Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στην πληθώρα διεργασιών στις οποίες συμμετέχει η GR πέρα από την ανακύκλωση του AsA (Noctor et al., 2002). Παρόλο που το ένζυμο θεωρείται μέρος του κύκλου Foyer-Halliwel-Asada (οξειδωση-ανακύκλωση του AsA) η έκφραση των γονιδίων δεν φαίνεται ότι επηρεάζεται από την οξειδοαναγωγική κατάσταση του AsA.

3.4.3 Ανοσοεντοπισμός της κυτοπλασματικής APX

Ο ακριβής εντοπισμός των πρωτεϊνών της κυτοπλασματικής APX έγινε με τη χρήση κατάλληλων αντισωμάτων. Στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν πληροφορίες που αφορούν τον εντοπισμό των ενζύμων αυτών στους φυτικούς ιστούς. Τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού, επαλήθευσαν τη συνεχή παρουσία του ενζύμου σε όλους τους ιστούς των καρπών καθόλα τα στάδια ανάπτυξης τους. Τα κυτοπλασματικά ισοένζυμα της APX εντοπίστηκαν κυρίως στις σπερματικές βλάστες καθώς και στα αναπτυσσόμενα σπέρματα, γεγονός που αποτελεί και τη σημαντικότερη διαφορά μεταξύ ένσπερμων και

παρθενοκαρπικών καρπών. Ο εντοπισμός του ενζύμου στα σπέρματα δεν μεταφράστηκε σε αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου στους ένσπερμους καρπούς σε σύγκριση με τους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Η παρατήρηση αυτή πιθανά οφείλεται από τις ιδιότητες του ενζύμου της APX που για να διατηρήσει τη δραστικότητα αλλά και τη σταθερότητα του, απαιτεί την παρουσία ανηγμένου AsA (Miyake and Asada, 1996). Τα σπέρματα της τομάτας περιέχουν AsA κυρίως στην οξειδωμένη του μορφή (Pukacka and Ratajczak, 2010).

3.4.4 Ενζυμική δραστικότητα της APX και της DHAR

Παρόλο που στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης των καρπών (ImG) η κύρια μορφή του ολικού AsA ήταν το οξειδωμένο AsA (DHA), στον ώριμο κόκκινο καρπό το 90% περίπου του tAsA βρέθηκε στην ανηγμένη του μορφή. Παρόμοια ευρήματα αναφέρουν για μεγαλόκαρπη ποικιλία τομάτας οι Alhagdow et al., (2007). Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι υπάρχει συνεχής αναγωγή και οξείδωση του AsA που διαφέρει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και ωρίμανσης των καρπών.

Η δραστικότητα της APX παρουσίασε μικρή διακύμανση κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών (Εικ). Το γεγονός αυτό πιθανά οφείλεται στην επικάλυψη της έκφρασης των γονιδίων και της δραστικότητας των ισοενζύμων της APX σε κάθε στάδιο ανάπτυξης και ωρίμανσης. Το εύρημα αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα των Jimenez et al., (2002) που αναφέρουν επίσης περιορισμένη διακύμανση της δραστικότητας της APX κατά την ανάπτυξη καρπών μεγαλόκαρπης τομάτας. Δεν βρέθηκαν επίσης σημαντικές διαφορές στο πρότυπο διακύμανσης της δραστικότητας της APX μεταξύ των ένσπερμων και των παρθενοκαρπικών καρπών. Η μικρή διακύμανση της δραστικότητας της APX υποδηλώνει την σημαντικότητα της συμμετοχής της APX στη ρύθμιση της οξειδοαναγωγικής κατάστασης των φυτικών κυττάρων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής η συγκέντρωση του DHA στις τομάτες τύπου "cherry", συνδέεται τόσο με τη δραστικότητα της DHAR όσο και με την έκφραση της DHAR1 ανεξάρτητα από το στάδιο ανάπτυξης και ωρίμανσης των καρπών (Εικ). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη σημαντική συμμετοχή του ενζύμου στη οξειδοαναγωγική κατάσταση του AsA. Τόσο οι ένσπερμοι και όσο και οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσίασαν μεγαλύτερη δραστικότητα της DHAR κατά το στάδιο του ανώριμου πράσινου καρπού (ImG) ακολουθώντας

πρότυπο παρόμοιο με αυτό της συγκέντρωσης DHA. Αξιοσημείωτο είναι και το εύρημα ότι κατά το στάδιο αυτό όπου οι ανάγκες για ανηγμένο AsA θεωρούνται μεγαλύτερες, η δραστηριότητα της DHAR ήταν μεγαλύτερη από αυτήν της APX, συνεπώς ο ρυθμός αναγέννησης του ASA ήταν μεγαλύτερος. Όπως και στην περίπτωση της δραστηριότητας APX, δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στο πρότυπο διακύμανσης της δραστηριότητας της DHAR μεταξύ των ένσπερμων και των παρθενοκαρπικών καρπών.

3.4.5 Συμπεράσματα

Σημαντικές διαφορές μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών, ανιχνεύτηκαν στην έκφραση κάποιων γονιδίων (ιδίως την έκφραση των *APX5*, *APX6*, *MDHAR1* και *GR2*) καθώς και στην δραστηριότητα της APX. Τα πλαστιδιακά ισοένζυμα των περισσότερων ενζύμων που μελετήθηκαν παρουσίασαν σημαντικά ισχυρότερη έκφραση ενώ δεν βρέθηκαν διαφορές στην έκφραση των γονιδίων μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών. Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα πως ενώ υπήρχαν σημαντικές διαφορές στην έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων που εντοπίζονται στα οργανίδια, η έκφραση των γονιδίων των πλαστιδιακών ισοενζύμων πιθανόν να υπερκαλύπτει τις διαφορές αυτές.

4. Τρίτη πειραματική ενότητα

4.1 Μεταβολισμός του AsA σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς που δέχτηκαν μετασυλλεκτικούς χειρισμούς

4.1.1 Εισαγωγή

Σε πολλά φυτικά είδη, συμπεριλαμβανομένης της τομάτας, έχει βρεθεί ότι το AsA υπόκειται σε μεγάλες απώλειες κατά τη μετασυλλεκτική ζωή των καρπών (Zerdin *et al.*, 2003; Felicetti and Mattheis, 2010; Oms-Oliu *et al.*, 2011). Μερικοί από τους παράγοντες που οδηγούν στην απώλεια του AsA κατά τη μετασυλλεκτική ζωή είναι η θερμοκρασία συντήρησης και η σχετική υγρασία (Yahia *et al.*, 2001). Οι παραπάνω παράγοντες θεωρείται ότι επηρεάζουν την ταχύτητα ενζυμικών-οξειδώσεων που επιδρούν στη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού (Davey *et al.*, 2000; Oms-Oliu *et al.*, 2009).

Η εμπορική σημασία της τομάτας τύπου "cherry" αυξάνεται συνεχώς, όμως όπως και οι υπόλοιπες ποικιλίες τομάτας είναι ευαίσθητες στην υποβάθμιση της ποιότητας τους κατά τη μετασυλλεκτική ζωή των καρπών (Brummell *et al.*, 2002). Αντίθετα με τη σχετικά μικρή μετασυλλεκτική ζωή του συγκεκριμένου τύπου τομάτας, οι ανάγκες της αγοράς οδηγούν σε αυξημένες ανάγκες για αποθήκευσή και μεταφορά του προϊόντος. Για τη διατήρηση όσο το δυνατό της ποιότητας των καρπών, απαιτούνται κατάλληλοι ακριβείς μετασυλλεκτικοί χειρισμοί (Hodges and Forney, 2003; Kalt, 2005; van der Vorst, 2011).

Με δεδομένα τα παραπάνω, παρουσιάζει πρακτικό ενδιαφέρον η εξέταση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού σε καρπούς που δέχτηκαν συγκεκριμένους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς καθώς και η μελέτη του μεταβολισμού του AsA στους καρπούς αυτούς. Οι μετασυλλεκτικοί χειρισμοί που επιλέχθηκαν έχουν όσο το δυνατό σχέση με πραγματικές συνθήκες που πιθανά δέχονται οι καρποί μετά τη συγκομιδή. Οι χειρισμοί αυτοί περιλαμβάνουν την αποθήκευση δίπλα ακριβώς στα φυτά υπό σκιά (όρισμένοι παραγωγοί αφήνουν τους καρπούς δίπλα στα θερμοκήπια ώστε να αποκτήσουν ομοιογενές χρώμα), αποθήκευση στους 10°C (προτεινόμενη θερμοκρασία αποθήκευσης), αποθήκευση στους 5°C (κοντά στη μέση θερμοκρασία οικιακού ψυγείου) (Kirkland *et al.*, 2009, Snowdon, 2010). Στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 1) αναγράφονται οι χειρισμοί που υποβλήθηκαν οι ένσπερμοι και παρθενοκαρπικοί καρποί.

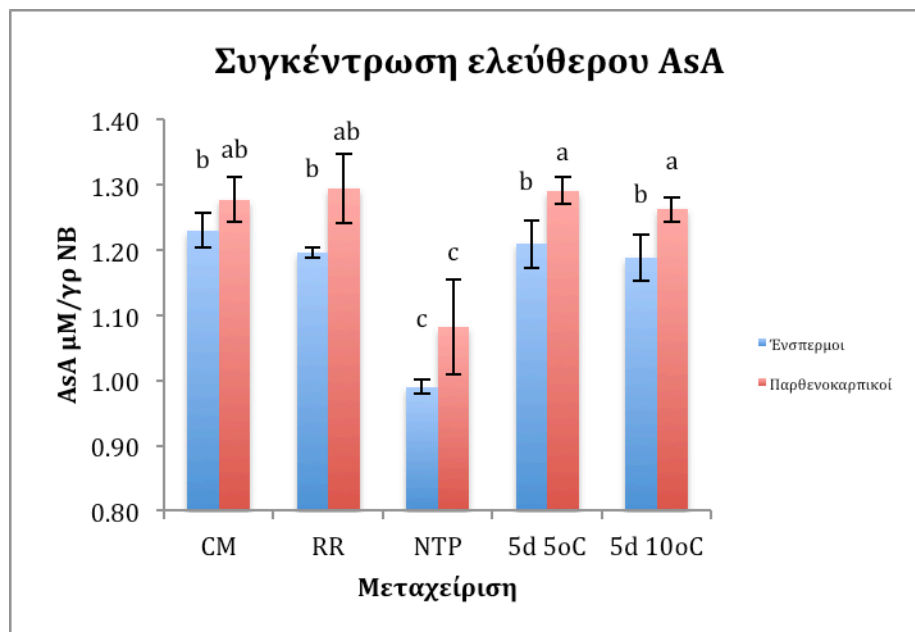
Χειρισμός	Συνομογραφία
Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης	CM
Καρποί CM που αφέθησαν να ωριμάσουν πέντε ημέρες κανονικά επάνω στα φυτά (ώριμοι κόκκινοι)	RR
Καρποί CM που διατηρήθηκαν κομμένοι πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά του πειράματος υπό σκιά	NTP
Καρποί CM που τοποθετήθηκαν πέντε μέρες στους 5°C σε σκότος	5d5°C
Καρποί CM που τοποθετήθηκαν πέντε μέρες στους 10°C σε σκότος	5d10°C

Πίνακας 1: Χειρισμοί πειράματος

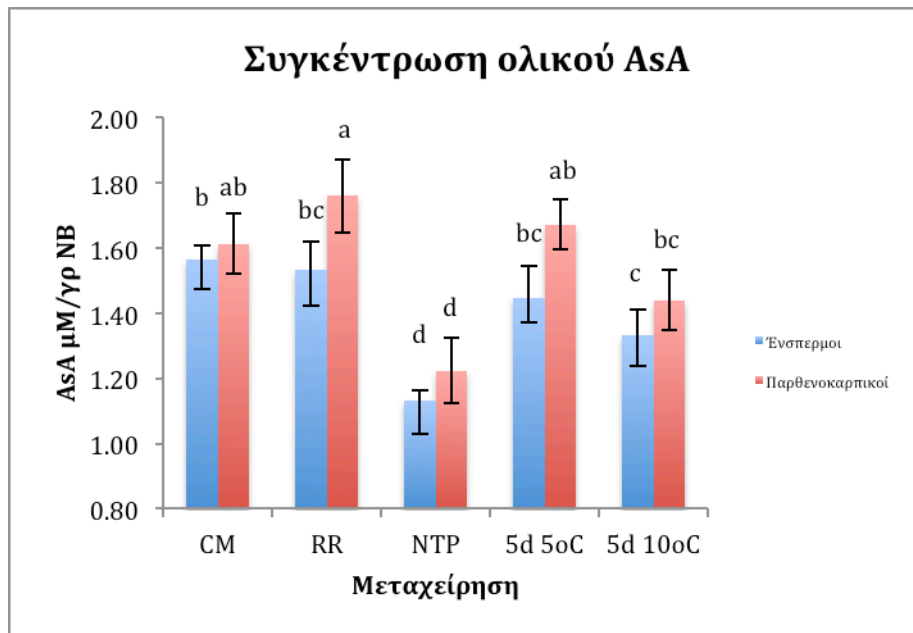
4.2 Αποτελέσματα

Για την για τη μελέτη των ενζύμων των έσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας τύπου "cherry", κατά τη μετασυλλεκτική τους ζωή υπό διαφορετικές συνθήκες, μελετήθηκαν η συγκέντρωση του AsA, η δραστικότητα της APX και της DHAR, ενώ εκτιμήθηκε το πλήθος των μεταγραφημάτων των γονιδίων που κωδικοποιούν τα ισοένζυμα των GME, GalLDH, APX, MDHAR, DHAR, GR.

4.2.1 Η συγκέντρωση AsA



Διάγραμμα 23: Η συγκέντρωση του ελεύθερου AsA σε έσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.



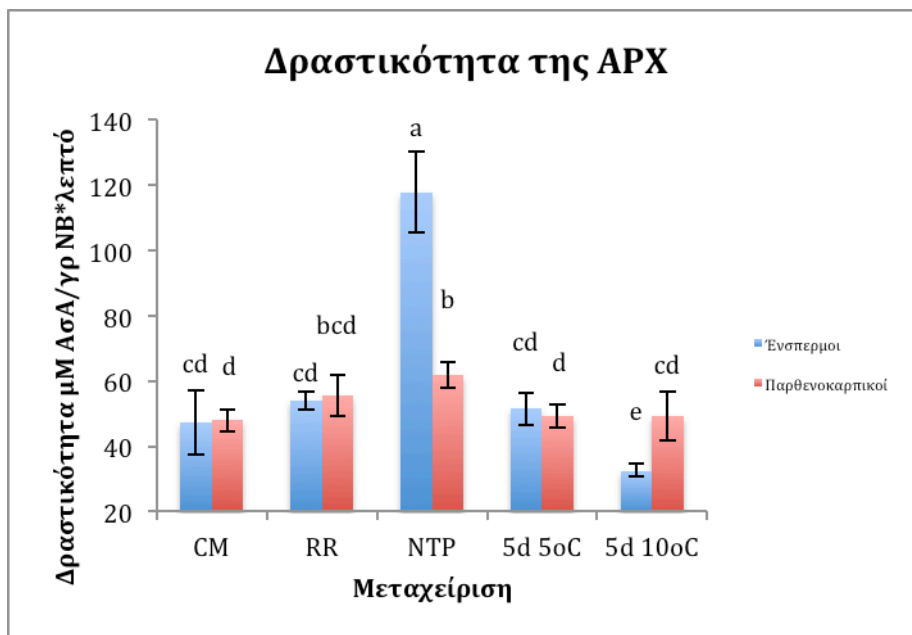
Διάγραμμα 24: Η συγκέντρωση του ολικού AsA σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Η συγκέντρωση του ανηγμένου AsA παρέμεινε ουσιαστικά σταθερή κατά την αποθήκευση υπό ψύξη (5°C και 10°C) σε σύγκριση με τους καρπούς που παρέμειναν να ωριμάσουν επάνω στα φυτά. Αντιθέτως, σημαντική μείωση των επιπέδων του αντιοξειδωτικού, συγκριτικά με το μάρτυρα (RR), βρέθηκε στους καρπούς που παρέμειναν να ωριμάσουν κομμένοι δίπλα στα φυτά (NTP).

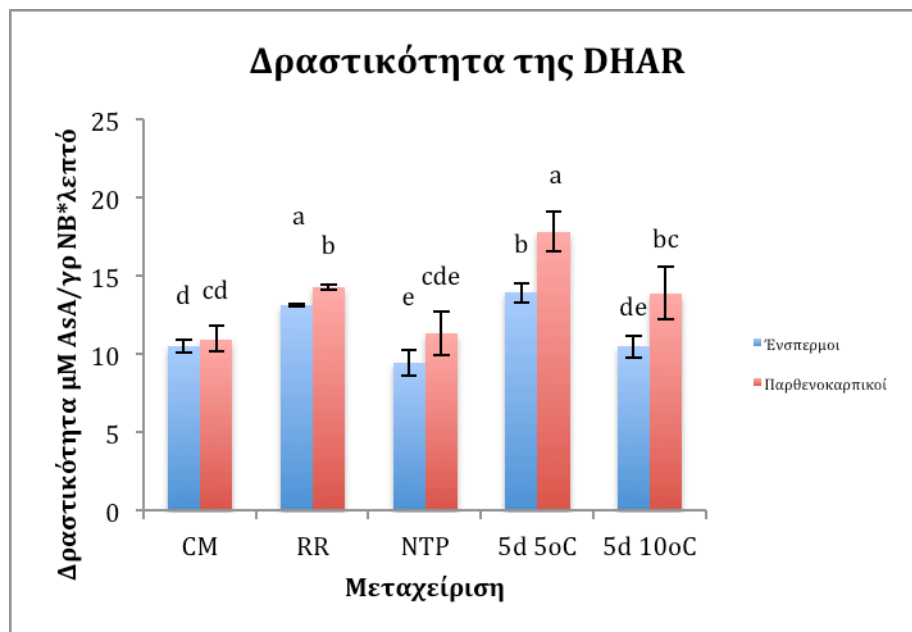
Η συγκέντρωση του ολικού AsA παρέμεινε ουσιαστικά σταθερή μετά από αποθήκευση στους 5°C, παρουσίασε μικρή μείωση στους καρπούς που αποθηκεύτηκαν στους 10°C, ενώ παρουσίασε σημαντική μείωση περίπου 30% στους καρπούς που παρέμειναν να ωριμάσουν κομμένοι δίπλα στα φυτά.

Οι ένσπερμοι και παρθενοκαρπικοί καρποί, παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά με μικρές διαφορές. Οι παρθενοκαρπικοί καρποί είχαν μεγαλύτερη συγκέντρωση AsA από τους ένσπερμους σε όλες τις περιπτώσεις (Διάγρ. 23,24).

4.2.2 Δραστικότητα της APX και της DHAR



Διάγραμμα 25: Δραστικότητα της APX σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφήθηκαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο ± τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.



Διάγραμμα 26: Δραστικότητα της DHAR σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφήθηκαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου),

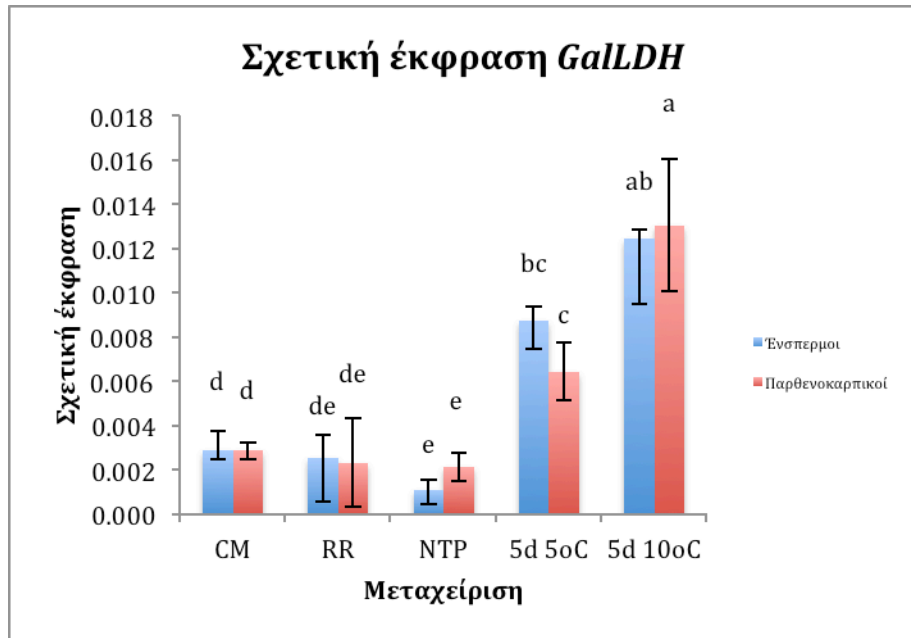
5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Η δραστικότητα της APX παρουσίασε μικρή διακύμανση σε όλες τις επεμβάσεις με εξαιρέσεις τον χειρισμό NTP στους ένσπερμους καρπούς όπου η δραστικότητα βρέθηκε σημαντικά αυξημένη και το χειρισμό 5d10°C όπου η δραστικότητα βρέθηκε σημαντικά μειωμένη.

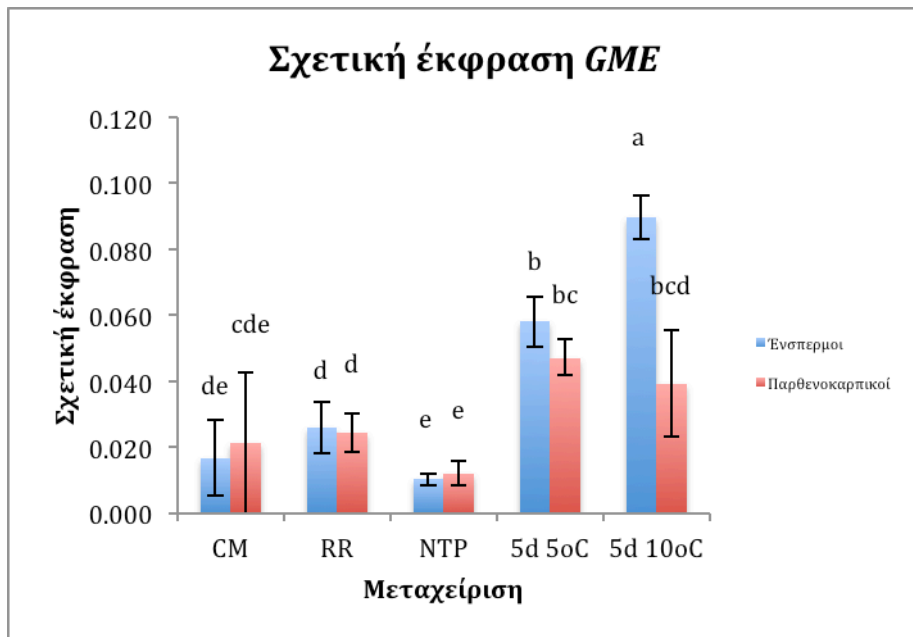
Αναφορικά με τη δραστικότητα της DHAR, οι ένσπερμοι και οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά σε όλους τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς. Οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσίασαν αυξημένη δραστικότητα της DHAR σε όλες τις επεμβάσεις που μελετήθηκαν αν και όχι πάντοτε στατιστικά σημαντική.

4.3 Μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του AsA

4.3.1 Σχετική έκφραση της *GalLDH* και της *GME*



Διάγραμμα 27: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του γονιδίου *GalLDH* σε ένσπερους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.



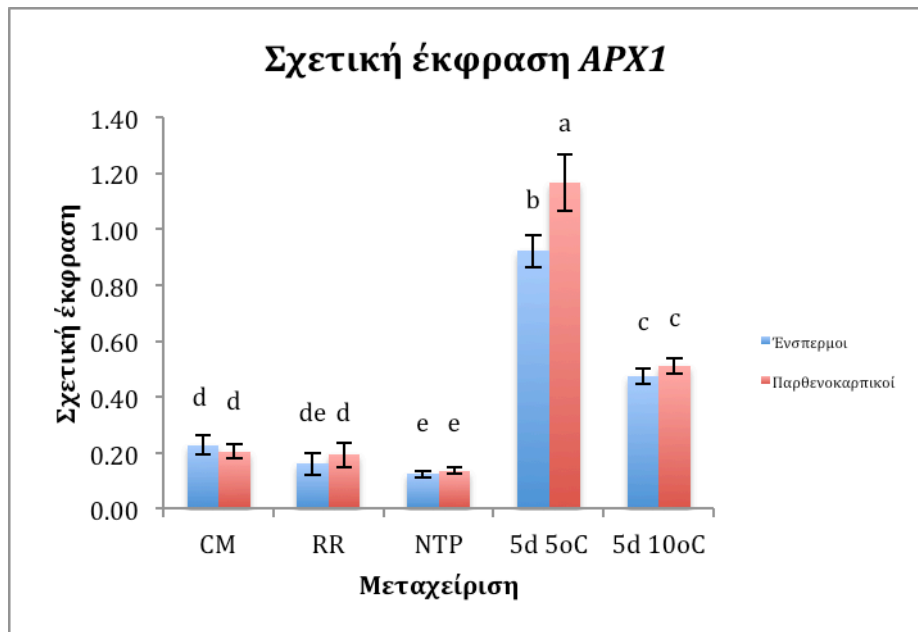
Διάγραμμα 28. Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του γονιδίου *GME* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Το πλήθος των μεταγραφημάτων της *GaLLDH* παρουσίασε παρόμοιο πρότυπο και στους ένσπερμους και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς. αλλά δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών σε όλες τις μετασυσπαστικές επεμβάσεις. Σημαντική αύξηση του πλήθους των μεταγραφημάτων βρέθηκε στους καρπούς που αποθηκεύτηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες η οποία ήταν υψηλότερη μετά από αποθήκευση των καρπών 10°C. Στατιστικά σημαντική μείωση του πλήθους των μεταγραφημάτων βρέθηκε στο χειρισμό NTP και στα δύο είδη καρπών.

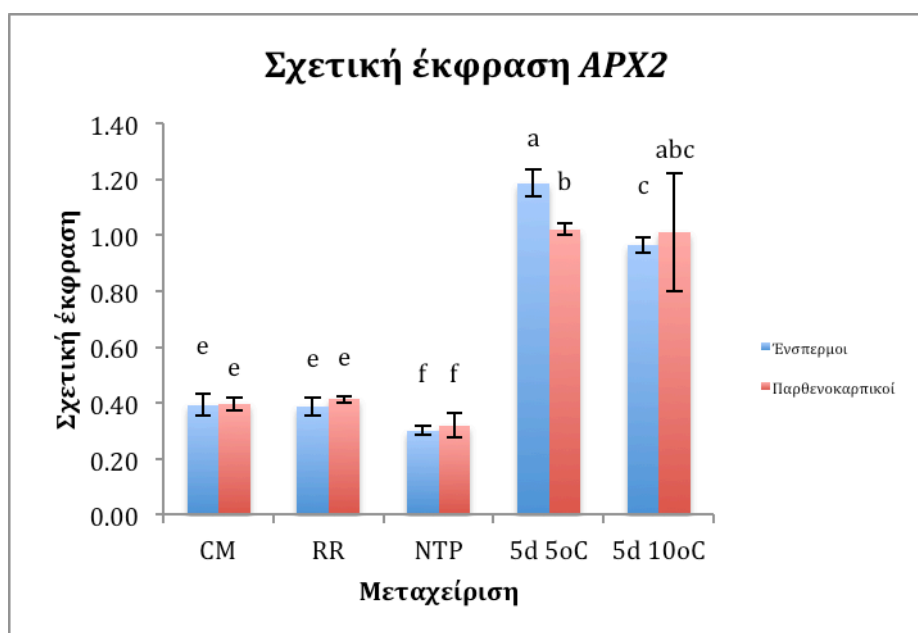
Το πλήθος των μεταγραφημάτων της *GME* παρουσίασε παρόμοιο πρότυπο και στους ένσπερμους και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς αλλά δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών σε όλες τις μετασυσπαστικές επεμβάσεις εκτός της επέμβασης 5d10°C. Στατιστικά σημαντική διαφορά του πλήθους των μεταγραφημάτων βρέθηκε στους καρπούς που αποθηκεύτηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες. Στατιστικά σημαντική μείωση του πλήθους των μεταγραφημάτων βρέθηκε στο χειρισμό NTP και στα δύο είδη καρπών.

4.4 Μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον καταβολισμό και την ανακύκλωση του AsA

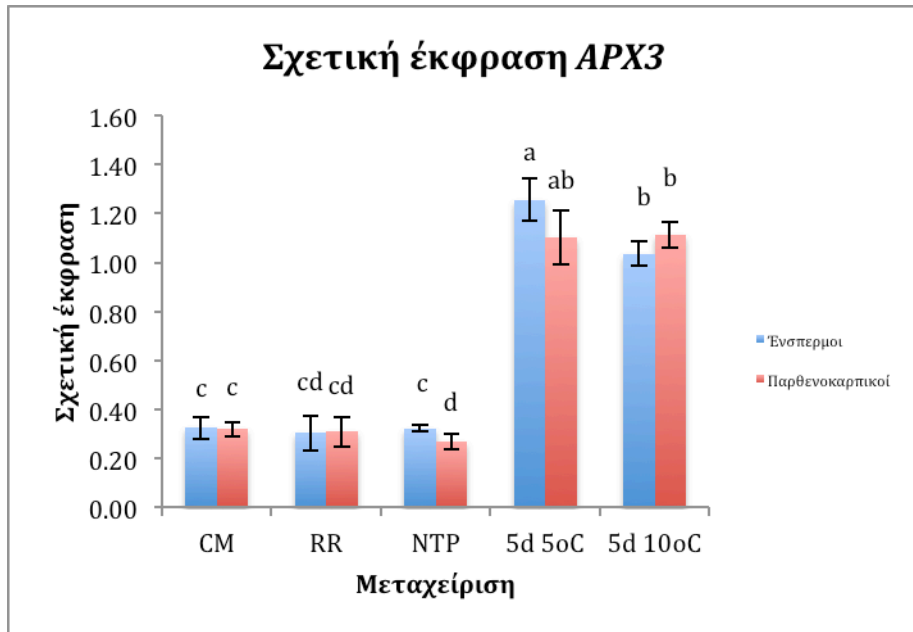
4.4.1 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της APX



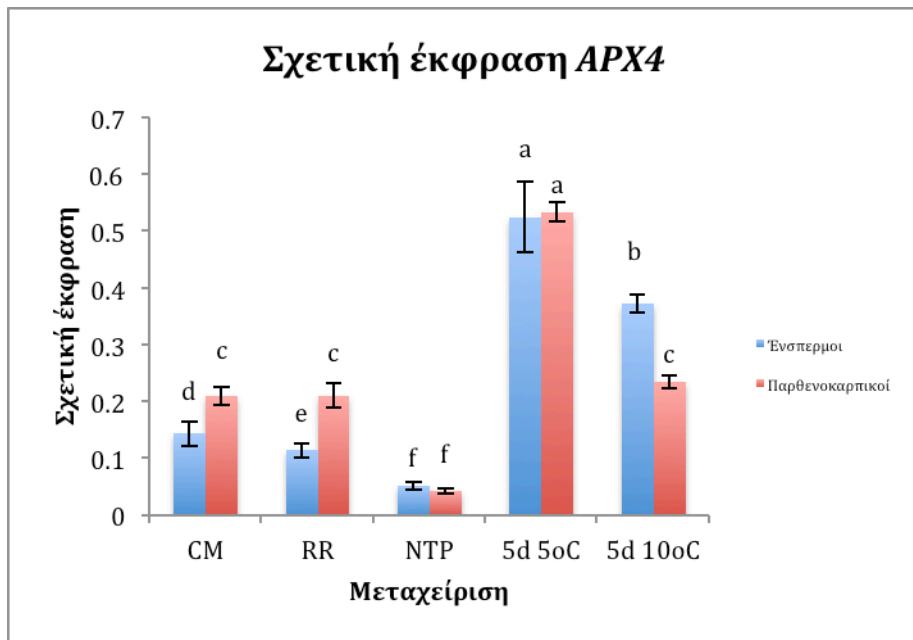
Διάγραμμα 29. Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του κυτοπλασματικού γονιδίου *APX1* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.



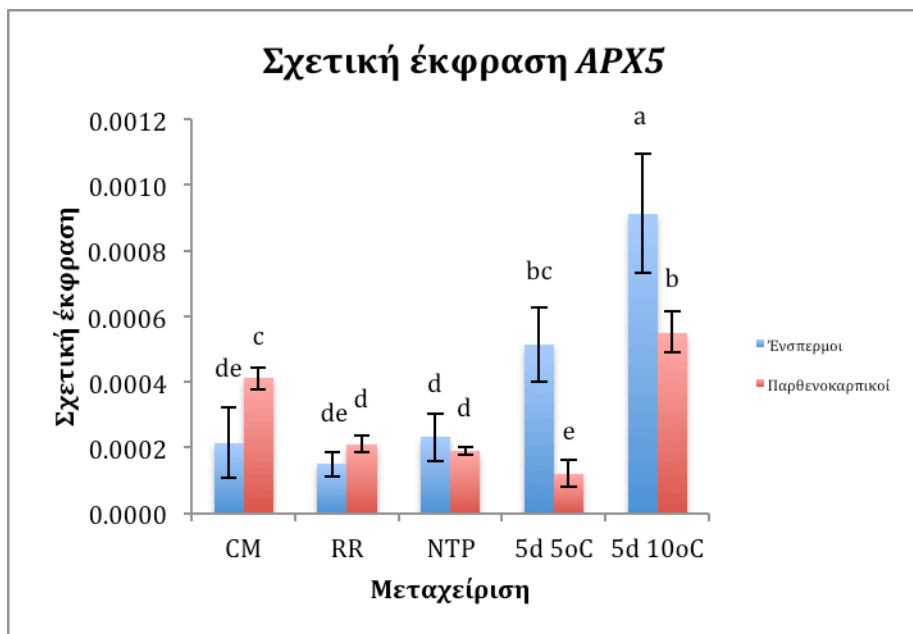
Διάγραμμα 30: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του κυτοπλασματικού γονιδίου *APX2* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.



Διάγραμμα 31: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του κυτοπλασματικού γονιδίου *APX3* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

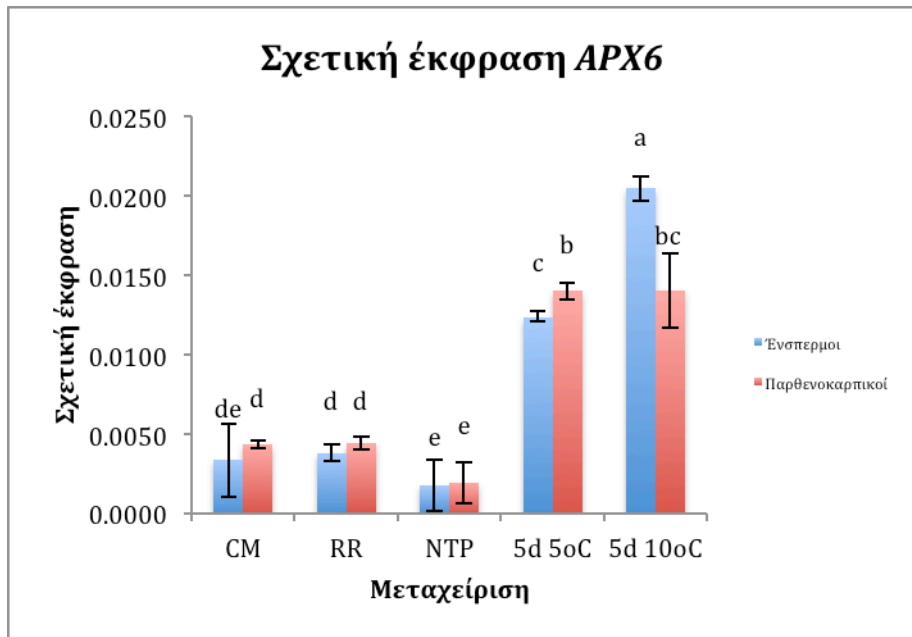


Διάγραμμα 32: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του κυτοπλασματικού γονιδίου *APX4* σε ένσπερμους και παρθενοκαρτικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

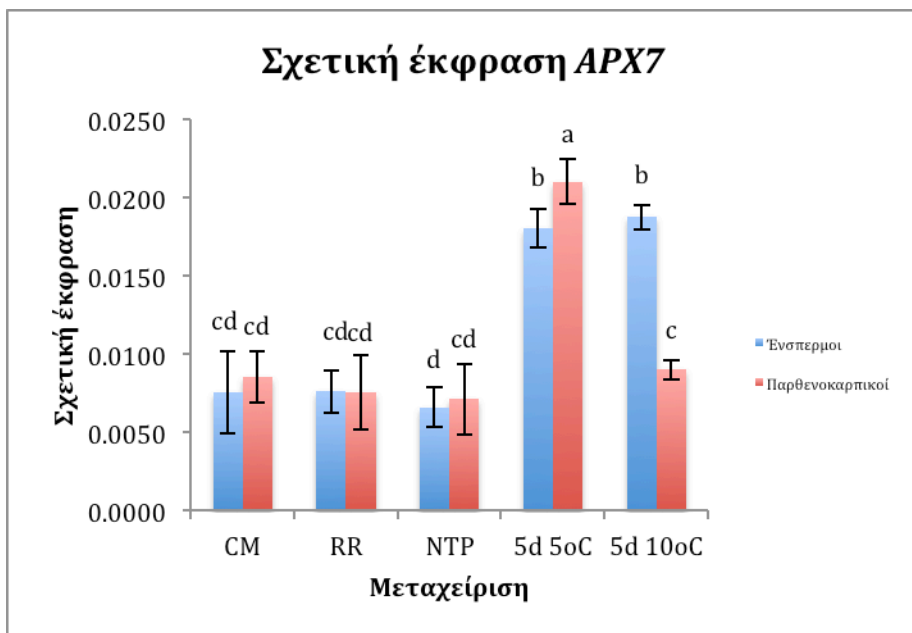


Διάγραμμα 33: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του κυτοπλασματικού γονιδίου *APX5* σε ένσπερμους και παρθενοκαρτικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε

ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.



Διάγραμμα 34: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του πλαστιδιακού γονιδίου *APX6* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

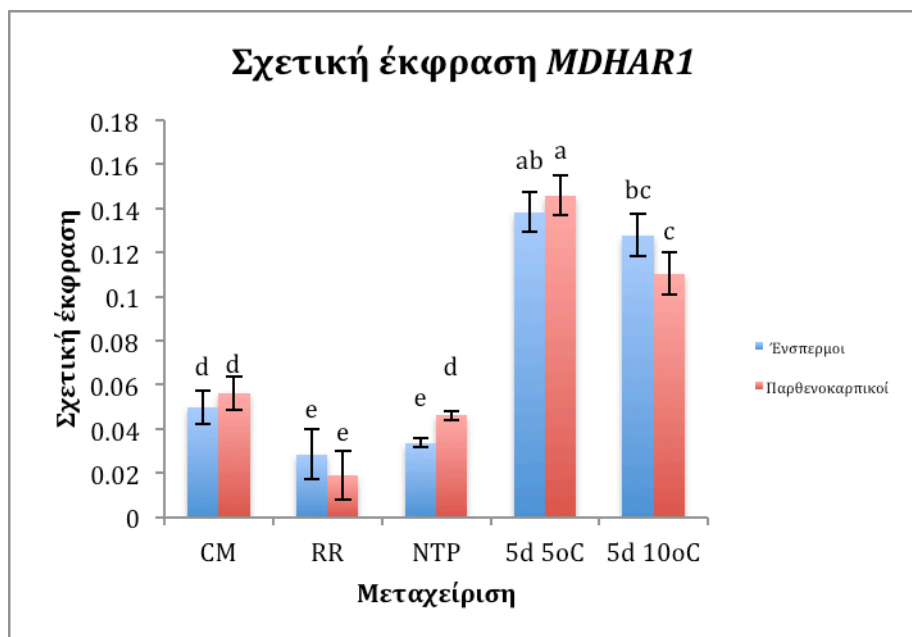


Διάγραμμα 35: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του πλαστιδιακού γονιδίου *APX7* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

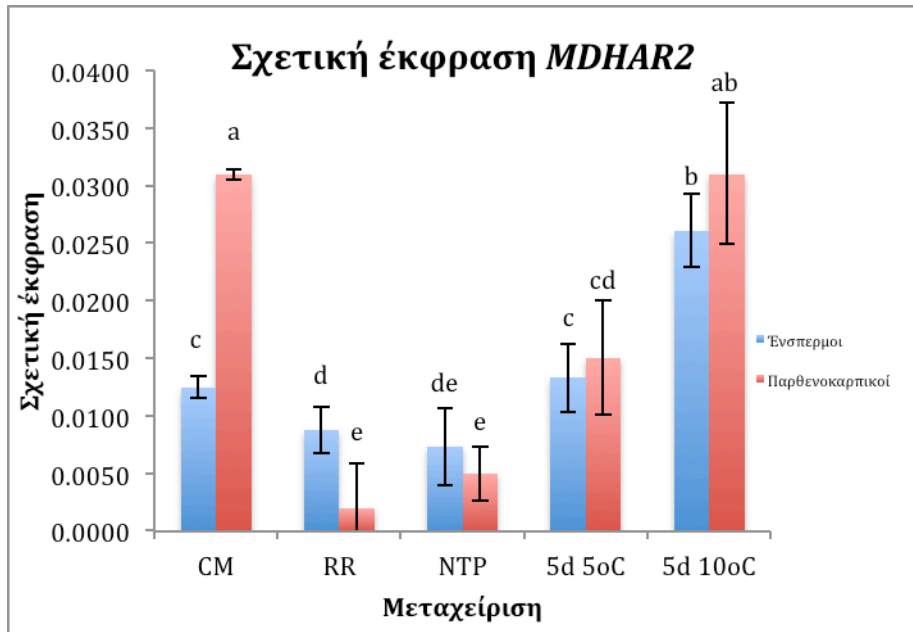
Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων των ισοενζύμων της APX των καρπών που δέχτηκαν μετασυλλεκτικούς χειρισμούς ήταν παρόμοιο στις περισσότερες περιπτώσεις. Ο χειρισμός με χαμηλές θερμοκρασίες φαίνεται ότι οδηγεί σε σημαντική αύξηση της έκφρασης του συνόλου των γονιδίων των ισοενζύμων της APX, ενώ η επίδραση αυτή ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις μεγαλύτερη στους 5°C από ότι στους 10°C. Αξιοσημείωτη ήταν η μειωμένη έκφραση της *APX5* στους παρθενοκαρπικούς καρπούς που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 5°C και η σχετικά μειωμένη έκφραση της *APX7* στους παρθενοκαρπικούς καρπούς που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία 10°C.

Τα αποτελέσματα της σχετικής έκφρασης στο πείραμα με τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς ήταν συγκρίσιμα με αυτά της πειραματικής ενότητας 1.

4.4.2 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της *MDHAR*



Διάγραμμα 36: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του κυτοπλασματικού γονιδίου *MDHAR1* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.



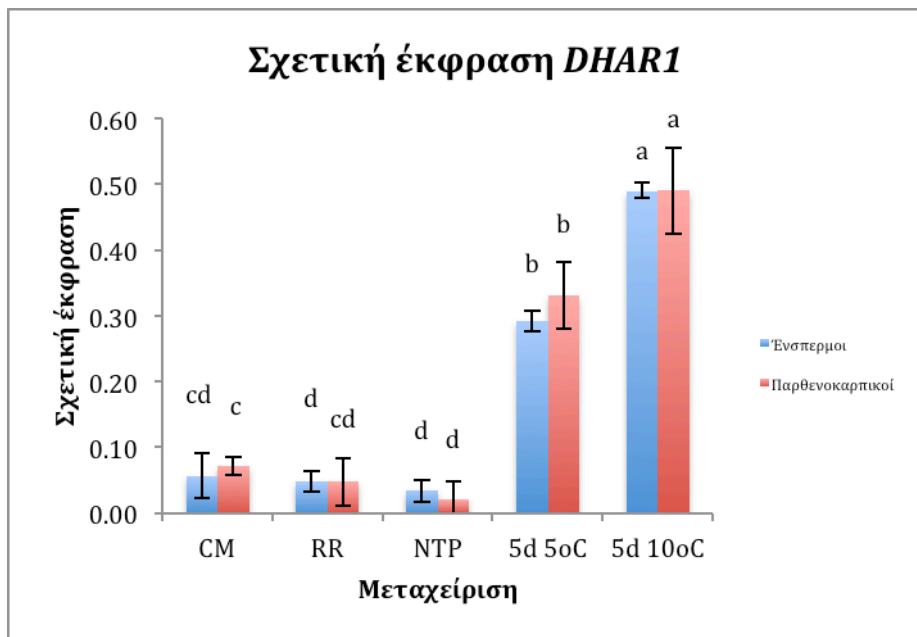
Διάγραμμα 37: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του πλαστιδιακού γονιδίου *MDHAR2* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων του ισοενζύμου *MDHAR1* παρουσίασε σημαντικές ομοιότητες με αυτό των περισσότερων γονιδίων των ισοενζύμων της *APX*. Η επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών ήταν σημαντική στους ένσπερμους και τους παρθενοκαρπικούς καρπούς, ενώ η έκφραση αυξήθηκε όσο χαμηλότερη ήταν η θερμοκρασία αποθήκευσης.

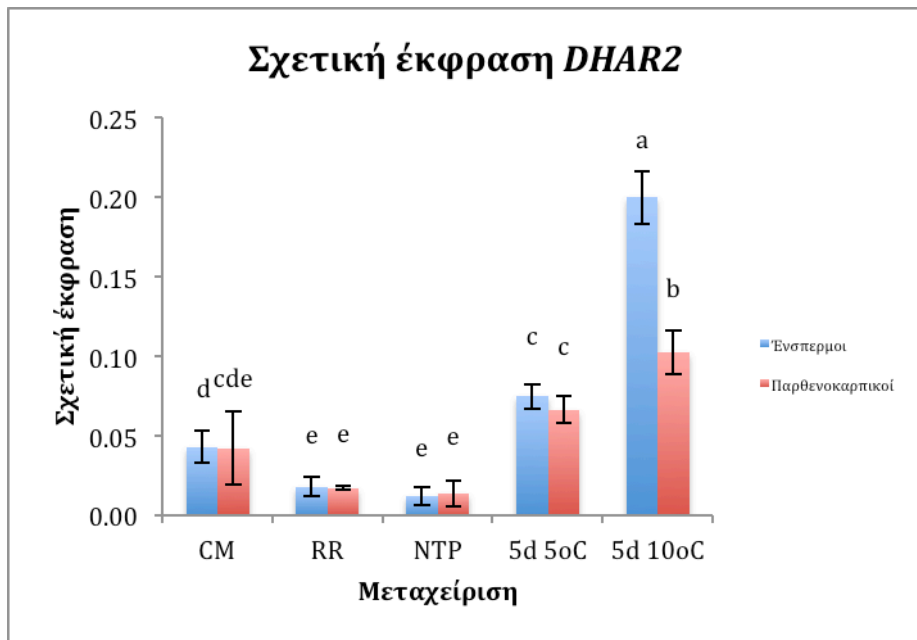
Η έκφραση της πλαστιδιακής *MDHAR2* παρουσίασε ορισμένες διαφορές σε σχέση με την *MDHAR1*, ενώ ορισμένες διαφορές βρέθηκαν και μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών. Στους ένσπερμους καρπούς η έκφραση του γονιδίου παρουσίασε μειωμένη διακύμανση με εξαίρεση την επέμβαση 5d10°C, όπου ανιχνεύτηκε σημαντικά αυξημένη έκφραση. Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς εκτός της κορυφής στην επέμβαση 5d10°C,

ανιχνεύτηκε και μία ακόμα κορυφή στο στάδιο CM, ενώ στο στάδιο RR ή έκφραση βρέθηκε σημαντικά μειωμένη.

4.4.3 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της *DHAR*



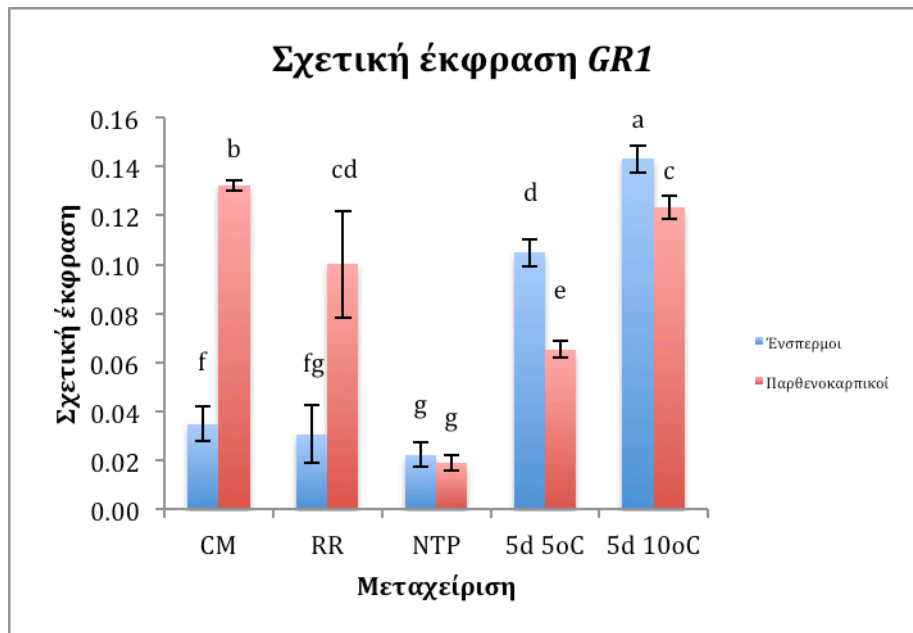
Διάγραμμα 38: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του κυτοπλασματικού γονιδίου *DHAR1* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.



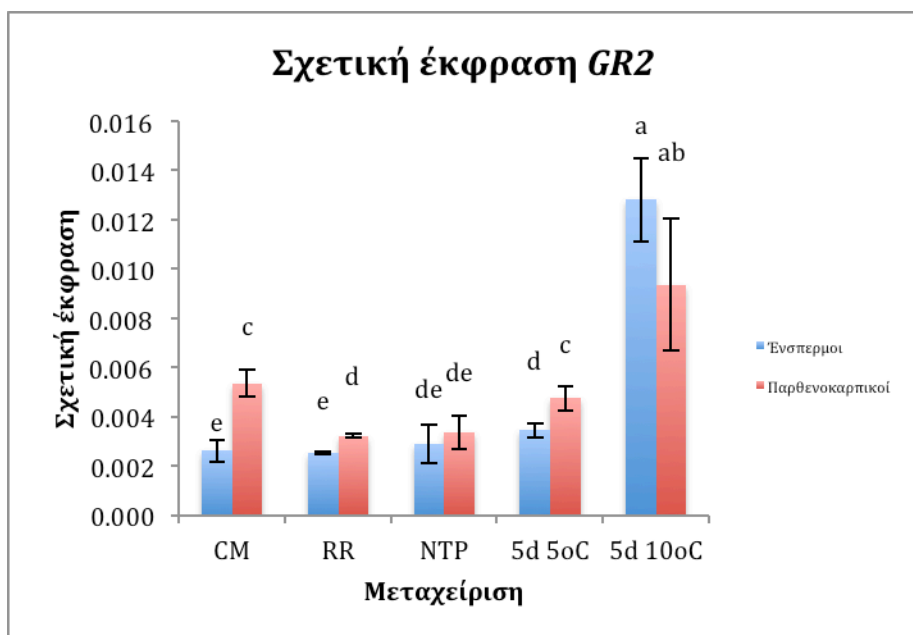
Διάγραμμα 39: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του πλαστιδιακού γονιδίου *DHAR2* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθηκαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Τόσο η *DHAR1* όσο και η *DHAR2* παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς. Αυξημένη βρέθηκε η έκφραση στους καρπούς που αποθηκεύτηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (μεγαλύτερη στην επέμβαση 5d10°C από τη 5d5°C), ενώ στους καρπούς που αφέθηκαν δίπλα στα φυτά να ωριμάσουν η έκφραση ήταν συγκριτικά μικρότερη από το μάρτυρα (RR).

4.4.4 Η σχετική έκφραση των ισοενζύμων της GR



Διάγραμμα 40: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του κυτοπλασματικού γονιδίου *GR1* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης, RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.



Διάγραμμα 41: Εκτίμηση πλήθους των μεταγραφημάτων του πλαστιδιακού γονιδίου *GR2* σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου "cherry" που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ή αποθηκεύτηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες μετά τη συγκομιδή στο στάδιο CM. CM- Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης,

RR-ώριμοι κόκκινοι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά για πέντε ημέρες, NTP-καρποί που αφέθησαν πέντε ημέρες δίπλα στα φυτά (στην ίδια θερμοκρασία χώρου), 5d5°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν στους 5°C για πέντε ημέρες, 5d10°C-καρποί που αποθηκεύτηκαν πέντε ημέρες στους 10°C. Οι μπάρες υποδηλώνουν μέσο όρο \pm τυπικό σφάλμα (SE) από τρεις βιολογικές επαναλήψεις.

Οι ένσπερμοι και παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσίασαν παρόμοιο πρότυπο έκφρασης της πλαστιδιακής *GR2* με μικρή διακύμανση στις περισσότερες επεμβάσεις αλλά με σημαντική αύξηση στο στάδιο 5d10°C. Αναφορικά με την έκφραση της κυτοπλασματικής *GR1*, στους ένσπερμους καρπούς βρέθηκε σημαντική επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών αποθήκευσης, η οποία οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης του γονιδίου (μεγαλύτερη έκφραση στη μεταχείριση 5d10°C). Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η έκφραση ήταν αυξημένη στα στάδια CM και RR, συγκρίσιμα με την επέμβαση 5d10°C. Στην επέμβαση 5d5°C η έκφραση ήταν σχετικά χαμηλότερη ενώ το ελάχιστο παρατηρήθηκε στην επέμβαση NTP (στην επέμβαση αυτή παρατηρήθηκε ελάχιστο στην έκφραση και στους ένσπερμους καρπούς).

4.5 Συζήτηση

4.5.1 Συγκέντρωση AsA και tAsA.

Ο καρπός της τομάτας είναι ευαίσθητος κατά την μετασυλλεκτική του ζωή και υποβαθμίζεται συγκριτικά με άλλους καρπούς γρηγορότερα τόσο σε χαμηλές όσο και στις υψηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης (Kallou, 1991; Bhatia, 2004). Μελετήθηκε η επίδραση της αποθήκευσης κομμένων για χρονικό διάστημα 5 ημερών σε συνθήκες ίδιες με αυτές που καλλιεργήθηκαν τα φυτά (NTP) (μέση θερμοκρασία ημέρας 33,4°C και νύκτας 24,2°C υπό σκιά), από χαμηλές θερμοκρασίες 5°C (5d5°C) και 10°C (5d10°C). Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να εντοπιστούν τυχόν επιδράσεις θερμοκρασιών αποθήκευσης των καρπών, που συνηθίζονται στην πράξη, στην λειτουργία του σύνθετου αντιοξειδοτικού συστήματος του AsA και οι τυχόν διαφορές μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών.

Η μελέτη της συγκέντρωσης ελεύθερου και ολικού AsA κατέδειξε σημαντική αρνητική επίδραση της αποθήκευσης καρπών δίπλα στα φυτά, εντός του θερμοκηπίου (NTP). Η μείωση αυτή ήταν της τάξης του 30-40 % σε σχέση με τους καρπούς που ωρίμασαν επάνω στα φυτά κατά το ίδιο χρονικό διάστημα, στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας. Η διατήρηση των καρπών σε χαμηλές θερμοκρασίες (5 και 10°C) προφυλάσσει σε σημαντικό βαθμό από την αποδόμηση του AsA τουλάχιστον για το χρονικό διάστημα που μελετήθηκε. Οι καρποί αυτοί δεν παρουσίασαν σημαντικές απώλειες ελεύθερου AsA ενώ υπήρχε κάποια επίδραση στα επίπεδα του ολικού AsA ιδίως μετά την αποθήκευση στους 10°C. Οι ένσπερμοι και οι παρθενοκαρπικοί καρποί δεν παρουσίασαν σημαντικές διαφορές στη συμπεριφορά τους σχετικά με τη συγκέντρωση τους σε AsA μετά από τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς. Συγκρίσιμα αποτελέσματα με αυτά της παρούσας μελέτης, αναφορικά με την διακύμανση της συγκέντρωσης AsA μετά από διατήρηση σε χαμηλές θερμοκρασίες, αναφέρονται από τους Stevens et al., 2008, Dong et al., (2013) στη τομάτα, Jin et al., (2011) στη φράουλα και από τους Tatsumi et al., (2006) στο αχλάδι. Οι Oms-Oliu et al., (2011) αναφέρουν μείωση της συγκέντρωσης του ολικού AsA στους καρπούς τομάτας "cherry" μετά από αποθήκευση τεσσάρων ημερών στους 18°C. Η επίδραση της καταπόνησης υψηλών θερμοκρασιών στην μείωση της συγκέντρωσης του AsA έχει αναφερθεί στο Arabidopsis (Volkov et al., 2006) και στο μήλο (Ma et al., 2008). Οι καρποί RR καθώς και οι καρποί NTP δέχτηκαν επίδραση των σχετικά υψηλών θερμοκρασιών του καλοκαιριού, από τα αποτελέσματα της μελέτης της

συγκέντρωσης του AsA, οι καρποί που ωρίμασαν επάνω στα φυτά ήταν σε θέση να αντεπεξέλθουν καλύτερα στις απώλειες του αντιοξειδωτικού σε σχέση με τους NTP στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας.

4.5.2 Μελέτη της πληθώρας των μεταγραφημάτων των γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό (αναβολισμό και καταβολισμό) του AsA.

Μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον αναβολισμό του AsA.

4.5.2.1 Σχετική έκφραση της *GalLDH* και της *GME*

Η αποθήκευση των καρπών σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών (5 και 10°C) οδήγησε σε σημαντική αύξηση της σχετικής έκφρασης του των γονιδίων του αναβολισμού του AsA που μελετήθηκαν. Η αποθήκευση στους 10°C οδήγησε σε μεγαλύτερη έκφραση της *GalLDH* και στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς και της ME στους ένσπερμους καρπούς. Η *GME* έχει συσχετιστεί με την αντοχή στις χαμηλές θερμοκρασίες, οι Zhang et al., (2011), αναφέρουν ότι φυτά τομάτας που υπερέκφραζαν την *GME*, επέδειξαν σημαντικά αυξημένη αντοχή σε καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών, ενώ η ίδια ερευνητική ομάδα αναφέρει ότι η έκφραση του γονιδίου αυξήθηκε σε συνθήκες καταπόνησης από χαμηλές θερμοκρασίες (4°C) για δέκα ημέρες. Σημαντική αύξηση της έκφρασης του γονιδίου της *GME* διαπιστώθηκε ότι προκλήθηκε και από έκθεση φύλλων ακτινιδίου σε θερμοκρασία 4°C για 48 ώρες (Li et al., 2013). Τα παραπάνω αποτελέσματα είναι σε συμφωνία με αυτά της παρούσας μελέτης. Οι Ioannidi et al., (2009) αναφέρουν ότι η έκφραση του γονιδίου της *GalLDH* αλλά και της *GME* στους καρπούς τομάτας στο στάδιο Mg δεν αυξήθηκαν σημαντικά μετά από αποθήκευση για 48 ώρες στους 4°C. Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν είναι σε συμφωνία με αυτά της παρούσας μελέτης, πιθανά τα οι ώριμοι κόκκινοι καρποί αντιδρούν διαφορετικά από τους καρπούς στο στάδιο Mg ενώ επίσης υπάρχει η πιθανότητα της εκκίνησης της αντίδρασης στην καταπόνηση που σχετίζεται με τη βιοσύνθεση του AsA, να εκκινεί μετά τις 48 ώρες.

Οι Ioannidi et al., (2009) αναφέρουν ότι η πλειοψηφία των γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση του AsA, μειώνουν την έκφραση τους μετά από επίδραση θερμοκρασίας 40°C για 48 ώρες στη τομάτα. Παρόμοια συμπεριφορά με τους καρπούς του παραπάνω πειράματος, παρατηρήθηκε και τους καρπούς NTP οι οποίοι φαίνεται ότι ήταν σε μεγαλύτερο βαθμό ευαίσθητοι στην επίδραση της καταπόνησης (από θερμοκρασίες που έφταναν μέχρι τους 35°C) από τους καρπούς RR που δέχτηκαν τις ίδιες θερμοκρασίες αλλά ωρίμασαν επάνω στα φυτά.

Μελέτη έκφρασης γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του AsA.

4.5.3 Σχετική έκφραση της APX

Τα γονίδια των ισοενζύμων της APX παρουσίασαν σημαντική αύξηση της έκφρασης μετά από αποθήκευση των καρπών σε χαμηλές θερμοκρασίες (5 και 10°C) (Πίνακες 29-35). Το ένζυμο έχει συνδεθεί, με πείραμα υπερ-έκφρασης της πλαστιδιακής APX6, με την αντοχή φυταρίων τομάτας σε χαμηλές θερμοκρασίες (Duan et al., 2012).

Αύξηση του πλήθους των μεταγραφημάτων των γονιδίων σε κάποια ισοένζυμα της APX παρατηρήθηκε και σε καρπούς αχλαδιού που αποθηκεύτηκαν υπό συνθήκες ελεγχόμενης ατμόσφαιρας τις πρώτες ημέρες της αποθήκευσης (Cascia et al., 2013) χωρίς να παρατηρηθεί αντίστοιχη αύξηση στη δραστηριότητα του ενζύμου. Τα παραπάνω ευρήματα καταδεικνύουν τον πολύπλοκο μηχανισμό ρύθμισης του αντιοξειδωτικού συστήματος του AsA υπό συνθήκες καταπόνησης ο οποίος εκτός των άλλων φαίνεται πως επηρεάζεται και από αλληλεπιδράσεις με άλλα αντιοξειδωτικά ένζυμα όπως η SOD (Lee et al., 2010).

Η σχετική έκφραση των περισσότερων ισοενζύμων της APX στους καρπούς που αποθηκεύτηκαν στους 5°C ήταν μεγαλύτερη σε σχέση με τους καρπούς που αποθηκεύτηκαν στους 10°C. Το εύρημα παρατηρήθηκε σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό σε αμφότερους τους ένσπερμους και τους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Η αύξηση της έκφρασης όλων των ισοενζύμων της APX που παρατηρήθηκε στους καρπούς που αποθηκεύτηκαν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, πιθανά προκαλείται από αντίδραση στην καταπόνηση η οποία παρατηρήθηκε εκτός από τους 5°C και στους 10°C. Επίσης αναφέρεται ότι σε ακραίες θερμοκρασίες, η παραγωγή ROS στα φυτά αυξάνεται σημαντικά (Mitler et al., 2004). Η μεγαλύτερη σχετική έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων της APX στην επέμβαση 5d5°C συγκριτικά με την 5d10°C, πιθανά υποδηλώνει ότι η καταπόνηση καθώς και η παραγωγή ROS ήταν μεγαλύτερη στους 5°C από ότι στους 10°C.

Αποθήκευση σε υψηλές σχετικά θερμοκρασίες των καρπών που αποθηκεύτηκαν δίπλα στα φυτά (NTP) προκάλεσαν μικρή σχετικά μείωση ή συγκρίσιμη έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων της APX σχετικά με τον μάρτυρα (RR). Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι Panchuk et al., (2002) στο *Arabidopsis*, ενώ στο ίδιο φυτό οι Koussevitzky et al., (2008), αναφέρουν μικρές αυξομειώσεις στην έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων της APX

ανάμεσα στον μάρτυρα και σε φυτά που δέχτηκαν επίδραση θερμοκρασίας 42°C για χρόνο μέχρι 48 ώρες. Μείωση της έκφρασης κάποιων ισοενζύμων της APX αναφέρουν και οι Ma et al., (2008) μετά τις τέσσερις πρώτες ώρες έκθεσης φύλλων μηλιάς σε θερμοκρασία 40°C. Η έκφραση των ισοενζύμων της APX που βρέθηκε στο φυτό της τομάτας στη παρούσα μελέτη ακολούθησε συγκρίσιμο πρότυπο αντίδρασης σε σχέση με τα ευρήματα των παραπάνω μελετών.

Οι ένσπερμοι και οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσίασαν επιμέρους διαφορές στην αντίδραση τους αναφορικά με την έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων της APX, κυρίως στη θερμοκρασία αποθήκευσης 10°C. Οι παραπάνω διαφορές πιθανών υποδηλώνουν ότι οι παρθενοκαρπικοί καρποί καταπονούνται λιγότερο από τους ένσπερμους στη δεδομένη θερμοκρασία αποθήκευσης.

4.5.4 Σχετική έκφραση της των γονιδίων των ενζύμων που σχετίζονται με την ανακύκλωση του AsA

Σημαντική αύξηση της έκφρασης όλων των γονιδίων που σχετίζονται με την ανακύκλωση του AsA στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς, παρατηρήθηκε μετά από επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών αποθήκευσης (Πίνακες 36-41). Η έκφραση των γονιδίων ήταν στις περισσότερες περιπτώσεις μεγαλύτερη στη μεταχείριση 5d10°C από την 5d5°C. Στη μεταχείριση NTP, παρατηρήθηκε έκφραση των γονιδίων συγκρίσιμη ή ελαφρώς χαμηλότερη έκφραση σε σχέση με τον μάρτυρα (RR). Σημαντική διαφορά διαπιστώθηκε μεταξύ των ένσπερμων και των παρθενοκαρπικών καρπών διαπιστώθηκε στην έκφραση της GR1, η έκφραση του γονιδίου αυτού ήταν στις περισσότερες μεταχειρίσεις σημαντικά μεγαλύτερη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Οι Cascia et al., (2013) αναφέρουν αύξηση της έκφρασης της MDHAR και αυξομοίωση της έκφρασης της DHAR μετά από αποθήκευση αχλαδιών για πέντε ημέρες στους 0,5°C. Επιπλέον οι Li et al., (2010) αναφέρουν ότι υπερέκφραση της MDHAR οδήγησε σε αύξηση της αντοχής της τομάτας στην έκθεση σε χαμηλές θερμοκρασίες. Αύξηση της έκφρασης μετά από επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών σε φύλλα μπιζελιού αναφέρουν οι Stevens et al., (1997), ενώ οι Shu et al., (2011) αναφέρουν ότι σίγαση του γονιδίου της πλαστιδιακής GR, οδηγεί σε αύξηση της ευαισθησίας της τομάτας σε καταπόνηση από χαμηλές θερμοκρασίες. Είναι γνωστό ότι τα αντιοξειδωτικά συστήματα αντιδρούν υπό συνθήκες θερμοκρασιακής καταπόνησης (Suzuki and Mittler, 2006). Τα

αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν ότι το σύστημα του AsA αντιδρά με αύξηση της έκφρασης της πλειοψηφίας των γονιδίων υπό καταπόνηση από χαμηλές θερμοκρασίες. Αντίθετα με τις μεταχειρίσεις με χαμηλές θερμοκρασίες, στην μεταχείριση NTP δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές στην έκφραση των γονιδίων των ενζύμων που εμπλέκονται στην ανακύκλωση του AsA σε σχέση με τον μάρτυρα (RR), ενώ η έκφραση ήταν τις περισσότερες φορές σημαντικά μικρότερη από το στάδιο CM. Η παρατήρηση αυτή οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η έκφραση των γονιδίων αυτών πιθανά εξαρτάται σε σημαντικότερο βαθμό από τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος ενώ το γεγονός της απομάκρυνσης από το φυτό φαίνεται να παίζει δευτερεύοντα ρόλο.

4.5.5 Δραστικότητα της APX και της DHAR

Η δραστικότητα της APX δεν παρουσίασε σημαντική διακύμανση δύο εξαιρέσεις: την αυξημένη δραστικότητα στην επέμβαση NTP των ένσπερμων καρπών όπου βρέθηκε σημαντική αύξηση της δραστικότητας και τη 5d10°C όπου σημειώθηκε μειωμένη δραστικότητα (Πίνακας 25). Η αυξημένη δραστικότητα στους καρπούς που δέχτηκαν την επέμβαση NTP πιθανά συνδέεται με τα μειωμένα επίπεδα AsA στους καρπούς αυτούς. Παρόλο που η δραστικότητα βρέθηκε μειωμένη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς σε σχέση με τους ένσπερμους, και σε αυτή τη περίπτωση ήταν σχετικά αυξημένη σε σχέση με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Η APX είναι ένζυμο που συνδέεται άμεσα με την άμυνα κατά των ενεργών μορφών οξυγόνου (ROS) που παράγονται σε καταστάσεις καταπόνησης από έκθεση σε υψηλές θερμοκρασίες, η αύξηση της δραστικότητας πιθανά συνδέεται με την αυξημένη ανάγκη για αντιοξειδωτική προστασία στις συνθήκες αυτές (Koussevitzky et al., 2008). Σημαντική αύξηση της δραστικότητας της APX αναφέρουν μετά από σύντομη επίδραση θερμοκρασίας 34°C αναφέρεται και σε φύλλα *Arabidopsis* (Panchuk et al., 2002). Στο ίδιο φυτικό είδος οι Koussevitzky et al., (2008) αναφέρουν ότι ενώ η ποσότητα πρωτεΐνης της APX ήταν μεγαλύτερη στα φυτά μάρτυρες, η δραστικότητα της APX ήταν σημαντικά μεγαλύτερη στα φυτά που δέχτηκαν επίδραση θερμοκρασίας 42°C για 48 ώρες.

Μικρή επίδραση στη δραστικότητα της APX μετά από επίδραση θερμοκρασιών 5 °C και 10°C για επτά ημέρες βρέθηκε στους καρπούς φράουλας (Jin et al., 2011) αλλά και μετά από επίδραση θερμοκρασίας 0°C για πέντε ημέρες στο αχλάδι (Cascia et al., 2013). Τα παραπάνω ευρήματα έρχονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης.

Η σχετική αναντιστοιχία που παρατηρήθηκε στις μεταχειρίσεις του πειράματος μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων των ισοενζύμων της APX και της δραστικότητας του ενζύμου πιθανά οφείλεται στο γεγονός ότι τα κυτοπλασματικά ισοένζυμα υπόκεινται σε μεταμεταφραστική τροποποίηση (Shigeoka et al., 2002). Επίσης σε πείραμα εύρεσης της optimum θερμοκρασίας δραστικότητας αντιοξειδωτικών ενζύμων στο αχλάδι, αναφέρεται ότι η APX αυξάνει τη δραστικότητα της μέχρι τους 50°C παρουσιάζοντας αυξημένη, σε σχέση με τα άλλα ένζυμα που μελετήθηκαν, αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες (Zou et al., 2012). Πιθανόν αντίστοιχο πρότυπο παρουσιάζει και η δραστικότητα της APX στη τομάτα.

Η δραστικότητα της DHAR παρουσίασε μέγιστο μετά την επέμβαση 5d5°C και ελάχιστο μετά την επέμβαση NTP στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς (Πίνακας 26). Η δραστικότητα του ενζύμου όπως και στην περίπτωση της APX, δεν ακολουθεί την έκφραση των γονιδίων των ισοενζύμων. Παρόλα αυτά οι καρποί που δέχτηκαν επέμβαση 5d5°C παρουσίασαν συγκριτικά αυξημένη δραστικότητα ενώ οι καρποί που παρέμειναν αποθηκευμένοι δίπλα στα φυτά (NTP) παρουσίασαν την ελάχιστη δραστικότητα υποδηλώνοντας κάποια επίδραση καταπόνησης χαμηλών και υψηλών θερμοκρασιών. Η επίδραση των επεμβάσεων στη δραστικότητα του ενζύμου ήταν σημαντικά μικρότερη σε σχέση με την επίδραση που παρατηρήθηκε στην έκφραση των γονιδίων της DHAR.

Η δραστικότητα της DHAR μειώθηκε σημαντικά σε κύτταρα καπνού όταν εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 35°C (Locato et al., 2009). Μιτοχόνδρια από κύτταρα σόγιας που εκτέθηκαν σε θερμοκρασία 5°C παρουσίασαν στατιστικά σημαντική αύξηση της δραστικότητας της DHAR (Sun et al., 2011). Στα φύλλα δύο ποικιλιών σπανακιού η δραστικότητα της DHAR δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και μετά από αποθήκευση στους 10°C για 5 ημέρες (Hodges and Forney, 2003).

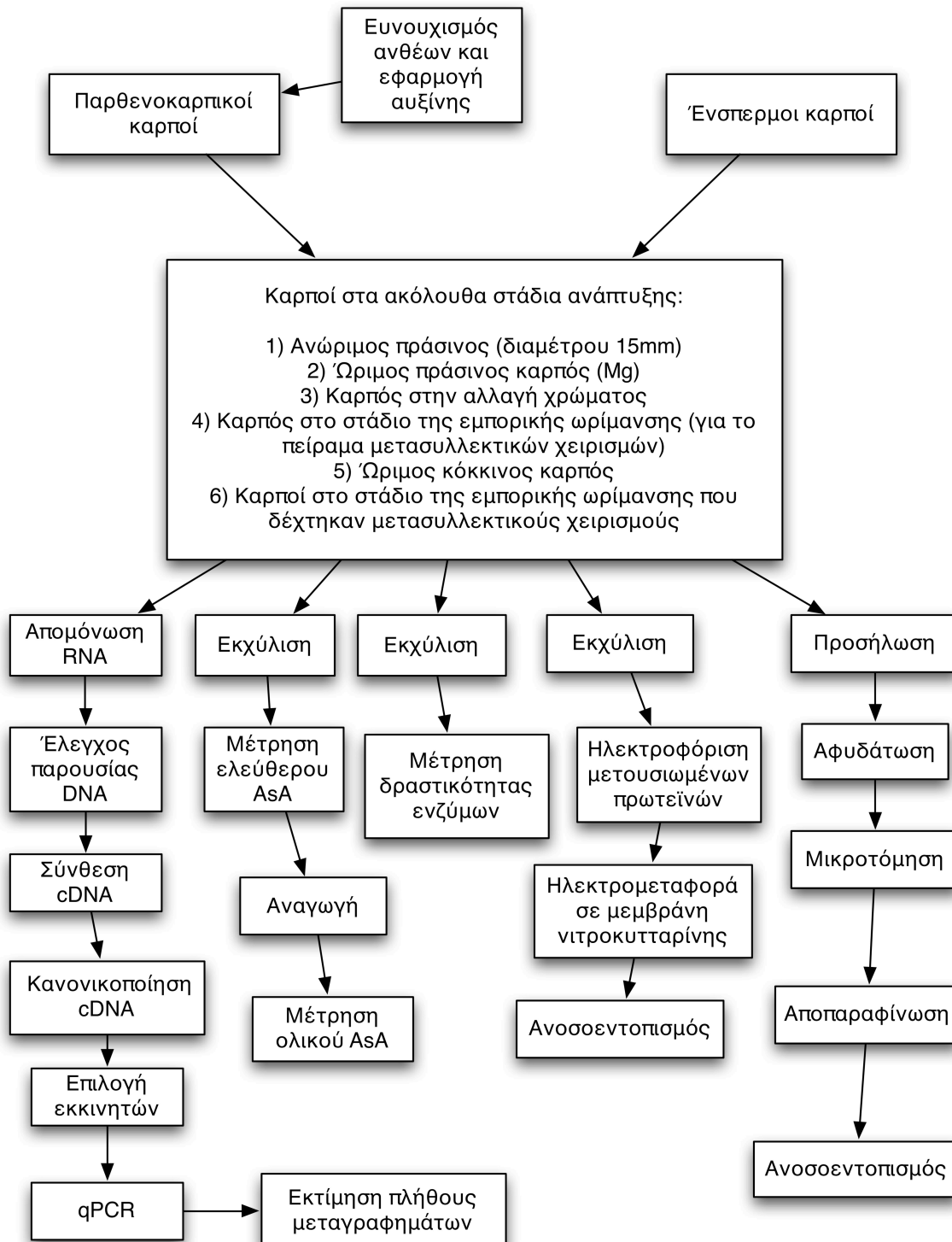
4.5.6 Συμπέρασματα

Η αποκοπή των καρπών από τα φυτά και η τοποθέτησή τους στις ίδιες συνθήκες με τους καρπούς επί των φυτών είχε σημαντική επίδραση επί της φυσιολογίας των καρπών.

Η αποθήκευση των καρπών σε χαμηλές θερμοκρασίες επάγει την μεταγραφή γονιδίων που σχετίζονται με το μεταβολισμό του ASA.

Το συμπέρασμα που εξάγεται από τα παραπάνω είναι ότι το αντιοξειδωτικό σύστημα του AsA είναι ευαίσθητο στους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς.

5. Υλικά και μέθοδοι



Σχήμα 8: Γενικό σχήμα των διαδικασιών του πειράματος.

5.1.1 Το φυτικό υλικό

Στην μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν ένσπερμοι και άσπερμοι καρποί τομάτας τύπου cherry του υβριδίου Conchita (*Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme* cv. Conchita F1; de Ruiter seeds, Melbourne Australia). Πρόκειται για πρώιμο υβρίδιο που συγκομίζεται με ταξικαρπία. Κάθε ταξικαρπία μπορεί να φέρει 12 με 16 καρπούς. Οι καρποί της Conchita είναι λαμπεροί κόκκινοι με μέσο βάρος 16-18gr. Η ανάπτυξη των φυτών πραγματοποιήθηκε στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών την καλλιεργητική περίοδο Ιανουαρίου-Μαΐου. Οι μέσες θερμοκρασίες ήταν 12.9 ± 1.9 και 23.9 ± 4.4 °C (ημέρα και νύκτα αντίστοιχα) κατά τη χειμερινή περίοδο (Ιαν.-Φεβρ.) και 15.7 ± 2.0 με 26.6 ± 4.3 °C την ανοιξιάτικη περίοδο (Μαρ.-Μάιος). Η ηλιακή ακτινοβολία κυμάνθηκε μεταξύ 700–1350 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (χειμώνας) και 700–1400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR (άνοιξη). Τα προβλαστημένα φυτά μεταφυτεύτηκαν στο θερμοκήπιο τον Ιανουάριο. 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 (ευνουχισμός). Ακολούθησε ψεκασμός του στίγματος με κατάλληλη ορμόνη και το άνθος σημάνθηκε με ταμπελάκι όπου αναγραφόταν η ημερομηνία επέμβασης. Όταν οι καρποί έφτασαν στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης συγκομίστηκαν. Η ορμόνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Ortomone (Σπύρου, Αθήνα Ελλάδα) με δραστική ουσία το β-ναφθόξυοξικό οξύ σε συγκέντρωση 50ppm. Οι άσπερμοι και ένσπερμοι καρποί συγκομίστηκαν σε 5 διαφορετικά στάδια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη τους: ανώριμοι πράσινοι καρποί διαμέτρου 1,5cm (25 ημέρες μετά την άνθηση-15mm), ώριμοι πράσινοι (38 ημέρες μετά την άνθηση-Mg), καρποί στην αλλαγή του χρώματος (44 ημέρες μετά την άνθηση-Br), καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης (47 ημέρες μετά την άνθηση-Cm) και ώριμοι κόκκινοι (52 ημέρες μετά την άνθηση-RR) (Εικ 4). Οι καρποί (15mm, Mg, Br και RR) συγκομίστηκαν την ίδια ημέρα. Οι καρποί Cm που χρησιμοποιήθηκαν για τους μετασυλλεκτικούς χειρισμούς συγκομίστηκαν την ίδια ημέρα αλλά προέρχονται από καλλιέργεια σε διαφορετική καλλιεργητική περίοδο από τις προηγούμενες επεμβάσεις. Αμέσως μετά τη συγκομιδή τους, κάποιοι καρποί χρησιμοποιήθηκαν για τομές με σκοπό τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου, οι δε υπόλοιποι αποθηκεύτηκαν στους -80°C.



Εικόνα 4: Τα 4 στάδια ανάπτυξης του καρπού τομάτας τύπου cherry βάση των οποίων έγινε η συγκομιδή. (a) Ανώριμος πράσινος καρπός 15mm, (b) ώριμος πράσινος καρπός (Mature green-Mg) (c) καρπός στην αλλαγή χρώματος (Breaker-Br) (d) καρπός στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης (CM) και (e) κόκκινος ώριμος καρπός (Red ripe-RR).

5.2.1 Χειρισμοί πειράματος δεύτερης πειραματικής ενότητας (μετασυλλεκτικών χειρισμών)

Για τη μελέτη της επίδρασης μετασυλλεκτικών χειρισμών συλλέχθηκαν ένσπερμοι και παρθενοκαρπικοί καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωρίμανσης (CM) (ως στάδιο εμπορικής ωρίμανσης ορίζεται το στάδιο το οποίο ο καρπός ωριμάζει αποκτώντας ικανοποιητικό χρώμα ενώ έχει αποκοπεί από το φυτό (Εικ 4). Οι καρποί αυτοί για διάστημα πέντε ημερών υποβλήθηκαν στους παρακάτω χειρισμούς:

Χειρισμός	Συνοτομογραφία
Καρποί στο στάδιο της εμπορικής ωριμότητας	CM
Καρποί CM που αφέθησαν να ωριμάσουν κανονικά επάνω στα φυτά (ώριμοι κόκκινοι)	RR
Αποκομένοι καρποί CM που διατηρήθηκαν πέντε ημέρες στις ίδιες συνθήκες με τα φυτά	NTP
Αποκομένοι καρποί CM που διατηρήθηκαν πέντε ημέρες στους 5°C σε σκότος	5d5°C
Αποκομένοι καρποί CM που διατηρήθηκαν πέντε ημέρες στους 10°C σε σκότος	5d10°C

5.3.1 Ανοσοεντοπισμός της GalLDH και της APX

α) Προσήλωση.

Για τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκαν τομές από ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας τύπου cherry στα εξής στάδια ανάπτυξης: ανώριμος καρπός διαμέτρου 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% παραφολμαλδεΐδη (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) και 0,5% γλουταραλδεΐδη (Sigma-Aldrich, St. Louis USA) για χρονικό διάστημα 48h σε θερμοκρασία δωματίου.

β) Αφυδάτωση.

Οι τομές αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων αιθανόλης (Merck, Darmstadt Germany) (50%, 70%, 80%, 90%, 95% και 100%) με σκοπό την απομάκρυνση την αφυδάτωση των ιστών. Ο χρόνος εμβάπτισης των δειγμάτων στα παραπάνω διαλύματα ήταν για μία ώρα το καθένα εκτός από την καθαρή αιθανόλη όπου και παρέμειναν για 3h.

γ) Διαφανοποίηση.

Οι τομές αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων αιθανόλης (Merck, Darmstadt Germany) (50%, 70%, 80%, 90%, 95% και 100%) με σκοπό την απομάκρυνση την αφυδάτωση των ιστών. Ο χρόνος εμβάπτισης των δειγμάτων στα παραπάνω διαλύματα ήταν για μία ώρα το καθένα εκτός από την καθαρή αιθανόλη όπου και παρέμειναν για 3h.

δ) Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη.

Στα δείγματα των καρπών τομάτας τύπου cherry που βρίσκονταν μέσα σε μικρά γυάλινα δοχεία με ξυλένιο, προστέθηκαν μικρά τεμάχια παραφίνης (Paramat BDH) (Gurr, Poole UK) 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, όπου συνεχίστηκε η προσθήκη παραφίνης έως ότου επέλθει κορεσμός του διαλύματος. Στη συνέχεια, το μίγμα παραφίνης-ξυλένιου μεταφέρθηκε στους 60°C. Η λιωμένη παραφίνη αντικαταστάθηκε με καινούργια τρεις φορές τουλάχιστον. Για τον εγκλεισμό των δειγμάτων σε παραφίνη χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικά εκμαγεία, τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοχείο με πάγο. Η τοποθέτηση των δειγμάτων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε αυτά να έχουν τον επιθυμητό προσανατολισμό. Επίσης, μεταφέρθηκε μικρή ποσότητα λιωμένης παραφίνης. Καθώς η παραφίνη έπηξε, και για να αποφευχθεί ο εγκλεισμός φυσαλίδων αέρα, μια πυρακτωμένη ανατομική βελόνα, θέρμαινε την περιοχή γύρω από τους ιστούς.

ε) Προετοιμασία αντικειμενοφόρων.

Οι αντικειμενοφόροι που χρησιμοποιήθηκαν, εμβαπτίστηκαν αρχικά σε διάλυμα 1% SDS (Serva, Haidenberg Germany), 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 (Merck, Darmstadt Germany) 5% για 2h και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό σε συνεχή ροή. Τέλος, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 1% w/v πολυλυσίνης (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) και αφέθηκαν να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μέρες. Μέχρι να χρησιμοποιηθούν παρέμειναν στο ψυγείο.

ζ) Μικροτόμηση.

Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε χειροκίνητο μικροτόμο (Leica microsystems, Wetzlar Germany) 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 (Carl Zeiss Microscopy, Göttingen Germany). 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.

η) 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.

θ) Ανοσοεντοπισμός.

Αρχικά οι τομές καλύφθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα TBST με 1% BSA (Pan biotech, Aidenbach Germany), (διάλυμα δεσμεύσεως μη ειδικών θέσεων) και αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 1h. Ακολούθησε επώαση των τομών, που προορίζονταν για τον ανοσοεντοπισμό των GalLDH και APX, σε 1:1000 αραιώση του αντίστοιχου αντισώματος κουνελιού (AS06 182 {GalLDH}, AS06 180 {APX} (Agrisera, Vannas Sweden), 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 εφαρμόστηκε ορρός πρό της ανοσοεπαγωγής.

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

Κατόπιν, οι τομές επώαστηκαν σε διάλυμα TBST με 1% BSA, που περιείχε κατάλληλη αραίωση (1:5000) δευτερογενούς αντισώματος (AP-Anti-Rabbit, Promega, Madison USA), 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.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση της δραστικότητας 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, 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 (Gurr, Poole UK).

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 που χρησιμοποιήθηκαν

Ρυθμιστικό διάλυμα TBST

20mM Tris HCl pH 7.5 (Sigma-Aldrich, St. Louis USA)

150mM NaCl (Ferak, Berling Germany)

0,05% Tween 20 (Atlas chemicals, Amman Jordan)

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης-Buffer3

10mM Tris-HCl pH 9.5

100mM NaCl (Ferak, Berling Germany)

50mM MgCl₂ (MP Biochemicals, Eschwege Germany)

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης

10ml ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης (Promega, Madison USA).

33μl 5-βρωμο-3-χλωρο-ινδολυλο- φωσφορικό (BCIP) (Promega, Madison USA).

66μl Νιτρομπλέ του τετραζολίου (NBT) (Promega, Madison USA).

5.4.1 Οι ηλεκτροφορήσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% 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 20μg πρωτεΐνης από καρπούς τομάτας για την GalLDH και την APX.

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 12%T, 2,7%C

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Μητρικό διάλυμα ακρυλαμιδίου, Bis- ακρυλαμιδίου (30%, 2,7%)	4,3ml
Ρυθμιστικό διάλυμα Ανάλυσης	2,5ml
Αποσταγμένο νερό	3,0ml
10% Υπερθειικό Αμμώνιο	50μl
SDS 10%	100μl
TEMED	10μl

Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης

378mM Tris-HCl pH 8,9

B. Πηκτή συσσώρευσης (Stacking Gel) 3%T, 2,7%C

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμιδίου, Bis- Ακρυλαμιδίου (30%, 2,7%)	1,25 ml
Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης	5,0 ml
Αποσταγμένο Νερό	3,5 ml
10% Υπερθειικό Αμμώνιο	150 μl
TEMED	10 μl
SDS 10%	100μl

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης

63mM Tris-HCl pH 6,8

5.4.2 Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

- Ενυδάτωση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με αποσταγμένο νερό.
- Αντικατάσταση του αποσταγμένου νερού με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και επώασή του συμπεριλαμβανομένης της πηκτής για 10min.
- Τοποθέτηση 5 φύλλων χαρτιού 3MM που έχει κορεσθεί με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς. Αφαίρεση τυχόν φυσαλίδων αέρα με χρήση πιπέτας.
- Τοποθέτηση των φύλλων νιτροκυτταρίνης και της πηκτής αντίστοιχα.
- Πάνω από αυτά τοποθετούνται 5 φύλλα χαρτιού 3MM και αφαιρούνται τυχόν φυσαλίδες αέρα.
- Μεταφορά των πρωτεϊνών στα 200mA για 45min, υπό ψύξη.

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

5.4.3 Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων

- Κόβονται ταινίες νιτροκυτταρίνης (πλάτους 5mm) από το φύλλο της νιτροκυτταρίνης αποφεύγοντας την επαφή με τα χέρια.
- Η λωρίδα αφήνεται να επιπλεύσει σε TBST (0.01% Tween 20) για 5min με τέτοιο τρόπο ώστε να μην παγιδευτεί αέρας.
- Δέσμευση των ελεύθερων θέσεων της νιτροκυτταρίνης σε 1% ζελατίνης (BDH).
- Επώαση της ταινίας με πολυκλωνικά αντισώματα παρασκευασθέντα εναντίον της συντηρημένης περιοχής της GalLDH και της APX (rabbit anti-GalLDH και anti-APX) με αραιώση 1:1000. Οι αραιώσεις γίνονται σε TBST 1% ζελατίνης. Επώαση όλη τη νύχτα σε 25°C.
- Ξέπλυμα των ταινιών με TBST 1% ζελατίνης.
- Απομάκρυνση της περίσσειας του πρωτογενούς αντισώματος με 3 φορές επί 5min TBST 1% ζελατίνης.
- Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος mouse anti-rabbit IgG (Fc) AP conjugated σε αραιώση 1:5000 για 1h και 30min.
- Απομάκρυνση της περίσσειας του δευτερογενούς αντισώματος με 3 φορές επί 5min TBST 1% ζελατίνης.
- Ανίχνευση δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης με την επώαση των ταινιών σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης για 3min παρουσία χρωμοφόρου.
- Αφυδάτωση και φύλαξη της νιτροκυτταρίνης μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.
- Φωτογράφιση της νιτροκυτταρίνης μέσω σάρωσής τους με επίπεδο σαρωτή.

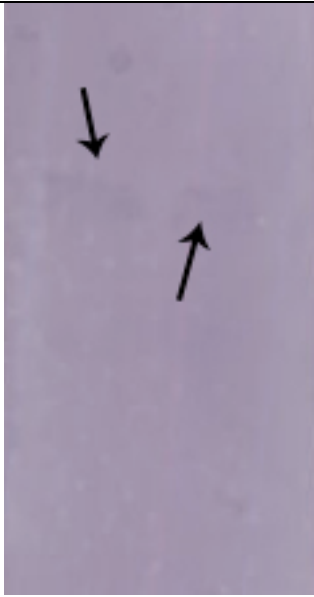
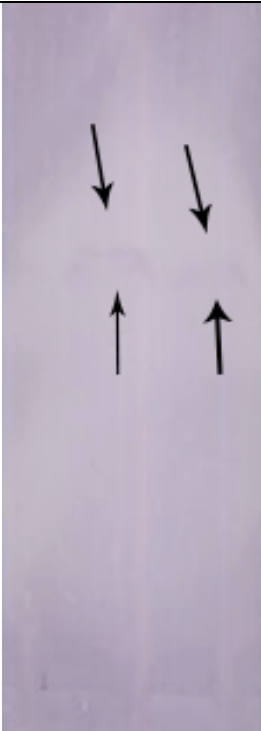
5.4.4 Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου στις μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης

- Δέσμευση των μη ενεργών θέσεων των τομών για 1h σε 1% ζελατίνη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Επώαση των τομών με διάλυμα αντισωμάτων rabbit anti-GalLDH και rabbit anti-APX σε αραιώση 1:1000 σε TBST 1% BSA στους 4°C για 16h.

- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBST 3 φορές επί 5min για την απομάκρυνση του αδέσμευτου πρωτογενούς αντισώματος.
- Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος mouse anti-rabbit IgG (Fc) AP conjugated σε αραιώση 1:5000 για 1h και 30min.
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBST 3 φορές επί 5min για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος.
- Εντοπισμός της GalLDH και της APX με NBT/BCIP (66 μl/33μl BCIP σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος ανίχνευσής της).

5.4.5 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων

Τα αποτελέσματα της ανοσοανίχνευσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων κοτυλών μετά την ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης φαίνονται στις Εικόνες 5 και 6. Η Εικ. αφορά την GalLDH. Το αντίσωμα αναγνωρίζει ένα πεπτίδιο της GalLDH. Στην Εικ. τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα κατά της APX αναγνώρισαν δύο πεπτίδια (βέλη).

	
<p>Εικόνα 5: Ανοσοεντοπισμός της GalLDH σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτρομεταφορά τους από πυκνή πολυακρυλαμίδης. Με βέλη σημειώνεται η ζώνη που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα.</p>	<p>Εικόνα 6: Ανοσοεντοπισμός της της APX σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτρομεταφορά τους από πυκνή πολυακρυλαμίδης. Με βέλη σημειώνονται οι 2 ζώνες που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα.</p>

5.5 Η έκφραση των γονιδίων που σχετίζονται με τον μεταβολισμό του AsA στα διάφορα στάδια ανάπτυξης του καρπού

5.5.1 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) (Qiagen, Hilden Germany). Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του παρασκευαστή του αντιδραστηρίου.

5.5.2 Έλεγχος της ποιότητας του παραλαμβανόμενου RNA

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

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

50X Tank ρυθμιστικό διάλυμα

2M Tris HCl

50mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis USA)

Ρύθμιση του pH στο 7,0

10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης του Δείγματος

50 mM Tris-HCl pH 7,6

60% Γλυκερόλη (MP biochemicals, Ohio USA)

0,25% κυανούν της βρωμοφαινόλης

1μl χρωστική SYBR safe DNA gel stain (Invitrogen, Eugene USA)

Διάλυμα αποδιάταξης RNA

Σε αποστειρωμένο errendorf τοποθετούνται:

600μl φορμαμίδιο

2400μl dd H₂O

100μl 10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης του Δείγματος

5.5.3 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 το λόγο αυτό ακολούθησε μια επιπλέον μέθοδος υδρόλυσης του DNA, και χρησιμοποιήθηκαν τα αντιδραστήρια DNάσης (Takara, Otsu Shiga Japan) παρουσία του παρεμποδιστή Rn-άσης (Qiagen, Hilden Germany) για προστασία του δείγματος. Ακολουθήθηκαν οι οδηγίες του παρασκευαστή.

Ακολούθησε καθαρισμός του RNA με χρήση φαινόλης (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) και χλωροφορμίου (Serva, Haidelberg Germany).

Το καθαρισμένο RNA κατακάθισε ως ίζημα με χρήση (CH₃COONa 3M pH=5,2) (Sigma-Aldrich, St. Louis USA).

Μετά την αντίδραση PCR και την ηλεκτροφόρηση TAE, η παρουσία μόνο των εκκινητών της ουμπικουτίνης (Ubq) δείχνει εάν έχει υδρολυθεί πλήρως το DNA. Η ποιότητα του RNA που έχει παραληφθεί μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο Nanodrop (Thermo, Wilmington USA) όπου μετρήθηκε η απορρόφηση στα 260 nm και ο λόγος απορροφήσεων στα 260/280 nm.

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

10X Ρυθμιστικό Διάλυμα DNάσης

400mM Tris-HCl (pH 8.0)

100mM MgSO₄

10mM CaCl₂.

5.5.4 Παρασκευή cDNA

Μετά τον έλεγχο της ποιότητας του RNA, ακολούθησε η παρασκευή cDNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα σύνθεσης cDNA (AffinityScript Multi Temperature cDNA Synthesis Kit) (Stratagene, Santa Clara USA). Κατά τη διαδικασία αυτή, γίνεται σύνθεση cDNA από τα τμήματα του RNA που περιέχουν ουρά πολυ-A (mRNA). Χρησιμοποιήθηκαν 2 μl καθαρισμένου RNA με τη χρήση αντίστροφης μεταγραφάσης στους 42 °C για 5 min και στους 55 °C για 60 λεπτά χρησιμοποιώντας ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές που αποτελούνται αποκλειστικά από δεοξυθυμιδίνη (oligo(dT)).

Το cDNA φυλάσσεται στους -20°C. Η ποσοτικοποίηση έγινε με αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου χρησιμοποιώντας εκκινητές συμβικουιτίνης (qPCR).

5.5.5 Ημιοσοτική Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

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

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόστηκαν στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξεως των εκκινητών (T_m). Σε ειδικό σωλήνα errendorf (500 ή 100 μ l) προστέθηκαν τα παρακάτω:

Αντιδραστήρια για PCR

Μήτρα cDNA 1 μ l

Εμπρόσθιος εκκινητής 1,6 μ l (0,016nmole)

Ανάστροφος εκκινητής 1,6 μ l (0,016nmole)

Μίγμα dNTPs (10mM το καθένα) (HT Biotechnology) 1 μ l

10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR (Kapa) 5 μ l

KapaTaq DNA πολυμεράση (5u/ μ l) 1 μ l

dH₂O 40 μ l

Συνθήκες αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης

- 1 Αρχική αποδιάταξη 96°C για 2'
- 2 Αποδιάταξη: 95°C για 30''
- 3 Υβριδισμός εκκινητών: 58°C για 30''.
- 4 Επιμήκυνση: 72 °C για 30''

Τα στάδια 2-4επαναλαμβάνονται για 25- 35 κύκλους.

- 5 Τελική επέκταση 72 °C για 2'

Η συσκευή PCR (θερμοκυκλοποιητής) που χρησιμοποιήθηκε ήταν Crea Con T-cy

5.5.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (qPCR)

Οι αντιδράσεις qPCR, πραγματοποιήθηκαν στη Stratagene MX 3005P (Stratagene, Santa Clara USA), χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια της Kapa Biosystems. Κάθε σωλήνας περιείχε 2 μl cDNA, ποσοτικοποιημένο και αραιωμένο (περίπου 100 ng), ενώ προστίθενται και τα αντιδραστήρια με τις αναλογίες που προτείνονται από την εταιρία Kapa Biosystems (Kapa, Woburn USA).

Κάθε σωλήνας περιείχε:

Αντιδραστήριο	Όγκος σε μl	Συγκέντρωση μητρικού δ/τος (stock solution)
H ₂ O ελεύθερο RNάσης	6,1	
Εμπρόσθιος εκκινητής (Forward primer)	1	10 μM
Ανάστροφος εκκινητής (Reverse primer)	1	10 μM
Kapa RYBR Fast qPCR Master mix (2X) (μίγμα αντιδραστηρίων εταιρίας Kapa)	10	
KSF Rox Low (χρωστική)	0,4	
cDNA (δείγμα)	1,5	100 ng/μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	20	

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

Ως ένζυμο αναφοράς τόσο για την ημιποσοτική όσο και για την πραγματικού χρόνου αντίδραση πολυμεράσης ήταν η Ουμπικουιτίνη (Ubc).

Εξειδικευμένοι εκκινητές για κάθε γονίδιο σχεδιάστηκαν για τα γονίδια APX (Najami et al. 2008, Aoki et al., 2010), MDHAR (Grantz et al., 1995, Li et al. 2010) DHAR (Zou et al., 2006, Chen and Galley, 2006), GR (Shu et al., 2011, Henmi et al. 2005) και UBQ χρησιμοποιώντας το λογισμικό Beacon Designer v 7.01 (Premier biosoft, Palo Alto USA). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν σχεδιάστηκαν με βάση κατατεθειμένες αλληλουχίες που εντοπίστηκαν μετά από έρευνα και έλεγχο στις βάσεις δεδομένων Sol genomics και NCBI.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

Γονίδιο	Πρωτεΐνη-Ένζυμο που κωδικοποιείται	Αλληλουχία εκκινητή	Κωδικός σε βάσεις δεδομένων
<i>GalLDH</i>	Αφθδρογονάση της L-γαλάκτονο-1,4-λακτόνης	Εμπρόσθιος: TTGCCTCCAATTGATGAACA Ανάστροφος: CCTGCCTCTCAACACACTGA	HM587129
<i>GME</i>	Επιμεράση της GDP-3' 5' μονόζης	Εμπρόσθιος: ATGAATGAGATGGCTGAGATGG Ανάστροφος: AGCGTGTGTCTGAGTTGC	NM_001247805
<i>APX 1</i>	Κυτοπλασματική υπεροξειδάση του AsA 1	Εμπρόσθιος: TGGGAAGGGCACACAAGG Ανάστροφος: CTGACGGCAACTGTAAGAGC	DQ099420 AK320564
<i>APX 2</i>	Κυτοπλασματική υπεροξειδάση του AsA 2	Εμπρόσθιος: TGGGAGGGTGGTGACATATTTT Ανάστροφος: TTGAAGTGCATAACTCCCATCTTT	DQ099421
<i>APX 3</i>	Κυτοπλασματική υπεροξειδάση του AsA 3	Εμπρόσθιος: CAGTCCCAATCCTATCCTACG Ανάστροφος: GTTCTGTCTTGTCTGTCTCC	DQ131129 AK326199
<i>APX 4</i>	Κυτοπλασματική υπεροξειδάση του AsA 4	Εμπρόσθιος: ACGCCATATCACACAAGAAGC Ανάστροφος: CAGCAGCCACAACAACACC	DQ131130 AK321429
<i>APX 5</i>	Κυτοπλασματική υπεροξειδάση του AsA 5	Sense: ACTGTGCTCCTATTATGCTTCG Ανάστροφος: CGCCATGCTTGTACTCTACC	DQ131131 AK321929
<i>APX 6</i>	Πλαστιδιακή υπεροξειδάση του AsA (εντοπισμένη στα θυλακοειδή).	Εμπρόσθιος: GTGCCACTGCCATTGAGG Ανάστροφος: GCAAATGAGATGAAGGTTAGG	DQ131132 AK319984
<i>APX 7</i>	Πλαστιδιακή υπεροξειδάση του AsA (πιθανώς εντοπίζεται στο στρώμα)	Εμπρόσθιος: TTATCCCATGTGTTTCGCTACC Ανάστροφος: GCTCTTGTGCTCTCTCTCG	DQ131133 AK323535
<i>MDHAR 1</i>	Κυτοπλασματική ρεδουκτάση του μόνοδεϋδροασκορβικού οξέως	Εμπρόσθιος: GTGTTTCTGCTGGGTATGC Ανάστροφος: GGTATGCCTTGCTAAGTGC	L41345
<i>MDHAR 2</i>	Πλαστιδιακή ρεδουκτάση του μόνοδεϋδροασκορβικού οξέως	Εμπρόσθιος: ACTGTGCGTGGAATAGAGG Ανάστροφος: TTACGAGCATGGTCAACG	HM230669
<i>DHAR 1</i>	Κυτοπλασματική ρεδουκτάση του δεϋδροασκορβικού οξέως	Εμπρόσθιος: GGGCAGAATGTTTGTTCAGTTG Ανάστροφος: AGAGCAGCTTCATGTAGTTACG	FJ523254 παρόμοιο με AY074787 από τον καπνό
<i>DHAR 2</i>	Πλαστιδιακή ρεδουκτάση του μόνοδεϋδροασκορβικού οξέως	Εμπρόσθιος: ACCTCCGCTGACAACTCC Ανάστροφος: CCTGCTCTGTTCCATCACC	AY971874
<i>AO 1</i>	Οξειδάση του ασκορβικού οξέως ισοένζυμο 1	Εμπρόσθιος: AAGTCCACAGAGATTTTCATCC Ανάστροφος: CGATCAGGTAAGCGTATGG	NM_001247900
<i>AO2</i>	Οξειδάση του ασκορβικού οξέως ισοένζυμο 2	Εμπρόσθιος: AATACGCACCTCAGATTTCTCC Ανάστροφος: CTGCCTCTACAACCACCATC	πρωτεΐνη παρόμοια με NP_680176 από <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>GR 1</i>	Κυτοπλασματική ρεδουκτάση της γλουταθειόνης.	Εμπρόσθιος: GAAGTGAATGAGAATGTC Ανάστροφος: CCATCCAGTTGAATTAAC	FJ544907 πρωτεΐνη παρόμοια με Q6F4I5 από <i>Zinnia elegance</i>

GR 2	Πλαστιδιακή γλουταθειόνης.	ρεδουκτάση της	Εμπρόσθιος: GCACGTGTGTGCTTCGGGGA Ανάστροφος: AGGCGCTGCAACTCGGCATT	NM_001247314
UBQ	Ουμπικουϊτίνη		Εμπρόσθιος: GCAGACTATAACATCCAGAAAGAG Ανάστροφος: AACAAACAAAGCACACAGCCATC	

Η σχετική έκφραση του γονιδίου υπολογίστηκε με τον τύπο

$$\frac{\text{Εκφρ.ΓονιδιουX}}{\text{Εκφρ.Ubq}} = \frac{\text{eff}_{\text{reac.Ubq}}^{\text{Ct.Ubq}}}{\text{eff}_{\text{reac.Γον}\blacklozenge\text{διοX}}^{\text{Ct.Γον}\blacklozenge\text{διοX}}}$$

όπου eff = αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, που υπολογίζεται από τα αποτελέσματα της αντίδρασης και μέσω του προγράμματος LinRegPCR (Remakers et al., 2003). Τα δεδομένα αναλύθηκαν βάσει της μεθόδου του Pfaffi (2001).

5.5.7 Μέτρηση ελεύθερου και ολικού AsA με υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC)

Για την εκχύλιση του AsA από τους ιστούς, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος που περιγράφεται από τους Davey et al., (2003).

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

1) Οι ιστοί ζυγίστηκαν και λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο. Προστέθηκε διπλάσιος όγκος από αυτόν του ιστού εκχυλιστικού διαλύματος. Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 15.000 g στους 4°C για 12 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνθηκε, μετρήθηκε ο όγκος και τοποθετήθηκε στον πάγο. Στο ίζημα προστέθηκε 500μl εκχυλιστικό διάλυμα και αναδεύτηκε. Ακολούθησε φυγοκέντριση στις 15.000 g στους 4°C για 12 λεπτά. Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε, μετρήθηκε ο όγκος και τοποθετήθηκε στον πάγο. Ακολούθησε μέτρηση του ελεύθερου AsA σε τρεις επαναλήψεις με διαφορετικό βιολογικό υλικό. Για τον προσδιορισμό του ολικού AsA, 500μl εκχυλίσματος αναμίχθηκαν με 250μl διαλύματος 200mM DTT (BHD lab supplies, Poole England) σε 400mM Tris base για 15 λεπτά και μετά προστέθηκαν 250μl 8,5% ορθο-φωσφορικό οξύ ($\alpha\text{-H}_3\text{PO}_4$) (Carlo Erba, Rodano Italy) για τον τερματισμό της αντίδρασης. Ακολούθησε μέτρηση του ολικού AsA σε τρεις επαναλήψεις με διαφορετικό βιολογικό υλικό.

Ο προσδιορισμός του AsA έγιναν σε σύστημα Prominence (Shimadzu Co., Tokyo, Japan) εξοπλισμένο με απαερωτή DGU-20A₅, αντλία LC-20AD, ανιχνευτή UV-Vis συστοιχίας φωτοδιόδων SPD-M20A και θερμοστατούμενο διαμέρισμα στηλών CTO-20A. Όγκος 20μl δείγματος εγχύθηκε σε στήλη Zorbax Stablebond-C₁₈, 5 μm, 250 × 4,6 mm (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) και διαχωρίστηκε σύμφωνα με τους Davey et al., (2003). Ο ποσοτικός προσδιορισμός έγινε στα 243 nm σύμφωνα με καμπύλη αναφοράς ασκορβικού οξέος με τη βοήθεια του λογισμικού LC Solutions ver. 1.23 SP1 (Shimadzu Co.).

Διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

Το εκχυλιστικό διάλυμα είχε την παρακάτω σύσταση:

6% Μεταφωσφορικό οξύ (MPA) (Panreac, Barcelona Spain)

2mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis USA)

1% αδιάλυτη πολυβινυλοπυρρολιδόνη (PVP) (MP Biochemicals, Eschwege Germany)

Η διάλυση γινόταν σε νερό ειδικό για υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία. (Merck, New Jersey USA).

Ρυθμιστικό διάλυμα Hpic (για 1lt)

400 μl ο-H₃PO₄

0,1mM EDTA

3,15 ml Μεθυλική αλκοόλη (Merck-Darmstadt, Germany)

5.5.8 Εκτίμηση της δραστηριότητας της APX

Η συνολική δραστηριότητα της APX εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο που προτάθηκε από τους Panchuk et al., (2002) με ορισμένες τροποποιήσεις. Οι ιστοί (200mg) λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο και αναμίχθηκαν με εκχυλιστικό διάλυμα που περιείχε 50 mM φωσφορικό νάτριο (pH 7.0), 0.25 mM EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis USA), 2% διαλυτή PVP-40 (MP Biochemicals, Eschwege Germany), 10% (w/v) γλυκερόλη (Sigma-Aldrich, St. Louis USA), and 4 mM AsA. Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 13000 g για 10 min στους 2°C. Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε, φιλτραρίστηκε και χρησιμοποιήθηκε για εκτίμηση της δραστηριότητας της

APX με τη χρήση αντιδραστηρίου που περιείχε 25 mM φωσφορικό νάτριο (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 0.2 mM H₂O₂ και 4 mM AsA. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε μίγμα 200 μL εκχυλίσματος και 850 μL αντιδραστηρίου. Ο ρυθμός οξειδωσης του AsA εκτιμήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 265nm χρησιμοποιώντας το φασματοφωτόμετρο Shimadzu (Tokyo Japan) UV 160A με κυβέττες UV (Ratiolab, Dreieich Germany). Η εκτίμηση έγινε σε δεκάλεπτα διαστήματα σε θερμοκρασία δωματίου. Για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν προϋπολογισμένες συγκεντρώσεις AsA.

5.5.9 Εκτίμηση της δραστηριότητας της DHAR

Η εκτίμηση της δραστηριότητας της DHAR πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας μία παραλλαγή της μεθόδου που προτάθηκε από τους Chen and Gallie (2006). Οι ιστοί (200mg) λειοτριβήθηκαν με υγρό άζωτο και αναμίχθηκαν με 2mL εκχυλιστικό διάλυμα που περιείχε 50 mM Tris HCl (pH 7.4), 100 mM NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis USA), 2 mM EDTA, 1 mM MgCl₂ και 0.5 % διαλυτή PVP (Alfa Aesar, Ward hill England). Ακολούθησε φυγοκέντριση στα 13,000 g για 10 min στους 2°C. Το υπερκείμενο υγρό συλλέχθηκε, διηθήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση της δραστηριότητας της DHAR με τη χρήση αντιδραστηρίου που περιείχε 50 mM MES-NaOH (pH 6.3) (MP Biochemicals, Eschwege Germany), 2 mM DHA και 5 mM ανηγμένη γλουταθειόνη (Sigma-Aldrich, St. Louis USA). Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε μίγμα 200 μL εκχυλίσματος και 850 μL αντιδραστηρίου. Ο ρυθμός αναγωγής του DHA σε AsA μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 265 nm χρησιμοποιώντας φασματοφωτόμετρο Shimadzu UV 160A χρησιμοποιώντας UV κυβέττες. Η εκτίμηση έγινε σε δεκάλεπτα διαστήματα σε θερμοκρασία δωματίου. Για την καμπύλη αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν προϋπολογισμένες συγκεντρώσεις AsA.

5.5.10 Στατιστική επεξεργασία

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το λογισμικό Statgraphics Centurion (Statpoint Technologies, Warrenton, USA). Οι στατιστικά σημαντικές διαφορές εντοπίστηκαν χρησιμοποιώντας ANOVA διπλής κατεύθυνσης (two way) και συγκρίσεις των μέσων όρων ανά ζεύγη (post-hoc) με όριο στατιστικής σημαντικότητας (p<5%).

6. Βιβλιογραφία

- Aghaei K, Ehsanpour AA, Komatsu S** (2009) Potato responds to salt stress by increased activity of antioxidant enzymes. *J. Integ. Plant Biol.* **51**: 1095–1103.
- Agius F, Gonzalez-Lamonthe R, Caballero JL, Munoz-Blanco L, Botella MA, Valpuesta V** (2003) Engineering increased vitamin C levels in plants by over-expression of a D-galacturonic acid reductase. *Nat. Biotechnol.* **21**: 177–181.
- Ahmad R, Kima YH, Kima MD, Kwonb SY, Choc K, Leea HS, Kwaka SS** (2010) Simultaneous expression of choline oxidase, superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in potato plant chloroplasts provides synergistically enhanced protection against various abiotic stresses *Physiologia Plant.* **138**: 520–533.
- Alexander L, Grierson D** (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening *J. Exp. Bot.* **53**: 2039-2055.
- Alhagdow M, Mounet F, Gilbert L, Nunes-Nesi A, Garcia V, Just D, Petit J, Beauvoit B, Fernie AR, Rothan C, Baldet P** (2007) Silencing of the Mitochondrial Ascorbate Synthesizing Enzyme L-Galactono-1,4-Lactone Dehydrogenase Affects Plant and Fruit Development in Tomato. *Plant Physiol.* **145**: 1408-1422
- Aoki K, Yano K, Suzuki A, Kawamura S, Sakurai N, Suda K, Kurabayashi A, Suzuki T, Tsugane T, Watanabe M, Ooga K, Torii M, Narita T, Shin IT, Kohara Y, Yamamoto N, Takahashi H, Watanabe Y, Egusa M, Kodama M, Ichinose Y, Kikuchi M, Fukushima S, Okabe A, Arie T, Sato Y, Yazawa K, Satoh S, Omura T, Ezura H, Shibata D** (2010) Large-scale analysis of full-length cDNAs from the tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for the Solanaceae genomics. *BMC genomics* **11**: 210-215.
- Arrigoni O, de Gara L, Tommasi F, Liso R** (1992) Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol.* **99**: 235–238.
- Asada K** (1999) The water–water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 601–639.
- Asada K, Takahashi M** (1987) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts. In DJ Kyle, CB Osmond, CJ Arntzen, Photoinhibition. Elsevier, Amsterdam, pp 227–287
- Avigliano L, Vecchini P, Sirianni P, Marcozzi G, Marchesini A, Mondovi B** (1983) A reinvestigation on the quaternary structure of ascorbate oxidase from *Cucurbita pepo medullosa*. *Mol. Cell Biochem.* **56**: 107–112.
- Badejo AA, Eltelib HA, Fukunaga K, Fujikawa Y, Esaka M** (2009) Phosphomannomutase Gene Increase in Ascorbate Content of Transgenic Tobacco Plants Overexpressing the Acerola (*Malpighia glabra*) *Plant Cell Physiol.* **50**: 423–428.
- Badejo AA, Wada K, Gao Y, Maruta T, Sawa Y, Shigeoka S, Ishikawa T** (2012) Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *J. Exp. Bot.* **63**:229-239
- Barth C, De Tullio, M Conklin PL** (2006) The role of ascorbic acid in the control of flowering time and the onset of senescence, *J. Exp. Bot.* **57**: 1657–1665.
- Bartley GE, Scolnik PA, Giuliano G** (1994). Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. *Ann. Rev. Plant Phys.* **45**: 287-301.
- Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH** (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between com- plexes III and IV. *Plant Physiol.* **123**: 335–343

- Bartoli CG, Yu J, Gomez F, Fernandez L, McIntosh L, Foyer CH** (2006) Inter-relationships between light and respiration in the control of ascorbic acid synthesis and accumulation in *Arabidopsis thaliana* leaves, *J. Exp. Bot.* **57**: 1621–1631.
- Bhatia P, Ashwath N, Senaratn T, Midmore D** (2004) Tissue culture studies of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **78**: 1-21.
- Bhattacharjee S** (2005) Reactive oxygen species and oxidative burst: roles in stress, senescence and signal transduction in plant, *Curr. Sci.* **89**: 1113-1121.
- Borraccino G, Dipierro S, Arrigoni O** (1986) Soluble ascorbate peroxidase from potato tubers *Planta* **167**: 521–526.
- Brummell DA, Howie WJ, Ma C, Dunsmuir P** (2002) Postharvest fruit quality of transgenic tomatoes suppressed in expression of a ripening-related expansin. *Postharv. Biol. Tech.* **25**: 209–220
- Bulley SM, Rassam M, Hoser D, Otto W, Schunemann N, Wright M, MacRae E, Gleave A, Laing W** (2009) Gene expression studies in kiwifruit and gene over-expression in *Arabidopsis* indicates that GDP-L-galactose guanylyltransferase is a major control point of vitamin C biosynthesis. *J. Exp. Bot.* **60**: 765–778
- Caputo E, Ceglie V, Lippolis M, La Rocca N, De Tullio MC** (2010) Identification of a NaCl-induced ascorbate oxidase activity in *Chaetomorpha linum* suggests a novel mechanism of adaptation to increased salinity. *Environ. Exp. Bot.* **69**: 63–67
- Cascia G, Bulley SM, Punter M, Bowen J, Rassam M, Schotsmans WC, Larrigaudiere C, Johnston JW** (2013). Investigation of ascorbate metabolism during inducement of storage disorders in pear. *Physiol. Plant.* **147** :121-134
- Chatterjee IB** (1973) Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science* **182**: 1271-1272
- Chen Z, Gallie DR** (2004) The ascorbic acid redox state controls guard cell signaling and stomatal movement. *Plant Cell* **16**: 1143–1162
- Chen Z, Gallie DR** (2005) Increasing tolerance to ozone by elevating foliar ascorbic acid confers greater protection against ozone than increasing avoidance *Plant Physiology* **138**: 1673–1689
- Chen Z, Gallie DR** (2006) Dehydroascorbate Reductase affects leaf growth, development, and function, *Plant Physiol.* **142**: 775-787.
- Chen Z, Young TE, Ling J, Chang SC, Gallie DR** (2003) Increasing vitamin C content of plants through enhanced ascorbate recycling. *PNAS* **100**: 3525–3530.
- Cheng G, Duan X, Shi J, Wangjin L, Lou Y, Jiang W, Jiang Y** (2008) Effects of reactive oxygen species on cellular wall disassembly of banana fruit during ripening *Food Chem.* **109**: 319-324
- Chichirico G, Ceru MP, D' Alessandro A, Oratore A, Avigliano L** (1989). Immunohistochemical localisation of ascorbate oxidase in *Cucurbita pepo* medullosa. *Plant Sci.* **64**: 61–6
- Conklin PL, Norris SR, Wheeler GL, Williams EH, Smirnoff N, Last RL** (1999) Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 4198–203
- D'Aoust MA, Yelle S, Nguyen-Quoc B** (1999). Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *Plant Cell* **11**: 2407-2418.
- Dalton M, Langeberg L, Robbins M** (1992) Purification and characterization of monodehydroascorbate reductase from soybean root nodules. *Arch. Biochem. Biophys.* **292**: 281–286.

- Dat J, Vandenabeele S, Vranová E, Van Montagu M, Inzé D, Van Breusegem F** (2000) Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell. Mol. Life Sci.* **57**: 779–795
- Davey MD, Dekempeneer E, Keulemans J** (2003) Rocket-powered high-performance liquid chromatographic analysis of plant ascorbate and glutathione *Anal. Biochem.* **316**: 74–81.
- Davey MW, PersiauGestergaard J, Gilot C, Han Y, Bauw G, Van Montagu M** (1999) Ascorbate biosynthesis in Arabidopsis cell suspension culture. *Plant Physiol.* **121**: 535–544.
- Davey MW, Van Montagu M, Inze D, Sanmartin M, Kanellis A, Smirnoff N, Benzie IJJ, Strain J, Favell D, Fletcher J** (2000) Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing *J. Sci. Food Agric.* **80**: 825–860.
- Davletova S, Rizhsky L, Liang H, Shengqiang Z, Oliver DJ, Coutu J, Shulaev V, Schlauch K, Mittler R** (2005) Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of Arabidopsis. *Plant Cell* **17**:268–281
- de Jong M, Mariani C, Vriezen WH** (2009) The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. *J. Exp. Bot.* **60**: 1523–1532.
- de Tullio MC, Ciraci S, Liso R, Arrigoni O** (2007) Ascorbic acid oxidase is dynamically regulated by light and oxygen. A tool for oxygen management in plants? *J. Plant Physiol.* **164**: 39–46.
- del Rio LA, Sandalio LM, Corpas FJ, Palma JM, Barroso JB** (2006) Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling, *Plant Physiol.* **141**: 330–335.
- Desingh R, Kanagaraj G** (2007) Influence of salinity stress on photosynthesis and antioxidative systems in two cotton varieties. *Gen. Appl. Plant Physiol.* **33**:221–234.
- Deutsch JC** (2000) Dehydroascorbic acid. *J. Chromatogr.* **881**: 299–307.
- di Venere A, Nicolai E, Rosato N, Rossi A, Finazzi A, Mei G** (2011) Characterization of monomeric substates of ascorbate oxidase *FEBS Journ.* **278(9)**: 1585–1593.
- Dong X, Bi H, Wu G, Ai X** (2013) Drought-induced chilling tolerance in cucumber involves membrane stabilization improved by antioxidant system *Int. J. Plant Prod.* **7**: 67–80
- Duan M, Feng HL, Wang LY, Li D, Meng QW** (2012) Overexpression of thylakoidal ascorbate peroxidase shows enhanced resistance to chilling stress in tomato *J. Plant Physiol.* **169**: 867–877
- Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Morishima I, et al.** (2006) Enhanced tolerance to ozone and drought stresses in transgenic tobacco overexpressing dehydroascorbate reductase in cytosol. *Physiol. Plant* **127**: 57–65.
- Eltayeb AE, Kawano N, Badawi GH, Kaminaka H, Sanekata T, Shibahara T, et al.** (2007) Overexpression of monodehydroascorbate reductase in transgenic tobacco confers enhanced tolerance to ozone, salt and polyethylene glycol stresses. *Planta* **225**: 1255–64.
- Eltelib HA, Fujikawa Y, Esaka M** (2012) Overexpression of the acerola (*Malpighia glabra*) monodehydroascorbate reductase gene in transgenic tobacco plants results in increased ascorbate levels and enhanced tolerance to salt stress *South Afr. J. Bot.* **78**: 295–301.
- Epstein E, Cohen JD, Solvin JP** (2002) The biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid changes during tomato fruit development. *Plant Growth Regul.* **38**: 15–20
- Esaka M, Fujisawa K, Goto M, Kisu Y** (1992). Regulation of ascorbate oxidase expression in pumpkin by auxin and copper. *Plant Physiol.* **100**: 231–237.

- Felicetti E, Mattheis JP** (2010) Quantification and histochemical localization of ascorbic acid in 'Delicious,' 'Golden Delicious,' and 'Fuji' apple fruit during on-tree development and cold storage. *Postharv. Biol. Tech.* **56**: 56–63
- Foreman J, Demidchik V, Bothwell JHF, Mylona P, Miedema H, Torres MA, Linstead P, Costa S, Brownlee C, Jones JDG, Davies JM, Dolan L** (2003) Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442–446
- Fos M, Nuez F** (1997) Expression of genes associated with natural parthenocarpy in tomato ovaries. *J. Plant Physiol.* **151**: 235–238
- Fos M, Proano K, Alabadi D, Nuez F, Carbonell J, Garcia-Martinez JL** (2003) Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic pat-2 tomato ovaries. *Plant Physiol.* **131**: 359–366.
- Fotopoulos V, De Tullio MC, Barnes J, Kanellis AK** (2008) Altered stomatal dynamics in ascorbate oxidase over-expressing tobacco plants suggest a role for dehydroascorbate signalling. *J. Exp. Bot.* **59**: 729–737
- Fotopoulos V, Sanmartin M, Kanellis AK** (2006) Effect of ascorbate oxidase over-expression on ascorbate recycling gene expression in response to agents imposing oxidative stress. *J. Exp. Bot.* **57** : 3933–3943
- Foyer C, Noctor G** (2005) Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *Plant Cell* **17**: 1866–1876
- Foyer C, Rowell J, Walker D** (1983) Measurement of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* **157**: 239–244
- Foyer CH, Noctor G** (2011) Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub, *Plant Physiol.* **155**: 2–18.
- Fraaije MW, van Berkel WJH, Benen JAE, Visser J, Mattevi A** (1998) A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 206–207
- Franceschi V, Tarlyn NM** (2002) L-Ascorbic Acid Is Accumulated in Source Leaf Phloem and Transported to Sink Tissues in Plants *Plant Physiol.* **130**: 649–656
- Fry SC** (1998) Oxidative scission in plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals. *Biochem. J.* **332**: 507–515
- Fuke S, Konosu S** (1991). Taste-active components in some foods: a review of Japanese research. *Physiol. Behav.* **49**: 863–868
- Garcia V, Stevens R, Gil L, Gilbert L, Gest N, Petit J, Faurobert M, Maucourt M, Deborde C, Moing A, Poessel JL, Jacob D, Bouchet J-P, Giraudel J L, Gouble B, Page D, Alhag Dow M, Massot C, Gautier H, Lemaire-Chamley M, de Daruvar A, Rolin D, Usadel B, Lahaye M, Causse M, Baldet P and Rothan C** (2009) An integrative genomics approach for deciphering the complex interactions between ascorbate metabolism and fruit growth and composition in tomato. *CR Biol.* **332**: 1007–1021
- Gautier H, Diakou-Verdin V, Benard C, et al.** (2008). How does tomato quality (sugar, acid, and nutritional quality) vary with ripening stage, temperature, and irradiance? *J. Agric. Food Chem.* **56**: 1241–1250
- Gautier H, Lopez-Lauri F, Massot C, Murshed R, Marty I, Grasselly D, et al.** (2010) Impact of ripening and salinity on tomato fruit ascorbate content and enzymatic activities related to ascorbate recycling. *Funct. Plant Sci. Biotech.* **4**: 66–75.
- George WL, Scott JW, Splittstoesser WE** (1984). Parthenocarpy in tomato. *Hort. Rev.* **6**: 65–84.
- Gilbert L, Alhag Dow M, Nunes-Nesi A, Quemener B, Guillon F, Bouchet B, Faurobert M, Gouble B, Page D, Garcia V, Petit J, Stevens R, Causse M, Fernie AR, Lahaye M, Rothan C, Baldet P** (2009) GDP-D-mannose 3,5-

epimerase (GME) plays a key role at the intersection of ascorbate and non-cellulosic cell-wall biosynthesis in tomato. *Plant J.* **60**:499-508

- Gill SS, Tuteja N** (2010) Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants *Plant Physiol. Biochem.* **48**: 909-930
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W (1993)**. Fruits: a developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451.
- Goetz M, Hooper LC, Johnson SD, Rodrigues JCM, Vivian-Smith A, Koltunow AM**(2007) Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. *Plant Physiol.* **145**: 351–366.
- Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P (2005)**. Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biol.* **7**: 131-139.
- Grantz AA, Brummell DA, Bennett AB** (1995) Ascorbate free radical reductase mRNA levels are induced by wounding. *Plant Physiol.* **108**: 411–418
- Gustafson FG (1936)**.Inducement of fruit development by growth-promoting chemicals.*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **22**: 628-636.
- Hancock RD, Viola R** (2002) Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends Biotechnol* **20**: 299-305.
- Hancock RD, Viola R** (2005) Improving the nutritional value of crops through enhancement of L-ascorbic acid (vitamin C) content: rationale and biotechnological opportunities. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 5248–5257.
- Hancock RD, Walker PG, Pont SDA, Marquis N, Vivera S, Gordon SL** (2007) L-Ascorbic acid accumulation in fruit of *Ribes nigrum* occurs by in situ biosynthesis via the L-galactose pathway. *Funct. Plant Biol.* **34**: 1080-1091.
- Haroldsen VM, Chi-Ham CL, Kulkarni S, Lorence A, Bennett AB** (2011) Constitutively expressed DHAR and MDHAR influence fruit, but not foliar ascorbate levels in tomato, *Plant Physiol. Biochem.* **49**: 1244–1249.
- Harris JW** (1996). Ascorbic acid: biochemistry and biomedical cell biology. New York: Plenum Press. p. 35. ISBN 0-306-45148-4.
- Hatata MM, Abdel-Aal EA** (2008) Oxidative stress and antioxidant defense mechanisms in response to cadmium treatments. *Am-Euras J. Agric. Environ. Sci.* **4**:655–669.
- Hazra P, Dutta AK** (2010) Inheritance of parthenocarpy in tomato (*Solanum lycopersicum*) and its association with two marker characters. *J. Plant Sci.* **1**:144-149
- Heazlewood JL, Howell KA, Millar AH** (2003) Mitochondrial complex I from Arabidopsis and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochem. Biophys. Acta* **1604**: 159-169.
- Hodges DM, Forney CF** (2003) Postharvest ascorbate metabolism in two cultivars of spinach differing in their senescence rates. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* **128**: 930-935.
- Hossain MA, Asada K** (1985) Monodehydroascorbate reductase from cucumber is a flavin adenine dinucleotide enzyme. *J. Biol. Chem.* **24**: 12920–12926.
- Imai T, Karita S, Shiratori G, Hattori M, Nunome T, Oba K, Hirai M** (1998) l-galactono-c-lactone dehydrogenase from sweet potato: purification and cDNA sequence analysis. *Plant Cell Physiol* **39**: 1350–1358.

- Imai T, Niwa M, Ban Y, Hirai M, Ôba K, Moriguchi T** (2009) Importance of the l-galactonolactone pool for enhancing the ascorbate content revealed by l-galactonolactone dehydrogenase-overexpressing tobacco plants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* **96**: 105–112
- Ioannidi E, Kalamaki MS, Engineer C, Pateraki I, Alexandrou D, Mellidou I, Giovannonni J, Kanellis AK** (2009) Expression profiling of ascorbic acid-related genes during tomato fruit development and ripening and in response to stress conditions. *J. Exp. Bot.* **60(2)**: 663–678.
- Ishikawa T, Dowdle J, Smirnoff N.** (2006) Progress in manipulating ascorbic acid biosynthesis and accumulation in plants. *Physiol. Plant.* **126**: 343–355
- Ishikawa T, Shigeoka S** (2008) Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**: 1143–1154
- Jiang K, Meng YL, Feldman LJ** (2003) Quiescent center formation in maize roots is associated with an auxin-regulated oxidizing environment. *Development* **130**: 1429–1438.
- Jimenez A, Creissen G, Kular B, Firmin J, Robinson S, Verhoeyen M, Mullineaux P** (2002) Changes in oxidative processes and components of the antioxidant system during tomato fruit ripening, *Planta* **214**: 751-758.
- Jimenez A, Hernandez JA, Del Rio LA, Sevilla F** (1997) Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol.* **114**: 275–284.
- Jin P, Wang SY, Wang CY, Zheng Y** (2011) Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries *Food Chem.* **124**: 262–270
- Kaloo G.** (1991) Introduction. In: G. Kaloo (ed), Monographs on Theoretical and Applied Genetics 14, Genetic Improvement of Tomato. Springer-Verlag, Berlin. pp. 1–9.
- Kalt W** (2005) Effects of production and processing factors on major fruit and vegetable antioxidants *J. Food Sci.* **70**: 11-19
- Kangasjärvi S, Lepistö A, Hännikäinen K, Piippo M, Luomala EM, Aro EM** (2008) Diverse roles for chloroplast stromal and thylakoid-bound ascorbate peroxidases in plant stress responses. *Biochem. J.* **412**: 275–285.
- Karpinski S, Escobar C, Karpinska B, Creissen G, Mullineaux PM** (1997) Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress. *Plant Cell* **9**:627–640.
- Kato N, Esaka M.** (2000). Expansion of transgenic tobacco protoplasts expressing pumpkin ascorbate oxidase is more rapid than that of wild-type protoplasts. *Planta* **210**: 1018–1022.
- Keller R, Springer F, Renz A, Kossmann J** (1999) Antisense inhibition of the GDP-mannose pyrophosphorylase reduces the ascorbate content in transgenic plants leading to developmental changes during senescence *Plant J.* **19**: 131-141.
- Kim DW, Shibato J, Agrawa GK, Fujihara S, Iwahashi H, Kim DH, Shim IS, Rakwal R** (2007) Gene transcription in the leaves of rice undergoing salt-induced morphological changes (*Oryza sativa* L.). *Mol. Cells* **24**:45–59.
- Kim IJ, Chung W** (1997) Molecular characterization of a cytosolic ascorbate peroxidase in strawberry fruit *Plant Sci.* **133**: 69–77
- Kirkland E, Green LR, Stone C, Reimann D, Nicholas D, Mason R, Frick R, Coleman S, Bushnell L, Blade H, Radke V, Selman C** (2009) Tomato Handling Practices in Restaurants *J. Food Prot.* **78**: 1692–1698

- Kortstee AJ, Appeldoorn NJG, Oortwijn MEP, Visser RGF** (2007) Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives *Planta* **226**: 929 - 939.
- Koussevitzky S, Suzuki N, Huntington S, Armijo L, Sha W, Cortes D, Shulaev V, Mittler R** (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J. Biol. Chem.* **283**: 34197-34203.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J.** (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 2940–2945.
- Kozel NV, Shalygo NV** (2009) Barley leaf antioxidant system under photooxidative stress induced by Rose Bengal. *Russ. J. Plant Physiol.* **56**:316–322.
- Kubo A, Aono M, Nakajima N, Saji H, Tanaka K, Kondo N** (1999) Differential responses in activity of antioxidant enzymes to different environmental stresses in *Arabidopsis thaliana*. *J. Plant Res.* **112**:279–90.
- Kwak JM, Mori IC, Pei ZM, Leonhardt N, Torres MA, Dangl JL, Bloom RE, Bodde S, Jones JD, Schroeder JI** (2003). NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS dependent ABA signalling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **22**: 2623–2633.
- Laing WA, Wright MA, Cooney J, Bulley SM** (2007) The missing step of the L-galactose pathway of ascorbate biosynthesis in plants, an L-galactose guanylyltransferase, increases leaf ascorbate content *PNAS* **104**: 9534-9539
- Lazzarotto F, Teixeira FK, Rosa SB, Dunand C, Fernandes C, Fontenele AD, et al.** (2011) Ascorbate peroxidase-related (APx-R) is a new heme-containing protein functionally associated with ascorbate peroxidase but evolutionarily divergent. *New Phytol.* **191**:234–250
- Lee YP, Baek KH, Lee HS, Kwak SS, Bang JW, Kwon SY** (2010). Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn-superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions. *J. Exp. Bot.* **61**: 2499–2506.
- Leferink NGH** (2009) Characterization and redesign of galactonolactone dehydrogenase, a flavoprotein producing vitamin C PhD thesis. Wageningen University, The Netherlands.
- Leferink NGH, van den Berg WAM, van Berkel WJH** (2008) L-Galactono-c-lactone dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*, a flavoprotein involved in vitamin C biosynthesis *FEBS J.* **275**: 713–726.
- Leferink NGH, van Duijn E, Barendregt A, Heck AJR, van Berkel WJH** (2009) Galactonolactone Dehydrogenase Requires a Redox-Sensitive Thiol for Optimal Production of Vitamin C. *Plant Physiol.* **150**: 596–605.
- Lemaire-Chamley M, Petit J, Garcia V, Just D, Baldet P, Germain V, Fagard M, Mouassite M, Cheniclet C, Rothan C** (2005) . Changes in transcriptional profiles are associated with early fruit tissue specialization in tomato. *Plant Physiol.* **139**: 750-769
- Leterrier M, Corpas FJ, Barroso JB, Sandalio LM, del Río LA** (2005) Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiol.* **138** :2111–2123.
- Li F, Wu QY, Sun YL, Wang LY, Yang XH, Meng QW** (2010) Overexpression of chloroplastic monodehydroascorbate reductase enhanced tolerance to temperature and methyl viologen-mediated oxidative stresses. *Physiologia Plant.* **139**:421–434
- Li J, Cui M, Li M, Wang X, Liang D, Ma F** (2013) Expression pattern and promoter analysis of the gene encoding GDP-d-mannose 3',5'-epimerase under abiotic stresses and applications of hormones by kiwifruit *Scientia Hort.* **150**: 187–194

- Li J, Cui M, Li M, Wang X, Liang D, Ma F** (2013) Expression pattern and promoter analysis of the gene encoding GDP-d-mannose 3',5'-epimerase under abiotic stresses and applications of hormones by kiwifruit *Scientia Hort.* **150**: 187–194
- Li M, Ma F, Guo C, Liu J** (2010) Ascorbic acid formation and profiling of genes expressed in its synthesis and recycling in apple leaves of different ages *Plant Physiol. Biochem.* **48**: 216–224
- Linster CL, van Schaftingen E** (2007) Vitamin C. Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J.* **274**: 1–22
- Liso R, De Tullio MC, Ciraci S, Balestrini R, La Rocca N, Bruno L, Chiappetta A, Bitonti MB, Bonfante P, Arigoni O** (2004) Localization of ascorbic acid, ascorbic acid oxidase and glutathione in roots of *Cucurbita maxima* L. *J. Exp. Bot.* **55**: 2589–2597.
- Liu Y, Yu L, Wang R** (2011) Level of ascorbic acid in transgenic rice for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase overexpressing or suppressed is associated with plant growth and seed set. *Acta Physiol. Plant.* **33**:1353–1363.
- Locato V, de Pinto MC, De Gara L** (2009) Different involvement of the mitochondrial, plastidial and cytosolic ascorbate-glutathione redox enzymes in heat shock responses. *Physiol. Plant.* **135**:296–306
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler GL** (2004). Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiol.* **134**: 200–205
- Loscos J, Matamoros MA, Becana M** (2008) Ascorbate and homoglutathione metabolism in common bean nodules under stress conditions and during natural senescence. *Plant Physiol.* **146**: 1282–1292.
- 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.
- Ma G, Wang R, Wang CR, Kato M, Yamawaki K, Qin FF, Xu HL** (2009) Effect of 1-methylcyclopropene on expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors in post-harvest broccoli. *Plant Growth Regul.* **57**, 223–232.
- Major LL, Wolucka BA, Naismith JH** (2005) Structure and function of GDP-mannose-3',5'-epimerase: an enzyme which performs three chemical reactions at the same active site. *J. Am. Chem. Soc.* **127**:18309–18320
- Manaa A, Ahmed HB, Valot B, Bouchet JP, Aschi-Smiti S, Causse M, Faurobert M** (2011) Salt and genotype impact on plant physiology and root proteome variations in tomato *J. Exp. Bot.* **62**: 2797–2813
- Mapson LW, Breslow E** (1958) Biological synthesis of ascorbic acid: L-galactono-γ-lactone dehydrogenase. *Biochem. J.* **68**: 395–406.
- Martinelli F, Uratsu SL, Reagan RL, Chen Y, Tricoli D, Fiehn O, Rocke DM, Gasser CS, Dandekar AM** (2009) Gene regulation in parthenocarpic tomato fruit. *J. Exp. Bot.* **60**: 3873–3890.
- Maruta T, Tanouchi A, Tamoi M, Yabuta Y, Yoshimura K, Ishikawa T, Shigeoka S** (2010) Arabidopsis Chloroplastic Ascorbate Peroxidase Isoenzymes Play a Dual Role in Photoprotection and Gene Regulation under Photooxidative Stress *Plant Cell Physiol.* **51**: 190–200.
- Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP** (1998) The parthenocarpic fruit (pat) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development *Development* **125**: 107–111
- Messerschmidt A, Rossi A, Ladenstein R, Huber R, Bolognesi M, Gatti G, Marchesini A, Petruzzelli R & Finazzi-Agro' A** (1989) X-ray crystal structure of the blue oxidase ascorbate oxidase from zucchini. Analysis of the polypeptide fold and a model of the copper sites and ligands. *J. Mol. Biol.* **206**: 513–529.

- Messerschmidt A, Steigemann W, Huber R, Lang G & Kroneck PM** (1992) X-ray crystallographic characterization of type-2-depleted ascorbate oxidase from zucchini. *Eur. J. Biochem.* **209**: 597–602.
- Mezzetti B, Landi L, Pandolfini T, Spena A** (2004) The DefH9-iaaM auxin-synthesizing gene increases plant fecundity and fruit production in strawberry and raspberry. *BMC Biotechnol.* **4**: 1-10.
- Millar AH, Mittova V, Kiddle G, Heazlewood JL, Bartoli CG, Theodoulou FL, Foyer CH** (2003) Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol.* **133**: 443–447
- Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* **7**: 405–410.
- Mittler R, Poulos TL** (2005) Ascorbate peroxidase. In *Antioxidants and Reactive Oxygen Species in Plants* (Smirnoff, N., ed.), pp. 87–100, Blackwell Publishing, Oxford
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F** (2004) Reactive oxygen gene network of plants *Trends Plant Sci.* **9**: 1360-1385.
- Mittova V, Tal M, Volokita M, Guy M** (2002) Salt stress induces up-regulation of an efficient chloroplast antioxidant system in the salt-tolerant wild tomato species *Lycopersicon pennellii* but not in the cultivated species. – *Physiol. Plant.* **115**: 393- 400.
- Miyake C, Asada K** (1994) Ferredoxin-dependent photoreduction of monodehydroascorbate radicals in spinach thylakoids. *Plant Cell Physiol.* **35**: 539–549.
- Molesini B, Pandolfini T, Rotino GL, Dani V, Spena A** (2009) *Aucsia* gene silencing causes parthenocarpic fruit development in tomato *Plant Physiology* **149**: 534-548
- Mullineaux P, Karpinski S** (2002) Signal transduction in response to excess light: getting out of the chloroplast. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 43–48.
- Munyaka AW, Makule EE, Oey I, Loey AV, Hendrickx M** (2010) Thermal Stability of L-Ascorbic Acid and Ascorbic Acid Oxidase in Broccoli *J. Food Sci.* **75**: 336-340.
- Murtaza G, Asghar A, Majid SA** (2010) Changes in specific activity of ascorbate peroxidase during seed development of pea (*Pisum sativum* L.) treated with salicylic acid *Afr. J. of Biotech.* **9**: 5333-5337
- Murthy SS, Zilinskas BA, Molecular J** (1994) Cloning and characterization of a cDNA encoding pea monodehydroascorbate reductase. *Biol. Chem.* **269**: 31129–31133.
- Mutsuda M, Ishikawa T, Takeda T, Shigeoka S** (1995) Subcellular localization and properties of L-galactono- γ -lactone dehydrogenase in spinach leaves. *Biosci Biotechnol Biochem* **59**: 1983-1984
- Najami N, Janda T, Barriah W, Kayam G, Tal M, Guy M, Volokita M** (2008) Ascorbate peroxidase gene family in tomato: its identification and characterization *Mol. Genet. Genom.* **279**: 171–182
- Navrot N, Rouhier N, Gelhaye E, Jaquot JP** (2007) Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria, *Physiol. Plant.* **129**: 185-195.
- Neill S, Desikan R, Hancock J** (2002) Hydrogen peroxide signalling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 388–395
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**: 249–79
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH** (2002) Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling. *J. Exp. Bot.* **53**: 1283-1304

- Nuez F, Costa J, Cuartero J** (1986) Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties “Sub-Artic Plenty”, “75/59” and “Severianin”. *Z Pflanzenzucht* **96**: 200-206.
- Oba K, Ishikawa S, Nishikawa M, Mizuno H, Yamamoto T** (1995) Purification and properties of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis, from sweet potato roots. *J. Biol. Chem.* **117**: 120–124.
- Oms-Oliu G, Hertoga MLATM, van de Poela B., Ampofo-Asiama J, Geeraerd AH, Nicolai BM** (2011) Metabolic characterization of tomato fruit during preharvest development, ripening, and postharvest shelf-life. *Postharv. Biol. Tech.* **62**: 7–16
- Østergaard J, Persiau G, Davey MW, Bauw G, Van Montagu M.** (1997) Isolation of a cDNA coding for L-galactono-c-lactone dehydrogenase, an enzyme involved in the biosynthesis of ascorbic acid in plants. Purification, characterization, cDNA cloning, and expression in yeast. *J. Biol. Chem.* **272**: 30009– 30016.
- Overvoorde PJ, Okushima Y, Alonso JM, Chan A, Chang C, Ecker JR, Hughes B, Liu A, Onodera C, Quach H, Smith A, Yu G, Theologis A** (2005) Functional genomic analysis of the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID gene family members in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell.* **17**:3282-3300
- Panchuk II, Volkov RA, Schoffl F** (2002) Heat stress and heat shock transcription factor- dependent expression and activity of ascorbate peroxidase in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* **129**: 838–853.
- Pandolfini T, Molesini B, Spena A** (2007) Molecular dissection of the role of auxin in fruit initiation. *Trends Plant Sci.* **12**: 327–329
- Pandolfini T, Rotino GL, Camerini S, Defez R, Spena A** (2002) Optimization of transgene action at the post-transcriptional level: high quality parthenocarpic fruits in industrial tomatoes. *BMC Biotech.* **2**:1-11
- Pang CH, Wang BS** (2010) Role of ascorbate peroxidase and glutathione reductase in ascorbate–glutathione cycle and stress tolerance in plants. *Ascorbate-Glutathione Pathway and Stress Tolerance in Plants*. pp. 91-113 Springer New York
- Pateraki I, Sanmartin M, Kalamaki MS, Gerasopoulos D, Kanellis AK** (2004) Molecular characterization and expression studies during melon fruit development and ripening of L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *J. Exp. Bot.* **55**: 1623 – 1633.
- Pei ZM, Murata Y, Benning G, Thomine S, Klüsener B, Allen GJ, Grill E, Schroeder JI** (2000) Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature* **406**: 731–734.
- Phiiouze J** (1983) Parthenocarpie naturelle chez la tomate. 1. *Revue bibliographique. - Agronomie* **3**: 311–320
- Pignocchi C, Fletcher JM, Wilkinson JE, Barnes JD, Foyer CH** (2003) The function of ascorbate oxidase in tobacco. *Plant Physiol.* **132**: 1631–1641.
- Pignocchi C, Kiddle G, Hernández I, Foster SJ, Asensi A, Taybi T, Barnes J, Foyer CH** (2006) Ascorbate oxidase-dependent changes in the redox state of the apoplast modulate gene transcript accumulation leading to modified hormone signaling and orchestration of defense processes in tobacco. *Plant Physiol.* **141**: 423–435.
- Pineau B, Layoune O, Danon A, De Paepe R** (2008) L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase is required for the accumulation of plant respiratory complex I. *J Biol. Chem.* **283**: 32500–32505.
- Pukacka S, Ratajczak E** (2010) Ascorbate and glutathione metabolism during development and desiccation of beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Plant Growth Regul.* **62**:77–83.

- Remakers C, Ruijter JM, Deprez RH, Moorman AF** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction PCR. data. *Neurosci. Letters* **339**: 62–66.
- Ren Z, Li Z, Miao Q, Yang Y, Deng W, Hao Y** (2011) The auxin receptor homologue in *Solanum lycopersicum* stimulates tomato fruit set and leaf morphogenesis. *J. Exp. Bot.* **62**: 2815–2826
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermel S, Inze D, Mittler R** (2002) Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase *Plant J.* **32**: 329–342.
- Sairam RK, Srivastava GC, Agarwal S, Meena RC** (2005) Differences in antioxidant activity in response to salinity stress in tolerant and susceptible wheat genotypes. *Biol. Plant.* **49**:85–91.
- Sanmartin M** (2002) Regulation of melon ascorbate oxidase gene expression and effect of its modification in transgenic tobacco and melon plants. PhD thesis, University of Valencia, Spain.
- Sanmartin M, Drogoudi PA, Lyons T, Pateraki I, Barnes J, Kanellis AK** (2003) Over-expression of ascorbate oxidase in the apoplast of transgenic tobacco results in altered ascorbate and glutathione redox states and increased sensitivity to ozone. *Planta* **216**: 918–928.
- Sano S, Tao S, Endo Y, Inaba T, Hossain MA, Miyake C, Matsuo M, Aoki H, Asada K, Saito K** (2005) Purification and cDNA cloning of chloroplastic monodehydroascorbate reductase from spinach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**: 762–772.
- Scheible WR, Pauly M** (2004). Glycosyltransferases and cell wall biosynthesis: novel players and insights. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 285–295.
- Schertl P, Sunderhaus S, Klodmann J, Grozoff GE, Bartoli CG, Braun HP** (2012) L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase (GLDH) forms part of three subcomplexes of mitochondrial complex I in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **287**: 14412–14419
- Schijlen E, de Vos CHR, Martens S, Jonker HH, Rosin FM, et al.** (2007) RNA interference silencing of chalcone synthase, the first step in the flavonoid biosynthesis pathway, leads to parthenocarpic tomato fruits. *Plant Physiol.* **144**: 1520–1530
- Selote DS, Chopra RK** (2004) Drought-induced spikelet sterility is associated with an inefficient antioxidant defense in rice panicles. *Physiol. Plant.* **121**:462–471
- Selote DS, Khanna-Chopra R** (2006) Drought acclimation confers oxidative stress tolerance by inducing coordinated antioxidant defense at cellular and subcellular level in leaves of wheat seedlings, *Physiol. Plant.* **127**: 494–506.
- Serrani JC, Fos M, Atares A, Garcia-Martinez JL** (2008) Effect of gibberellin and auxin on parthenocarpic fruit growth induction in the cv. Micro-tom of tomato. *Plant Growth Regul.* **26**: 211–221.
- Shi S, Ma F, Li Y, Feng F, Shang Z** (2012) Overexpression of L-galactono-1, 4-lactone dehydrogenase (GLDH) in Lanzhou lily (*Lilium davidii* var. unicolor) via particle bombardment-mediated transformation *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **48**: 1–6.
- Shigeoka S, Ishikawa T, Tamoi M, Miyagawa Y, Takeda T, Yabuta Y** (2002) Regulation and function of ascorbate peroxidase isoenzymes. *J. Exp. Bot.* **53**: 1305–1319.
- Shu DF, Wang LY, Duan M, Deng YS, Meng QW** (2011) Antisense-mediated depletion of tomato chloroplast glutathione reductase enhances susceptibility to chilling stress. *Plant Physiol. Biochem.* **49**:1228–1237.

- Siendones E, González-Reyes JA, Santos-Ocana, Navas P, Córdoba F** (1999) Biosynthesis of ascorbic acid in kidney bean: L-galactono-γ-lactone dehydrogenase is an intrinsic protein located at the mitochondrial inner membrane. *Plant Physiol.* **120**: 907–912.
- Smirnoff N** (2001) L-ascorbic acid biosynthesis. *Vitam. Horm.* **61**: 241-266
- Smirnoff N** (2011) Vitamin C: The metabolism and functions of ascorbic acid in plants, *Advances in Botanical Research* **9**: 109-177
- Smirnoff N, Pallanca JE** (1996) Ascorbate metabolism in relation to oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **24**: 472-478
- Smirnoff N, Wheeler GL** (2000) Ascorbic acid in plants: biosynthesis and function. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **35**: 291–314
- Snowdon A** (2010) Post harvest diseases and disorders of fruits and vegetables Mason publishing Ltd ISBN: 978-1-84076-598-4 pp 53.
- Stevens R, Page D, Gouble B, Garchery C, Zamir D, Causse M** (2008) Tomato fruit ascorbic acid content is linked with monodehydro- ascorbate reductase activity and tolerance to chilling stress. *Plant Cell Environ.* **31**:1086–1096
- Stevens RG, Creissen GP, Mullineaux PM** (1997) Cloning and characterization of a cytosolic glutathione reductase cDNA from pea (*Pisum sativum* L.) and its expression in response to stress. *Plant Mol. Biol.* **35**:641–654.
- Suza WP, Avila CA, Carruthers K, Kulkarni S, Goggin FL, Lorence A** (2010) Exploring the impact of wounding and jasmonates on ascorbate metabolism. *Plant Physiol. Biochem.* **48**: 337-350
- Suzuki N, Mittler R** (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* **126**: 45-51.
- Tabata K, Oba K, Suzyki K, Esaka M** (2001) Generation and properties of ascorbic acid-deficient transgenic tobacco cells expressing antisense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Plant J.* **27**: 139–148
- Tabata K, Takaoka T, Esaka M** (2002) Gene expression of ascorbic acid-related enzymes in tobacco. *Phytochem.* **61**: 631–63
- Tamaoki M, Mukai F, Asai N, et al.** (2003). Light-controlled expression of a gene encoding L-galactono-γ-lactone dehydrogenase which affects ascorbate pool size in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* **164**: 1111 – 1117 .
- Tatsumi Y, Isogai M, Sei S, Srilaong V** (2006). Changes in ascorbic acid content and ascorbate metabolism-related enzyme activities during storage in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and balsam pear (*Momordica charantia* L.). *Acta Hort.* **712**: 755–762.
- Tokunaga T, Miyahara K, Tabata K, Esaka M** (2005). Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for L-galactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta* **220**: 854–863.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JDG** (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proc. Natl Acad. Sci.* **99**: 517–522.
- Ünyayar S, Kele Y, Çekiç FÖ** (2005) The Antioxidative Response of Two Tomato Species with Different Drought Tolerance as a Result of Drought and Cadmium Stress Combination, *Plant Soil Environ.* **51**: 57–64.

- Vaidyanathan H, Sivakumar P, Chakrabarty R, Thomas G** (2003) Scavenging of reactive oxygen species in NaCl-stressed rice (*Oryza sativa* L.) differential responses in salt tolerant and sensitive varieties. *Plant Sci.* **165**:1411–1418.
- Valenti D, Vacca RA, de Pinto MC, De Gara L, Marra E, Passarella S** (2007) In the early phase of programmed cell death in Tobacco Bright Yellow 2 cells the mitochondrial adenine nucleotide translocator, adenylate kinase and nucleoside diphosphate kinase are impaired in a reactive oxygen species-dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**: 66-78.
- Valpuesta V, Botella MA** (2004) Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant. Sci.* **9**: 573–577.
- van der Vorst JGAJ, van Kooten O, Luning PA** (2011). Towards a Diagnostic Instrument to Identify Improvement Opportunities for Quality Controlled Logistics in Agrifood Supply Chain Networks. *International J. Food Sys. Dyn.* **2**: 1-13.
- Vardi A, Levin I, Carmi N** (2008) Induction of seedlessness in citrus: from classical techniques to emerging biotechnological approaches. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **133**: 117-126.
- Veljovic-Jovanovic SD, Pignocchi C, Noctor G, Foyer CH** (2001) Low ascorbic acid in the vtc-1 mutant of *Arabidopsis* is associated with decreased growth and intracellular redistribution of the antioxidant system. *Plant Physiol.* **127**: 426-435.
- Volkov RA, Panchuk II, Mullineaux PM, Schöffl F** (2006) Heat stress-induced H₂O₂ is required for effective expression of heat shock genes in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **61**:733–746.
- Wada K, Tada T, Nakamura Y, Ishikawa T, Yabuta Y, Yoshimura K, Shigeoka S, Nishimura K** (2003) Crystal Structure of Chloroplastic Ascorbate Peroxidase from Tobacco Plants and Structural Insights into its Instability *J. Biochem.* **134**: 239-244.
- Wolucka BA, Van Montagu M** (2007) GDP-Mannose 3',5'-Epimerase Forms GDP-L-gulose, a Putative Intermediate for the de Novo Biosynthesis of Vitamin C in Plants *J. Biol. Chem.* **278**:47483-90
- Yabuta Y, Yoshimura K, Takeda T, Shigeoka S** (2000) Molecular characterization of tobacco mitochondrial l-galactono-c-lactone dehydrogenase and its expression in *Escherichia coli*. *Plant Cell Physiol* **41**: 666–675.
- Yahia EM, Contreras-Padilla M, Gonzalez-Aguilar G** (2001) Ascorbic acid content in relation to ascorbic acid oxidase activity and polyamine content in tomato and bell pepper fruits during development, maturation and senescence. *Food Sci. Tech.* **34**: 452–457.
- Yamane K, Mitsuya S, Taniguchi M, Miyake H** (2010) Transcription Profiles of Genes Encoding Catalase and Ascorbate Peroxidase in the Rice Leaf Tissues under Salinity *Plant Prod. Sci.* **13**: 164—168.
- Yan-Xia H, Hao-Ru T, Yong Z, Ya L, Qing C** (2009) Cloning and Expression Analysis of Ascorbate Peroxidase Gene During Fruit Development and Ripening in *Fragaria × ananassa* cv. Toyonaka *W. Jour. of Agricul. Sci.* **5(6)**: 675-679
- Yang HL, Zhao YR, Wang CL, Yang ZL, Zeng QY, and Lu H** (2009) Molecular characterization of a dehydroascorbate reductase from *Pinus bungeana*. *J. Integr. Plant Biol.* **51**: 993-1001.
- Yoshida S, Tamaoki M, Shikano T, Nakajima N, Ogawa D, Ioki M, et al.** (2006) Cytosolic dehydroascorbate reductase is important for ozone tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **47**:304–308.
- Yoshimura K, Ishikawa T, Nakamura Y, Tamoi M, Takeda T, Tada T** (1998) Comparative study on recombinant chloroplastic and cytosolic ascorbate peroxidase isozymes of spinach. *Arch. Biochem. Biophys.* **353**: 55–63.

- Yoshimura K, Yabuta Y, Ishikawa T, Shigeoka S** (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol.* **123**:223–233.
- Zerdin K, Michael LR, Vermue J** (2003) The vitamin C content of orange juice packed in an oxygen scavenger material. *Food Chem.* **82**: 387-395.
- Zhang C, Liu J, Zhang Y, Cai X, Gong P, Zhang J, Wang T, Li H, Ye Z** (2011) Overexpression of SIGMEs leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep.* **30**: 389–398.
- Zhang W, Lorence A, Gruszewski HA, Chevone BI, Nessler CL** (2009) AMR1, an Arabidopsis gene that coordinately and negatively regulates the mannose/l-galactose ascorbic acid biosynthetic pathway, *Plant Physiol.* **150**: 942–950.
- Zhang Y, Li H, Shu W, Zhang C, Ye Z** (2011) RNA interference of a mitochondrial APX gene improves vitamin C accumulation in tomato fruit *Scientia Hort.* **129**:220–226.
- Zhang Y, Li H, Shu W, Zhang C, Zhang W, Ye Z** (2010) Suppressed expression of Ascorbate Oxidase Gene, promotes AsA accumulation in tomato fruit. *Plant Mol Biol Rep* **29**: 638-645.
- Zheng Y, Funga RWM, Wang SY, Wang CY** (2008) Transcript levels of antioxidative genes and oxygen radical scavenging enzyme activities in chilled zucchini squash in response to superatmospheric oxygen *Postharv. Biol. Technol.* **47**: 151–158.
- Zigstra S** (1985). Parthenocarpic in tomaat: twee nieuwe lijnen uit soortkruising. *Zaadbelen* **4**: 92-94
- Zou L, Li H, Ouyang B, Zhang J, Ye Z** (2006) Cloning and mapping of genes involved in tomato ascorbic acid biosynthesis and metabolism. *Plant Sci.* **170**: 120–127.
- Zou H, Meng G, Wei R, Zhang Y, Chen Y, Jia L** (2012) Biochemical properties of oxidases of Yali pear *Afr. J. Biotech.* **11**: 11610-11619
- Zsigmond L, Tomasskovics B, Deák V, Rigó G, Szabados L, Bánhegyi G, Szarka A** (2011) Enhanced activity of galactono-1,4-lactone dehydrogenase and ascorbate-glutathione cycle in mitochondria from complex III deficient Arabidopsis *Plant Physiol. and Biochem.* **49**: 809-815.