

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**Μελέτη της α-γαλακτοζιδάσης σε ένσπερους και
άσπερους καρπούς τομάτας τύπου «cherry»**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ: ΓΕΝΕΤΙΚΑ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΙ ΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ**

**ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗ ΚΑΘΗΓΗΤΗ
ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΙΒΑΛΑΚΙ**

ΜΠΕΝΟΒΙΑΣ ΑΡΓΥΡΗΣ

ΑΘΗΝΑ 2014

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μελέτη της α-γαλακτοσιδάσης σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς
τομάτας τύπου «cherry»

Εξεταστική επιτροπή:

Αν. Καθηγητής Γ. Αιβαλάκης, Επιβλέπων

Καθηγητής Σ. Κίντζιος, Μέλος

Καθηγητής Κ. Ακουμιανάκης, Μέλος

ΜΠΕΝΟΒΙΑΣ Ν. ΑΡΓΥΡΙΟΣ

Η ανάθεση της παρούσας μελέτης έγινε με απόφαση της υπ. αριθ. 15 της 27-06-2012 Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο της Φυσιολογίας Φυτών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι, στα πλαίσια του προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Βιοτεχνολογίας.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω:

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι, για την αμέριστη και διαρκή βοήθεια που μου παρείχε κατά την εκπόνηση της μελέτης.

Τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Σ. Κίντζιο και Καθηγητή κ. Κ. Ακουμιανάκη για τις διορθώσεις που εισηγήθηκαν καθώς και για την αξιολόγηση της παρούσας μελέτης.

Τη δρ Νικολοπούλου Μιλένα και το δρ Τσανικλίδη Γιώργο για τη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης του πειράματος στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών.

Την οικογένειά μου Νίκο, Γεωργία, Γιώργο καθώς και την Ελένη για την υπομονή και τη συμπαράστασή τους όλα αυτά τα χρόνια.

Μπενοβίας Αργύρης

Δεκέμβριος 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	8
Abstract.....	9
1 Εισαγωγή.....	10
1.1 Η τομάτα cherry	10
1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας.....	10
1.1.2 Η διατροφική αξία του καρπού της τομάτας τύπου cherry.....	12
1.1.3 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry.....	13
1.1.4 Μορφολογία και ανατομία του καρπού.....	14
1.1.5 Η ανάπτυξη του καρπού.....	16
1.2 Η παρθενοκαρπία.....	21
1.2.1 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα.....	22
1.2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία.....	23
1.2.3 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας.....	23
1.3 Υδατάνθρακες.....	24
1.4 α-γαλακτοζιδάση.....	25
1.4.1 Δομή του ενζύμου.....	29
1.4.2 Δραστικότητα του ενζύμου.....	30
1.4.3 Γονίδια.....	30
1.5 Σκοπός της εργασίας.....	31
2 Υλικά και μέθοδοι.....	32
2.1 Το φυτικό υλικό.....	32
2.2 Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.....	34
2.3 Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της όξινης α-γαλακτοζιδάσης.....	36

2.4 Η ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών και η ανίχνευση της α-γαλακτοζιδάσης στη πηκτή.....	36
2.5 Η ανοσοβιοχημική μελέτη.....	37
2.6 Ο ανοσοεντοπισμός της α-γαλακτοζιδάσης στις τομές καρπών.....	39
2.7 Ηλεκτροφορήσεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών.....	41
2.8 Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς.....	44
2.9 Παρασκευή cDNA.....	50
2.10 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	51
3 Αποτελέσματα.....	53
3.1 Χαρακτηρισμός cDNA κλώνων που κωδικοποιούν την α-γαλακτοζιδάση στην τομάτα.....	53
3.2 Η έκφραση του γονιδίου της α-γαλακτοζιδάσης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης παρθηκοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας.....	54
3.3 Έλεγχος καταλληλότητας αντισωμάτων α-γαλακτοζιδάσης.....	55
3.4 Ανοσοεντοπισμός της α-γαλακτοζιδάσης στις τομές των καρπών.....	56
3.4.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm.....	56
3.4.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm.....	58
3.4.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού.....	59
3.4.4 Καρπός στο στάδιο αλλαγής χρώματος.....	60
3.4.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού.....	61
3.5 In situ εντοπισμός της δραστηριότητας της α-γαλακτοζιδάσης.....	62
3.5.1 Ανώριμος πράσινος καρπός 15mm.....	62
3.5.2 Ωριμος πράσινος καρπός.....	63
3.5. Καρπός στο στάδιο αλλαγής χρώματος.....	63
3.6 Ο προσδιορισμός της in vitro δραστηριότητας της α-γαλακτοζιδάσης.....	63
3.7 Ισοηλεκτρική εστίαση.....	64
4 Συζήτηση.....	66

5 Συμπεράσματα.....	68
6 Βιβλιογραφία.....	69

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκε η α-γαλακτοζιδάση σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου cherry, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Τα στάδια που επιλέχθηκαν ήταν νεαροί καρποί διαμέτρου 15mm, ώριμοι πράσινοι καρποί, ώριμοι καρποί στο στάδιο αλλαγής χρώματος και ώριμοι κόκκινοι καρποί. Οι παρκενοκαρπικοί καρποί αναπτύχθηκαν μετά την αφαίρεση των ανθών από κλειστά άνθη και την ακόλουθη εφαρμογή 50ppm β-ναφθοξεικού οξέος.

Για τη μελέτη του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ο ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης και ο *in situ* εντοπισμός της δραστηριότητας της α-γαλακτοζιδάσης. Η α-γαλακτοζιδάση εντοπίστηκε τόσο με τα αντισώματα όσο και *in situ* στο περικάρπιο και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών. Στους ένσπερμους καρπούς το ένζυμο εντοπίστηκε στις σπερματικές βλάστες, στα όργανα και στο ενδοσπέρμιο του σπέρματος.

Η ισοηλεκτρική εστίαση αποκάλυψε ένα ισοηλεκτρικό σημείο μεταξύ 5,6-5,8. Η *in vitro* δραστηριότητα της α-γαλακτοζιδάσης ήταν υψηλότερη στους ένσπερμους καρπούς και στους ανώριμους πράσινους καρπούς 15mm και στη συνέχεια μειώθηκε. Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων της α-γαλακτοζιδάσης ήταν υψηλότερη στους ένσπερμους καρπούς εκτός από τους ανώριμους πράσινους καρπούς των 15mm. Επίσης, ο μέγιστος αριθμός μεταγραφημάτων βρέθηκε στο στάδιο ώριμου πράσινου καρπού και στη συνέχεια άρχισε να μειώνεται. Τα αποτελέσματα εν τω συνόλω τους υποδεικνύουν ότι η όξινη α-γαλακτοζιδάση της τομάτας σχετίζεται με την αύξηση των κυττάρων.

Abstract

In the present study, α -galactosidase was studied in seeded and parthenocarpic fruits of cherry tomato during their growth. The selected stages of fruits were: developing fruits of 15mm diameter, mature green, breaker and red ripe fruits. Parthenocarpic fruits were developed after the application of 50ppm β -naphthoxyacetic acid on emasculated closed flowers.

In this study the enzyme activity, the protein immunolocalization, in situ localization of enzyme activity as well as the study of transcript accumulation was used.

Alpha-galactosidase was heavily localized in vascular bundles, ovules and pericarp of all organs examined of parthenocarpic and seeded fruits. In seeded fruits the α -galactosidase protein was also heavily localized in embryo organs and in the endosperm. The activity of the enzyme was higher in the stage of 15mm developing fruits in both seeded and parthenocarpic fruits, and then declined.

Isoelectric focusing of the enzyme shown a pI between 5,6-5,8, whereas the transcript accumulation was higher in seeded fruits having maximum accumulation at mature green stage.

These results suggest that the acid α galactosidase in tomato could be related to the cell growth.

1. Εισαγωγή

1.1. Η τομάτα cherry

1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας

Η τομάτα ταξινομείται στο γένος *Solanum* και είδος *lycopersicum* της οικογένειας *Solanaceae* (Heiser & Anderson, 1999). Ανατρέχοντας στο παρελθόν, το 1753, ο Σουηδός βοτανολόγος Linnaeus ονόμασε την τομάτα *Solanum lycopersicon* αλλά 15 χρόνια αργότερα ο Muller ταξινόμησε την τομάτα στο νέο γένος *Lycopersicon* (*Lycopersicon esculentum*) (Taylor, 1986). Πρόσφατα όμως οι βοτανολόγοι απέδωσαν στην τομάτα το αρχικό της όνομα *Solanum lycopersicum* (Heiser and Anderson, 1999).

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

Φυλογένεση - βοτανική ταξινόμηση και καταγωγή της τομάτας τύπου cherry.

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

Η τομάτα τύπου cherry (*S. lycopersicum* var. *cerasiforme*) είναι σχεδόν βέβαιο ότι, αποτελεί τον άμεσο πρόγονο των σύγχρονων καλλιεργουμένων τύπων τομάτας, ενώ, είναι και το μοναδικό άγριο είδος τομάτας που απαντάται και εκτός Νότιας Αμερικής (Taylor, 1986).

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

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

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

1.1.2 Διαιτητική αξία του καρπού της τομάτας τύπου cherry.

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

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

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

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

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

1.1.3 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry.

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

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

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

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

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

καταναλωτές για το ελκυστικό κόκκινο τους χρώμα, το μικρό τους μέγεθος και το ωραίο τους άρωμα.

1.1.4 Μορφολογία και ανατομία του καρπού

Ο καρπός της τομάτας είναι πολύχωρος ράγα, με ποικίλα σχήματα και αποτελείται από το περικάρπιο, το ζελατινώδες παρέγχυμα, μέσα στον οποίο βρίσκονται τα σπέρματα και τον πλακούντα (**Εικόνα 1.1**).

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

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

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

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

στο *L. pimpinellifolium* κυτταρική διαίρεση παρατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού (Houghtalin, 1935).

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



Εικόνα 1.1: Ανατομία δίχωρου καρπού τομάτας τύπου cherry

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

ζελατινοειδή υφή. Σε επόμενα στάδια ανάπτυξης είναι δυνατόν να συσσωρεύεται διακυτταρικό υγρό στους χώρους. Παρά τον παραπάνω εκφυλισμό, οι πρωτοπλάστες συνήθως παραμένουν άθικτοι.

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

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

1.1.5 Η ανάπτυξη του καρπού

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

σηματισμός του καρπού ολοκληρώνεται μετά και την τρίτη περίοδο που διαρκεί δύο εβδομάδες και που χαρακτηρίζεται από αργή ανάπτυξη. Στη φάση αυτή παρατηρείται μικρή αύξηση του βάρους αλλά και έντονες μεταβολικές διεργασίες στον καρπό.

Πρώιμη ανάπτυξη καρπού.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ωριμος πράσινος καρπός

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

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

Ωρίμανση του καρπού

Η μετατροπή του καρπού της τομάτας από το ώριμο πράσινο στάδιο στο πλήρως ώριμο κόκκινο περιλαμβάνει δραματικές αλλαγές στο χρώμα, στη σύνθεση, στο άρωμα, στη γεύση και στη δομή του. Η ωρίμανση αποτελεί μια ιδιαίτερη διαδικασία που περιλαμβάνει αντιδράσεις σύνθεσης αλλά και αποδόμησης. Μάλιστα, επιφέρει αλλαγές στο μεταβολισμό και στην έκφραση γονιδίων, οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντικές διαφοροποιήσεις της ποιότητας του καρπού. Οι αλλαγές αυτές είναι συντονισμένες καθώς υφίστανται στη πλειονότητα των κυττάρων του καρπού και περιλαμβάνουν αλλαγές σε κάθε υποκυτταρικό διαμέρισμα. Οι διάφορες όψεις της ωρίμανσης φαίνεται να συντονίζονται και να ρυθμίζονται από φυτικές ορμόνες αλλά μπορούν επίσης και να τροποποιηθούν από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες (Grierson and Kader, 1986).

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

Επίσης, κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης παρατηρείται έντονη μείωση του μεγέθους των αμυλόκοκκων και σταδιακά εξαφανίζονται. Παράλληλα, οι μεμβράνες των θυλακοειδών εμφανίζονται με λιγότερα grana, ενώ κάνουν την εμφάνισή τους σταγόνες λιπιδίων που προέρχονται από τα θυλακοειδή. Οι αλλαγές αυτές προμηνύουν την έναρξη της μετατροπής των χλωροπλαστών σε χρωμοπλάστες (Harris and Spurr, 1969). Οι χλωροπλάστες τελικά χάνουν τη χλωροφύλλη τους ενώ σταδιακά οι χαρακτηριστικές δομές των θυλακοειδών εξαφανίζονται και αντικαθίστανται από ένα εσωτερικό σύστημα μεμβρανών που διαθέτει μία χαρακτηριστική κυματοειδή μορφή (Simpson *et al.*, 1976; Crookes and Grierson, 1983).

Σε μερικές περιπτώσεις, οι μεμβράνες αυτές εμφανίζονται με μια βελονοειδή μορφή αλλά είναι επίσης δυνατό να διατάσσονται και συγκεντρικά. Καθώς αναπτύσσονται οι χρωμοπλάστες, συσσωρεύεται το λυκοπένιο με τη βοήθεια του εσωτερικού συστήματος μεμβρανών, ενώ το β-καροτένιο το οποίο διαθέτει διαφορετική διαλυτότητα συσσωρεύεται στα λιποσφαιρίδια.

1.2 Η παρθενοκαρπία

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

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

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

ένταση φωτισμού, η χαμηλή ή υψηλή θερμοκρασία και οι υψηλής εντάσεως άνεμοι (George *et al.*, 1984).

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

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

1.2.1 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα

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

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

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

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

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

1.2.2 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία

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

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

1.2.3 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας

Σύμφωνα με τους Ho & Hewitt (1986) η παραγωγή παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας συχνά συνοδεύεται από την εμφάνιση ανωμαλιών σε αυτούς. Για παράδειγμα καρποί δίχως σπέρματα που παράγονται κάτω από συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών (Asahira et al., 1982) αλλά και από τη χρήση ρυθμιστών ανάπτυξης

(Osborne & Went, 1953) συχνά εμφανίζουν δυσμορφίες. Οι Asahira et al. (1982) κατηγοριοποίησαν τους παραμορφωμένους παρθενοκαρπικούς καρπούς σε πέντε κατηγορίες, καρποί με ρυτιδώσεις/εγκολπώσεις, με σημάδια/κηλίδες στην κορυφή τους, φουσκωμένοι και κούφιοι, μαλακοί πράσινοι και με επιμηκυσμένη και αιχμηρή κορυφή.

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

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

1.3 Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες είναι πολυ-υδροξυαλδεύδες ή πολυ-υδροξυκετόνες (δηλαδή, αλδεύδες ή κετόνες με δυο ή περισσότερες υδροξυλομάδες) ή πολυμερή, τα οποία όταν υδρολυθούν δίνουν τέτοιες ενώσεις. Έχουν γενικό τύπο $C_n(H_2O)_n$. Οι βιολογικής σημασίας υδατάνθρακες ονομάζονται και **σάκχαρα** ή ακόμα και **γλυκίδια**. Αποτελούν το μεγαλύτερο ποσοστό (65-85%) της οργανικής ύλης των περισσότερων ζώντων οργανισμών και επιτελούν πολλαπλούς ρόλους. Κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες με βάση τον αριθμό των μονομερών που τους αποτελούν:

- Μονοσακχαρίτες: μονομερή, απλά σάκχαρα που περιέχουν στο μόριό τους την αλδεϋδική ή την κετονική ομάδα ονομάζονται αλδόζες ή κετόζες αντίστοιχα.

- Ολιγοσακχαρίτες: ενώσεις που αποτελούνται από 2-10 μονοσακχαρίτες οι οποίοι συνδέονται με γλυκοζιτικούς δεσμούς.
- Πολυσακχαρίτες: υδατάνθρακες που περιέχουν περισσότερα των δέκα κατάλοιπα μονοσακχαριτών που συνδέονται μέσω γλυκοζιτικών δεσμών.

Η οικογένεια ολιγοσακχαριτών της ραφινόζης (RFOs) είναι τα πιο κοινά σάκχαρα στους καρπούς των ανώτερων φυτών. Συνθέτονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού και υδρολύονται κατά του φυτρώματος. Αποτελούν σημαντικό συστατικό των μεταφερόμενων μέσω του ηθμού σακχάρων (Haritatos *et al.*, 2000). Οι υδρογονάνθρακες αυτοί αποτελούνται από μονάδες γαλακτόζης που συνδέονται με μόριο σουκρόζης μέσω α-(1→6) γλυκοζιτικών δεσμών. Δρύν προστατευτικά κατά της αποξήρανσης και ως αποθήκη ενέργειας του καρπού. Συμβάλλουν θετικά στη μακροβιότητα των καρπών σε συνθήκες αποθήκευσης. Έρευνες δείχνουν ότι η παραγωγή και συσσώρευση των RFOs σχετίζεται με την έκθεση των φυτών σε καταπονήσεις όπως ψύχους, υψηλής θερμοκρασίας, αφυδάτωσης, αλατότητας (Santarius, 1973; Santarius and Milde, 1977; Hinesley *et al.*, 1992; Ashworth *et al.*, 1993; Wiemken and Ineichen, 1993; Bachmann *et al.*, 1994; Tajiri *et al.*, 2002) και συμβάλλουν θετικά στον εγκλιματισμό των φυτών σε συνθήκες καταπόνησης.

Οι μαννάνες είναι πολυσακχαρίτες, πολυμερή της μανόζης. Είναι αποθησαυριστικοί πολυσακχαρίτες και βρίσκονται στο κυτταρικό τοίχωμα. Οι γαλακτομαννάνες είναι πουςακχαρίτες αποτελούμενοι από σκελετό μανόζης με πλευρικές μονάδες γαλακτόζης.

1.4 Η α-γαλακτοζιδάση (α-gal)

Οι α-γαλακτοζιδάσες είναι ευρέως διαδεδομένες στους μικροοργανισμούς, τα φυτά και τα ζώα. Μερικές από αυτές έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί (Dey and Campillo, 1984).

Η α-γαλακτοζιδάση είναι μια ομοδιμερική γλυκοπρωτεΐνη και κωδικοποιείται από το γονίδιο GLA. Καταλύει την υδρόλυση του 1,6 α-γαλακτοσυλ δεσμού από

ολιγοσακχαρίτες και πολυμερικές γαλακτομαννάνες (Margolles-Clark *et al.*, 1996; Shibuya *et al.*, 1995a, 1997).

Στα φυτά η α-γαλακτοζιδάση εμπλέκεται στο μεταβολισμό διαφόρων μακρομορίων όπως οι γαλακτοολιγοσακχαρίτες, λιπίδια και πρωτεΐνες στα φυτά (Dey and Pridham 1972).

Το ένζυμο απαντάται σε διαφορετικούς ισότυπους, οι οποίοι έχουν βρεθεί σε καρπούς, σπέρματα και φύλλα φυτών. (Chrost and Schmitz 2000; Dey and Del Campillo 1984).

Οι α-γαλακτοζιδάσες ταξινομούνται σε όξινες ή αλκαλικές ανάλογα με το pH που παρουσιάζουν τη βέλτιστη δραστηριότητα τους (Keller and Pharr, 1996). Έχει προταθεί ότι οι όξινες και οι αλκαλικές α-γαλακτοζιδάσες έχουν διαφορετικά χωρικά και χρονικά πρότυπα έκφρασης, καθώς και διαφορετικές λειτουργίες. (Bloechl *et al.*, 2008).

Όξινες α-γαλακτοζιδάσες

Οι περισσότερες που έχουν απομονωθεί από σπέρματα και φύλλα, είναι όξινες και ανήκουν στην οικογένεια 27 γλυκοσυλ-υδρολασών. Οι όξινες α-γαλακτοζιδάσες εμπλέκονται στη διαδικασία της χαλάρωσης του κυτταρικού τοιχώματος και δημιουργίας νέου.

Το φυτικό κυτταρικό τοίχωμα αποτελείται από πολυσακχαρίτες όπως η κυτταρίνη, η ημικυτταρίνη και η πηκτίνη (Carpita and Gibeaut 1993). Η σύνθεση και η αρχιτεκτονική αυτών των μακρομορίων είναι σημαντική για τη διατήρηση της δύναμης εφελκυσμού και τη μηχανική σταθερότητα του κυτταρικού τοιχώματος (Ryden *et al.*, 2003). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και διαφοροποίησης του κυττάρου, το κυτταρικό τοίχωμα συνεχώς μεταβάλλεται. Η πιο ενδιαφέρουσα ερώτηση είναι πως χαλαρώνει το κυτταρικό τοίχωμα κατά τη διάρκεια της αύξησης του κυττάρου για να επιτρέψει την αύξηση του κυττάρου χωρίς να μειώσει τη δύναμη εφελκυσμού.

Επιπρόσθετα, τα κυτταρικά τοιχώματα περιέχουν πολλαπλές γλυκοσυλιωμένες πρωτεΐνες μεταξύ των πολυσακχαριτών. Αρκετές από αυτές θεωρούνται δομικές πρωτεΐνες. (Cassab 1998), ενώ άλλες συμμετέχουν στην

τροποποίηση και αναδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος (Darley *et al.* 2001). Υπάρχουν ενδείξεις ότι μια α-γαλακτοζιδάση ίσως παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φύλλων, χαλαρώνοντας το κυτταρικό τοίχωμα κατά τη διάρκεια της κυτταρικής αύξησης. Το ένζυμο έχει δειχθεί επίσης, ότι μεταβάλλει τις ρεολογικές ιδιότητες των γαλακτομαννών αλλάζοντας τη δομή της μακριας αλυσίδας και μειώνοντας το ιξώδες τους (Bulpin *et al.*, 1990).

Οι όξινες α-γαλακτοζιδάσες έχει αποδειχθεί ότι συμβάλλει στο «μαλάκωμα» της ράγας των σταφυλιών υδρολύοντας κυτταρικά τοιχώματα των κυττάρων της (Nunan *et al.* 2001). Διαφορετικές λειτουργίες έχουν προταθεί για τις α-γαλακτοζιδάσες του καφέ, οι οποίες μπορεί να σχετίζονται με τη σκλήρυνση του ενδοσπερμίου του καρπού μέσω της αφαίρεσης γαλακτοσυλο καταλοίπων από γαλακτομαννάνες, που έχει ως αποτέλεσμα τη σκλήρυνση του κυτταρικού τοιχώματος. (Bewley, 1997; Redgwell *et al.*, 2003; Marraccini *et al.*, 2005).

Η α-γαλακτοσιδάση επίσης δρά σε συνδυασμό με την ενδο-β-μαννάση και β-μαννάσες στη μείωση της συγκέντρωσης των γαλακτομαννανών των κυτταρικών τοιχωμάτων (Reid and Meier, 1973). Στη παπάγια βρέθηκε ότι το ένζυμο έχει παρόμοια δράση με τη β-γαλακτανάση και ότι υδρολύει την πηκτίνη κατά την ωρίμανση του καρπού.

Ένα προτεινόμενο μοντέλο για την αποδόμηση των RFO στα σπέρματα μπιζελιού υπέδειξαν ότι η όξινη και η αλκαλική α-γαλακτοζιδάση ήταν διαδοχικά ενεργές κατά τη συγχρονισμένη αποδόμηση των RFOs (Bloechl *et al.*, 2008). Το ένζυμο συμμετέχει επίσης στην ανθεκτικότητα στην καταπόνηση ψύχους της πετούνιας (Pennycooke *et al.* 2003 Tajiri *et al.* 2002) καθώς επίσης και στην αποδόμηση γαλακτολιπιδίων κατά την γήρανση του φυτού (Fialho and Bócher 1995 Thompson *et al.* 1998).

Αλκαλική α-γαλακτοζιδάση

Στα φυτά που μεταφέρουν ραφινόζη και σταχυόζη μέσω του ηθμού (Bachmann *et al.*, 1994), οι α-γαλακτοζιδάσες είναι από ουδέτερες έως αλκαλικές (Lee *et al.*, 2004; Bloechl *et al.*, 2008). Συγκρίσεις μεταξύ των ενζύμων έδειξαν ότι οι αλκαλικές α-γαλακτοζιδάσες είχαν περισσότερες ομοιότητες με τη συνθάση της ραφινόζης και της σταχυόζης σε σχέση με τις υπόλοιπες α-γαλακτοζιδάσες, υποδεικνύοντας ότι ανήκουν στην οικογένεια 36 των γλυκοσυλ υδρολασών. Απαντώνται κυρίως σε σπέρματα και καρπούς.

Οι αλκαλικές α-γαλακτοζιδάσες, είναι υπεύθυνες για την *in vivo* αποδόμηση των αποθηκευτικών ολιγοσακχαριτών που περιέχουν γαλακτόζη. (Feurtado *et al.* 2001; Guimaraes *et al.* 2001), (Kim *et al.* 2002; Smart and Pharr 1980). Οι αποθησαυριστικοί αυτοί ολιγοσακχαρίτες είναι αυτοί της οικογένειας ραφινόζης (Gao and SchaVer 1999; Smart and Pharr 1980). Είναι κυρίως κυρίως ραφινόζη και σταχυόζη, που είναι γαλακτοσυλ παράγωγα σακχαρόζης που αποτελούνται από μια ή δυο ακολουθίες γαλακτόζης, αντίστοιχα. Η αποδόμηση των RFO συχνά ολοκληρώνεται πριν την κινητοποίηση των πολυσακχαριτών, πράγμα το οποίο υποδεικνύει ότι ίσως έχουν ρόλο στην παροχή ενέργειας και μονάδων άνθρακα στα πρώιμα στάδια της βλάστησης (Bloechl *et al.*, 2007).

Σε βλαστάνοντα σπέρματα ψυχανθών, η α-γαλακτοζιδάση παίζει ρόλο στην κινητοποίηση των ολιγοσακχαριτών της οικογένειας ραφινόζης (RFOs)(Guimaraes *et al.*, 2001). Επιπλέον, οι α-γαλακτοζιδάσες υδρολύουν γαλακτοσυλ κυκλιτόλες κατά τη διάρκεια της βλάστησης των ψυχανθών. (Horbowicz *et al.*, 1998). Τα σπέρματα έχουν μεγάλη ανάγκη σε ενέργεια στα πρώιμα στάδια της βλάστησης και τα RFOs αποδομούνται ταχέως μετά την ενυδάτωση του σπέρματος (Guimaraes *et al.*, 2001). Στα σπέρματα καλαμποκιού και κριθαριού, η αλκαλική μορφή ήταν ήδη παρούσα στα ξηρά σπέρματα (Zhao *et al.*, 2006) ή εκφραζόταν στα πρώιμα στάδια της βλάστησης (Carmi *et al.* 2003). Το ένζυμο μπορεί να συνδέεται με την αποδόμηση των RFOs και των γαλακτοσύλ κυκλιτολών κατά τη διάρκεια της βλάστησης του καφέ (Marraccini *et al.*, 2005).

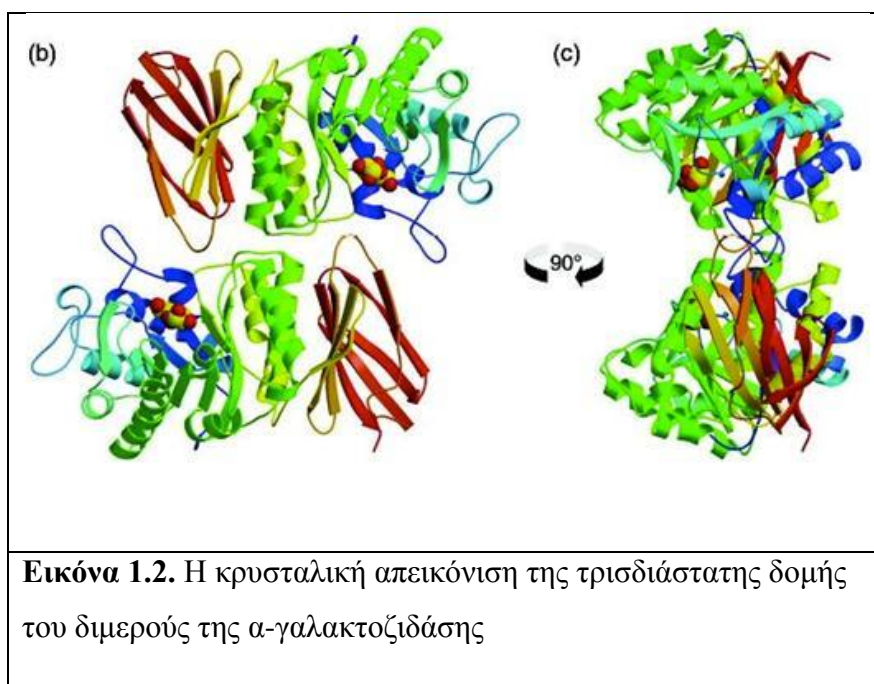
Επιπρόσθετα, η α-γαλακτοζιδάση έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της βιοτεχνολογίας λόγω της ικανότητάς του να υδρολύει ραφινόζη σε σιρόπι ζαχαρότευτλων για τη διευκόλυνση της κρυσταλοποίησης και συνεπώς τη βελτίωση της απόδοσης της σακχαρόζης (Ganter *et al.*, 1988). Η α-γαλακτοζιδάση πιθανολογείται ότι διασπάει τα RFO στο "γάλα" σόγιας και σε διατροφικά παράγωγα ψυχανθών (Falkoski *et al.*, 2006). Η παρουσία των RFO στη σόγια ωθούν σε στομαχικές διαταραχές και μειώνουν την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών στον άνθρωπο και στα μονογατρικά ζώα (Karr-Lilienthal *et al.*, 2006).

Τα σπέρματα του *Tachigali multijuga Benth.*, Fabaceae, έχει δειχθεί ότι έχουν υψηλότερη συγκέντρωση α-γαλακτοζιδάσης κατά τη διάρκεια της βλάστησης μετά το σπάσιμο του ληθάργου (Borges *et al.*, 2004).

1.4.1 Δομή του ενζύμου

Η α-γαλακτοζιδάση στην ενεργή της μορφή είναι μια ομοδιμερής γλυκοπρωτεϊνη (εικόνα 1.2). Η φυτική α-γαλακτοζιδάση αποτελείται από 380 έως 430 κατάλοιπα αμινοξέων.

Το μονομερές του ενζύμου έχει δυο τομείς, domains. Ο ένας από αυτούς είναι υπεύθυνος για τις νουκλεοφιλικές και όξινες/βασικές αντιδράσεις. Συγκεκριμένα, δυο κατάλοιπα ασπαραγγινικού οξέος σχετίζονται με το ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο αποτελείται συγκεκριμένα από 15 κατάλοιπα αμινοξέων. Η pKa του ασπαραγγινικού οξέος είναι 4.0, το οποίο καθιστά το συγκεκριμένο αμινοξύ πολύ χρήσιμο στο όξινο περιβάλλον του λυσοσώματος. Ο άλλος τομέας είναι C-τελικός αποτελείται από οκτώ αντιπαράλληλες δομές πτυχωτής επιφάνειας.



Στον ηλιάνθο το ένζυμο αποτελείται από 363 αμινοξικά κατάλοιπα με MB 40263Da.

Στον καφέ βρέθηκαν δυο ισότυποι του ενζύμου με MB 39,5kDa που διέφεραν μεταξύ τους κατά οκτώ αμινοξικά κατάλοιπα (Marraccini *et al.*, 2005).

Στην τομάτα απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε η α-γαλακτοζιδάση με MB 39,8kDa και pI 4,91.

1.4.2 Δραστικότητα του ενζύμου

Στον άνθρωπο έχει γίνει εκτενής έρευνα της α-γαλακτοζιδάσης σε σχέση με τη νόσο του Fabry, τις μεταλλάξεις στο γονίδιο που την κωδικοποιεί και προκαλούν την ασθένεια.

Στην πετούνια μελετήθηκε η δραστικότητα της α-γαλακτοζιδάσης (διάσπαση των RFOs) σε διάφορους ιστούς σε καταπόνηση ψύχους.

Στο πεπόνι βρέθηκαν δυο αλκαλικές α-γαλακτοζιδάσες και μελετήθηκε η συμβολή τους στη διάσπαση των RFOs καθώς και στο μεταβολισμό της γαλακτοσυλσακχαρόζης (Gao *et al.*, 1999).

Στον ηλιάνθο μελετήθηκε η δράση της α-γαλακτοζιδάσης με τους γαλακτομαννανολιγосακχαρίτες και τις γαλακτομαννάνες. Καθώς επίσης και η ομολογία της με τα αντίστοιχα ένζυμα των άλλων φυτών (Kim *et al.*, 2002).

Στον καφέ έγινε βιοχημική και μοριακή ανάλυση του ενζύμου.

Χορηγούμενη ακατέργαστη α-γαλακτοζιδάση από το *Gibberella fujikuroi* σε αλεύρι ρεβιθιού είχε ως αποτέλεσμα τη διάσπαση των ολιγοσακχαριτών της ραφινόζης.

Στο κριθάρι, η α-γαλακτοζιδάση σημάνθηκε με GUS και εντοπίστηκε στο κυτταρικό τοίχωμα των αναπτυσσόμενων φύλλων (Chrost *et al.*, 2007).

1.4.3 Γονίδια

Το γονίδιο που κωδικοποιεί την α-γαλακτοζιδάση έχει τη γενική ονομασία GLA. Στους ανθρώπους βρίσκεται στο χρωμόσωμα X στη θέση 22.

Στο *Arabidopsis thaliana* έχουν βρεθεί δυο α-γαλακτοζιδάσες η 1 και 2 με 425 και 380 αμινοξικά κατάλοιπα και εκφράζονται από τα γονίδια AGAL1 και AGAL2 αντίστοιχα.

Ενώ στην τομάτα έχει εντοπιστεί μόνο ένα γονίδιο το AGAL (Feurtado *et al.*, 2001).

Στο κριθάρι βρέθηκαν δυο διαφορετικά γονίδια που κωδικοποιούν δυο διαφορετικές α-γαλακτοζιδάσες (Chrost and Krupinska, 2000).

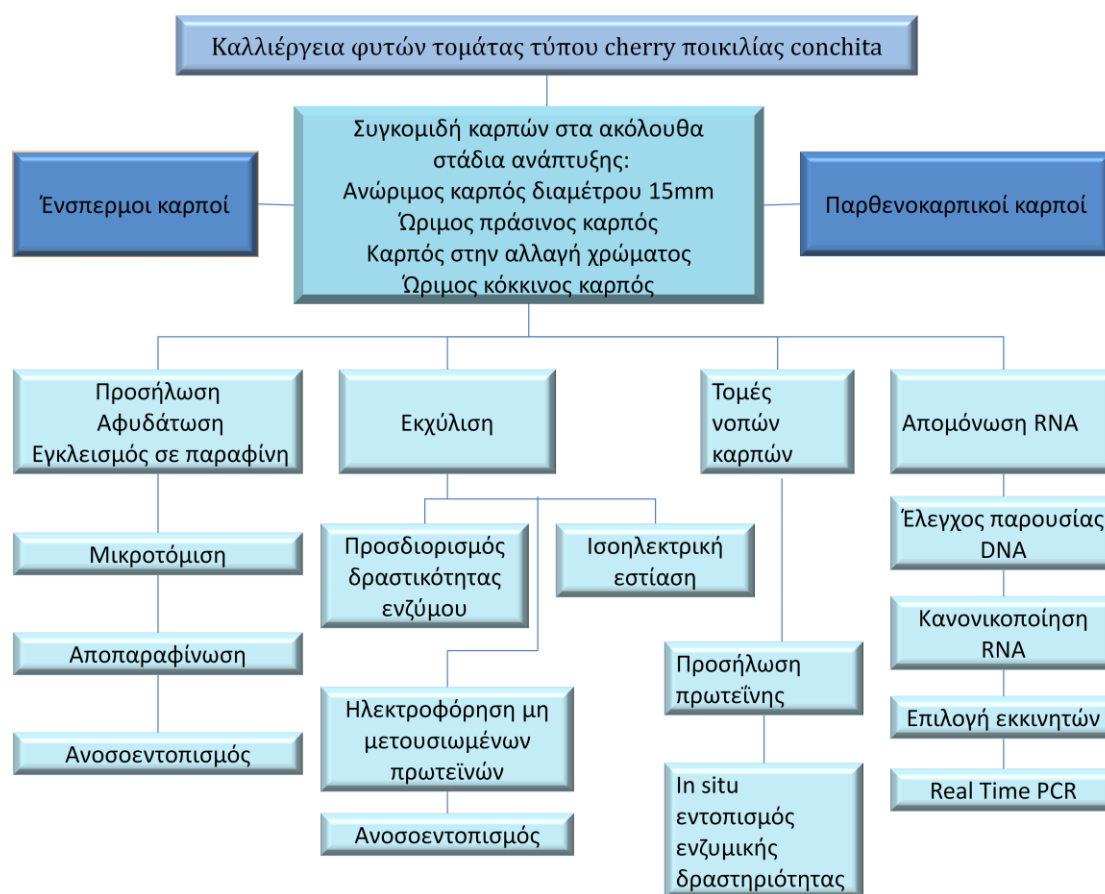
Στο *Arabidopsis thaliana* βρέθηκαν δυο υποτιθέμενα γονίδια που κωδικοποιούν την όξινη α-γαλακτοζιδάση κατά την έκφρασή της, ένα στο χρωμόσωμα 3 (**At3g56310**) και το άλλο στο χρωμόσωμα 5 (**At5g08370**).

Ο αριθμός των γονιδίων που εκφράζουν την α-γαλακτοζιδάση θεωρείται ότι είναι μεγαλύτερος στο ρύζι (*Oryza sativa* cv. *japonica*) όπου βρέθηκαν τέσσερα αντίγραφα, δυο στο χρωμόσωμα 7 (**OJ1409_C08.26** και **OSJNBb0062P14.111**) και δυο στο χρωμόσωμα 10 (**OSJNBa0041P03.8** και **OSJNBa0051D19.18**).

1.5 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της α-γαλακτοζιδάσης σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου cherry. Καθώς επίσης και ο εντοπισμός των διαφορών στην έκφραση, δραστηριότητα και τον εντοπισμό του ενζύμου μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ



2.1 Το φυτικό υλικό.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ένσπερμοι και άσπερμοι καρποί τομάτας τύπου cherry του υβριδίου Conchita. Πρόκειται για πρώιμο υβρίδιο που συγκομίζεται με ταξικαρπία. Κάθε ταξικαρπία μπορεί να φέρει 12 με 16 καρπούς (Εικόνα 2.1). Οι καρποί της Conchita είναι λαμπεροί κόκκινοι με μέσο βάρος 16-18gr. Η ανάπτυξη και η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Εικόνα 2.2). Η φύτευση των σπερμάτων σε σπορεία πραγματοποιήθηκε το μήνα Μάρτιο. Η συγκομιδή των καρπών στα υπό μελέτη στάδια ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε από τη δεύτερη ταξικαρπία των φυτών που είχαν διαμορφωθεί σε διστέλεχο σύστημα. Για την παραλαβή των παρθενοκαρπικών καρπών έγιναν οι ακόλουθες ενέργειες. Όταν ακόμη τα άνθη ήταν κλειστά και πριν αυτά καταστούν επιδεκτικά επικονίασης, με μία λαβίδα ανοίχτηκαν τα πέταλα και αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι ανθήρες αφήνοντας άθικτο τον ύπερο (ευνουχισμός). Ακολούθησε ψεκασμός του άνθους με κατάλληλη ορμόνη και το άνθος σημάνθηκε με ταμπελάκι

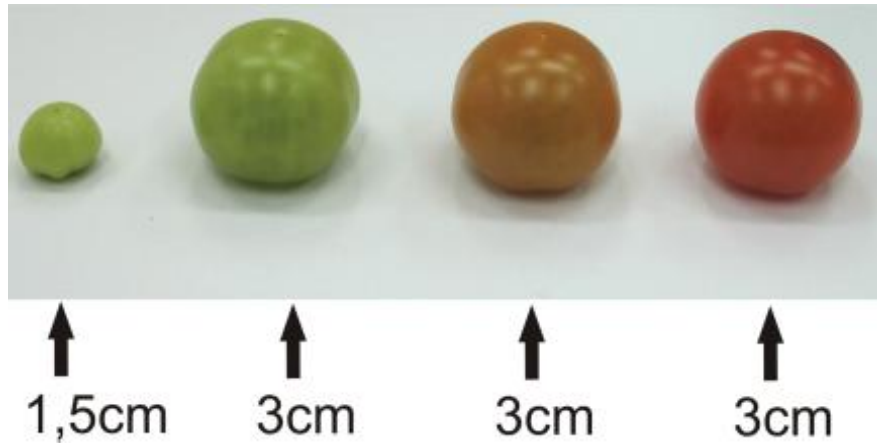
όπου αναγραφόταν η ημερομηνία επέμβασης. Όταν οι καρποί έφτασαν στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης συγκομίστηκαν. Η ορμόνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Ortomone με δραστική ουσία το β-ναφθόξυοξικό οξύ σε συγκέντρωση 50ppm. Οι ένσπερμοι καρποί προήλθαν από φυσιολογική καρπόδεση χωρίς καμία επέμβαση υποβοήθησης της καρπόδεσης. Οι άσπερμοι και ένσπερμοι καρποί συγκομίστηκαν σε 5 διαφορετικά στάδια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξή τους: ανώριμοι καρποί διαμέτρου 1,5cm, ώριμοι πράσινοι, καρποί στην αλλαγή του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι (**Εικόνα 2.3**). Η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε από τις 11.00 - 13.00 και οι καρποί τοποθετήθηκαν αμέσως μετά την κοπή τους από τα φυτά σε ψύξη για σταμάτημα των μεταβολικών διεργασιών έως τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Αμέσως μετά τη συγκομιδή τους, ένα μέρος των καρπών χρησιμοποιήθηκε για τομές με σκοπό τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου, οι δε υπόλοιποι αποθηκεύτηκαν στους -80oC.



Εικόνα 2.1. Ταξικαρπία τομάτας τύπου cherry



Εικόνα 2.2. Φυτά στο θερμοκήπιο



Εικόνα 2.3. Τα τέσσερα στάδια ανάπτυξης του καρπού τομάτας τύπου cherry βάση των οποίων έγινε η συγκομιδή. Από αριστερά προς τα δεξιά ανώριμος καρπός διαμέτρου 1,5cm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός.

2.2 Έλεγχος της καταλληλότητας των αντισωμάτων.

Εκχύλιση του ενζύμου.

Μετά την παραλαβή των δειγμάτων για τα 4 στάδια των ένσπερων και τα αντίστοιχα 4 των άσπερων καρπών ακολούθησε η εκχύλιση των πρωτεϊνών και οι μετρήσεις των ολικών τους πρωτεϊνών. Για την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών τα δείγματα αφού τεμαχίστηκαν, τοποθετήθηκαν σε γουδί μαζί με υγρό άζωτο. Ακολούθως, τα δείγματα λειοτριβήθηκαν. Για κάθε στάδιο αναμιγνυόταν συγκεκριμένη ποσότητα (σε νωπό βάρος) καρπού με αντίστοιχο όγκο μέσου εκχύλισης (αναλογία 1:1). Η όλη διαδικασία διαρκούσε έως ότου προκύψουν ομοιογενή εκχυλίσματα. Τελικά, τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν μέσα σε erpendorf στον πάγο. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15000g για 15min και 4°C. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων με τη μέθοδο Bearden και στη συνέχεια προστέθηκαν στο εκχύλισμα μερικοί κόκκοι κυανούν της βρωμοφαινόλης για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων.

Το διάλυμα εκχύλισης των πρωτεϊνών ήταν αυτό που προτείνεται από Marraccini. (2005).

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών

40mM MOPS pH 6.5

10% γλυκερίνη
0,02% BSA
10mM sodium metabisulfite
4% PVP-40
5mM EDTA

Μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.

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

Διάλυμα Bearden

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

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

2.3. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της όξινης α- γαλακτοσιδάσης.

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου βασίστηκε στη μέθοδο που προτείνεται για τον εντοπισμό της δραστηριότητας του ενζύμου Zhifang and Schaffer (1999)

Μητρικό διάλυμα pNPG

Σε 10ml dH₂O διαλύουμε 300mg p-νιτροφαινυλ-α-D- γαλακτοπυρανοζίδιο (pNPG)
Χωρίζουμε σε δυο eppendorf των 10ml και τα φυλάσσουμε στους -20°C

Διάλυμα διακοπής αντίδρασης

5% Na₂CO₃

Το ρυθμιστικό διάλυμα ελέγχου της δραστηριότητας της α-γαλακτοσιδάσης ήταν το διάλυμα **McInvine** (0,2 mM Na₂HPO₄, ρύθμιση του pH στο 4,6 με 0,1M κιτρικό οξύ).

Το τελικό μίγμα της αντίδρασης περιελάμβανε:

500μl εκχυλίσματος

200 μl μητρικού διαλύματος pNPG

200 μl of McInvine buffer

Το μίγμα επωάστηκε για 30 min στους 30°C.

Ακολούθως η αντίδραση διακόπηκε με 1ml διαλύματος διακοπής της αντίδρασης.

Η παραγωγή της νιτροφαινόλης μετρήθηκε με την απορρόφηση του μίγματος στα 410nm με σπεκτροφωτόμετρο UV-160A (Shimadzu).

2.4 Η ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών και η ανίχνευση της α-γαλακτοσιδάσης στη πηκτή.

Η ισοηλεκτρική εστίαση των πρωτεϊνών των δειγμάτων έγινε σε πηκτές SERVALYT PRECOTE εύρους PH 3-10 και πάχους 125μm. Οι αμφολύτες προεστίαστηκαν για 15min στα 1500V και εν συνεχεία φορτώθηκε σε ειδικά φίλτρα

6μl δείγματος (περίπου 350ng) ολικών πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες του δείγματος εστίαστηκαν για 1,5h στα 2000V. Ακολούθως αφαιρέθηκαν τα φίλτρα και η πηκτή εστίαστηκε για 0,5h στα 2000V.

Μετά την εστίαση των πρωτεϊνών η πηκτή εξισορροπήθηκε για 15min με διάλυμα οξεϊκού νατρίου pH 5.0. Ο εντοπισμός της α-γαλακτοσιδάσης έγινε τη μέθοδο των Wook-Dong Kim *et al* (2002) με τη διαφορά ότι χρησιμοποιήθηκε το 5-βρωμο-4-χλωρο-3-ινδολύλο-α-D-γαλακτοπυρανοζίδιο (X-a-Gal). Το πλήρες διάλυμα ανίχνευσης περιείχε:

50 mM CH₃COONa pH 5.0

0,5mM X-a-Gal

2.5 Η ανοσοβιοχημική μελέτη.

Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν τομές από ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας τύπου cherry στα εξής στάδια ανάπτυξης: ανώριμος καρπός διαμέτρου 1,5cm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή του χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός. Τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν υποστεί την παρακάτω επεξεργασία:

Προσήλωση

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

Αφυδάτωση

Ακολούθως, οι τομές αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανόμενων συγκεντρώσεων αιθανόλης (50%, 70%, 80%, 90%, 95% και 100%) με σκοπό την απομάκρυνση του προσηλωτικού διαλύματος. Ο χρόνος εμβάπτισης των δειγμάτων

στα παραπάνω διαλύματα ήταν για μία ώρα το καθένα εκτός από την καθαρή αλκοόλη όπου και παρέμειναν για 3h.

Διαφανοποίηση

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

Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη

Στις τομές των καρπών τομάτας τύπου cherry που βρίσκονταν μέσα σε μικρά γυάλινα δοχεία με ξυλένιο, προστέθηκαν μικρά τεμάχια παραφίνης (Paramat BDH) σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το λιώσιμο της (2 με 3 κόκκοι την κάθε φορά) ακολούθησε διαδοχική προσθήκη παραφίνης μέχρι να διαπιστωθεί πως αυτή δεν μπορούσε να διαλυθεί περαιτέρω. Κατόπιν τα μικρά δοχεία μεταφέρθηκαν στους 42°C (hot plate), όπου συνεχίστηκε η προσθήκη παραφίνης έως ότου επέλθει κορεσμός του διαλύματος. Στη συνέχεια, το μίγμα παραφίνης-ξυλένιου μεταφέρθηκε στους 60°C. Η λιωμένη παραφίνη αντικαταστάθηκε με καινούργια τρεις φορές τουλάχιστον. Για τον εγκλεισμό των δειγμάτων σε παραφίνη χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικά εκμαγεία, τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοχείο με πάγο. Η τοποθέτηση των δειγμάτων έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε αυτά να έχουν τον επιθυμητό προσανατολισμό. Επίσης μεταφέρθηκε μικρή ποσότητα λιωμένης παραφίνης. Καθώς η παραφίνη έπηζε, και για να αποφευχθεί ο εγκλεισμός φυσαλίδων αέρα, μια πυρακτωμένη ανατομική βελόνα, θέρμαινε την περιοχή γύρω από τους ιστούς.

Προετοιμασία αντικειμενοφόρων

1. Οι αντικειμενοφόροι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν πλένονται σε διάλυμα 1% SDS για 2h

περίπου, για να απομακρυνθούν από αυτές οι τυχόν λιποδιαλυτές ουσίες.

2. Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό σε συνεχή ροή.
3. Ακολουθεί πλύσιμό τους επίσης για 2h σε διάλυμα υδροχλωρίου 5%.
4. Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και αποστειρώνονται.
5. Ακολουθεί εμφύσηση τους σε διάλυμα 1% w/v πολυλυσίνης.
6. Τέλος, αφήνονται να στεγνώσουν σε θερμοκρασία δωματίου για 2 μέρες, και,
7. Ακολουθεί φύλαξή τους στο ψυγείο.

Μικροτομήσεις

Το δείγμα τοποθετείται σε χειροκίνητο μικροτόμο (LEIKA). Οι τομές που έγιναν ήταν πάχους 10μm. Ακολούθησε επιλογή των τομών σε οπτικό μικροσκόπιο. Οι επιλεγμένες τομές τοποθετήθηκαν σε αντικειμενοφόρους επεξεργασμένες με πολυλυσίνη. 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.

Αποπαραφίνωση

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

2.6 Ο ανοσοεντοπισμός της α-γαλακτοζιδάσης στις τομές των καρπών.

Μετά την αποπαραφίνωση ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Οι τομές καλύπτονται με διάλυμα δεσμεύσεως μη ειδικών θέσεων (TBS-Tween 1% BSA) και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h.
- Ακολουθεί επώαση των τομών σε 1:750 αραιώση του αντισώματος εναντίον της α-γαλακτοσιδάσης που παράχθηκε σε κουνέλια (Agrisera AS9448) σε ρυθμιστικό διάλυμα TBST με 1% BSA (πρωτεΐνη του ορού του βοδιού), και οι αντικειμενοφόροι αφήνονται για τουλάχιστον 12h σε θερμοκρασία 4°C.
- Το μη δεσμευμένο αντίσωμα ξεπλένεται 2 φορές με διάλυμα TBST για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές επωάζονται σε διάλυμα TBST με 1% BSA, που περιέχει κατάλληλη αραιώση (1:5000) δευτερογενούς αντισώματος, που φέρει συζευγμένη αλκαλική φωσφατάση (AP-AntiRabbit, Promega), για 1h σε θερμοκρασία δωματίου. Το δευτερογενές αντίσωμα προέρχεται από ποντίκι έναντι των αντισωμάτων κουνελιών (IgG).
- Η περίσσεια του δευτερογενούς αντισώματος ξεπλένεται με διάλυμα TBST για 15min σε θερμοκρασία δωματίου.
- Οι τομές εξισορροπούνται σε ρυθμιστικό διάλυμα Ρυθμιστικό διάλυμα 3 για 10min, και καλύπτονται με διάλυμα χρωματικής αντίδρασης (25μl/ml).
- Η χρωματική αντίδραση γίνεται στο σκοτάδι και η ανάπτυξη του χρώματος ελέγχεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα στο μικροσκόπιο, ούτως ώστε να προληφθεί η ανάπτυξη μη εξειδικευμένου σήματος υποβάθρου.
- Η αντίδραση σταματά με καλό ξέπλυμα των αντικειμενοφόρων με αποσταγμένο νερό.
- Ακολουθεί αφυδάτωση με διαδοχικές εμβαπτίσεις, σε διαλύματα αυξανόμενης συγκέντρωσης αιθανόλης 50%, 70%, 90%, 95% και δύο φορές σε 100% για ένα λεπτό σε κάθε διάλυμα.
- Τέλος, αφού στεγνώσουν καλά οι τομές, καλύπτονται με DPX πριν την τοποθέτηση της καλυπτρίδας, ώστε να μονιμοποιηθούν.

Σε κάθε περίπτωση η χρώση του μάρτυρα έγινε με Orange G σε απόλυτη αλκοόλη.

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα TBST

20mM Tris HCl pH 7.5

150mM NaCl

0.05% Tween 20

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της όξινης α-γαλακτοσιδάσης-Ρυθμιστικό διάλυμα3

10mM Tris-HCl pH 9.5

100mM NaCl

50 mM MgCl₂

Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης

10ml ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της α-γαλακτοσιδάσης

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

66μl Νιτρομπλέ του τετραζολίου (NBT)

2.7 Ηλεκτροφόρησεις των μετουσιωμένων πρωτεϊνών.

Πριν από την ηλεκτροφόρηση τα δείγματα υπέστησαν χειρισμό με SDS για τη μετουσίωση των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα στα δείγματα προστέθηκε 2% SDS και θερμάνθηκαν στους 95-97°C για 15min. Τα δείγματα αφέθηκαν να επανέλθουν σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε φυγοκέντρησή τους στα 10000g επί 10min. Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12% ολικής συγκέντρωσης ακρυλαμίδιου με 2,7% bis-ακρυλαμίδιο, σε ασυνεχές σύστημα του οποίου τα συστατικά αναφέρονται παρακάτω. Ακολούθως φορτώθηκε με εκχύλισμα πρωτεϊνών που αντιστοιχούσε περίπου σε 40μg πρωτεΐνης από κάθε ιστό.

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

Sample buffer for SDS

0,0625M Tris HCl pH 6.8

2% SDS

5% μερκαπτοαιθανόλη

10% γλυκερίνη

0,002% bromophenol blue

Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμίδιου 30%T, 2,7%C

100μl dH₂O

29,21g Ακρυλαμίδιο

0,79g Bis-Ακρυλαμίδιο

Πηκτή ανάλυσης 10% T, 2.7% C

4,30 ml Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμίδιου, Bis- Ακρυλαμίδιου (30%, 2.7%)

2,50 ml Ρυθμιστικό Διάλυμα Ανάλυσης

3,00 ml Αποσταγμένο Νερό

50 μl APS (10%)

10μl TEMED

120 μl SDS (12%)

Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης

- Ενυδάτωση της μεμβράνης της νιτροκυτταρίνης με αποσταγμένο νερό.
- Αντικατάσταση του αποσταγμένου νερού με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς (24mM Tris, 192mM γλυκίνη, 20% μεθανόλη) 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.

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 α-γαλακτοζιδάσης (rabbit anti-α-γαλακτοζιδάση, Agrisera AS9448) 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 3φορές 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 3φορές 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.

2.8 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).

Καθορισμός της βέλτιστης ποσότητας αρχικού υλικού.

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

Διαδικασία.

1. Η ζύγιση καθορίζει την ποσότητα του φυτικού υλικού που όμως δεν πρέπει να ξεπερνά τα 200 mg.
2. Ο ζυγισμένος ιστός τοποθετείται άμεσα σε υγρό άζωτο όπου και λειοτριβείται. Η σκόνη που προκύπτει αποθηκεύεται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης χωρητικότητας 2 ml στο οποίο απουσιάζει RNάση. Το

υγρό άζωτο αφήνεται να εξατμιστεί αλλά δεν επιτρέπεται να ξεπαγώσει ο ιστός. Άμεσα ακολουθεί το τρίτο βήμα. (Το RNA σε φυτικούς ιστούς δεν προστατεύεται εως ότου επιτευχθεί άμεση ψύξη του ιστού σε υγρό άζωτο).

3. Προστίθονται 450 μl ρυθμιστικό διάλυμα RLT ή RLC μέχρι το μέγιστο των 200mg λειοτριβμένου ιστού. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση (vortex). Επώαση διάρκειας 1- 3min στους 65°C μπορεί να βοηθήσει τη λύση των ιστών. Το τελευταίο δεν ισχύει σε ιστούς πλούσιους σε άμυλο καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες μπορούν να διογκώσει το δείγμα.
4. Οι λειοτριβμένοι ιστοί μεταφέρονται σε μια στήλη QIAshredder spin (μωβ) που είναι τοποθετημένη σε ένα σωλήνα συλλογής των 2ml και φυγοκεντρείται για 2min σε μεγάλη ταχύτητα. Το υπερκείμενο της στήλης μεταφέρεται προσεκτικά σε ένα μικρό σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης χωρίς να διαταραχθούν τα κυτταρικά υπολλείματα στο σωλήνα συλλογής. Στα επόμενα βήματα χρησιμοποιείται μόνο το υπερκείμενο. Συνήθως κρίνεται απαραίτητο να κόβεται η άκρη της πιπέτας για να εισέλθει το προϊόν της λύσης των κυττάρων στη στήλη QIAshredder spin. Η φυγοκέντρωση μέσω της QIAshredder στήλης αφαιρεί τα κυτταρικά υπολλείματα και ομογενοποιεί το προϊόν της λύσης των κυττάρων. Καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό των κυτταρικών υπολλειμάτων παραμένει στη στήλη QIAshredder spin, ένα πολύ μικρό μέρος τους περνά στο σωλήνα συλλογής και σχηματίζει ίζημα.
5. Προστίθεται 0,5 volume αιθανόλης (96- 100%) στο καθαρισμένο προϊόν της λύσης των κυττάρων και αναμιγνύεται άμεσα με τη χρήση πιπέτας. Δεν φυγοκεντρούμε. Άμεσα ακολουθεί το έκτο βήμα.
6. Το δείγμα (συνήθως 650 μl), μεταφέρεται μαζί με το ίζημα που έχει σχηματιστεί σε μια στήλη RNeasy spin (ροζ) που είναι τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής των 2ml. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15s σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000*g (10000rpm). Αφαιρείται το διήθημα.
7. Προστίθονται 700μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1 στη στήλη RNeasy spin. Φυγοκεντρούμε για 15s σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000*g (10000rpm) για να ξεπλυθεί η μεμβράνη της στήλης. Τέλος, απορρίπτεται το διήθημα. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης αφαιρείται προσεκτικά η στήλη RNeasy spin από το σωλήνα συλλογής ώστε να μην επικοινωνεί η στήλη με το διήθημα. Το βήμα αυτό δεν εκτελείται σε περίπτωση που προηγουμένως διεξάχθηκε προαιρετική πέψη της DNάσης στη στήλη.

8. Προσθέτουμε 500μl ρυθμιστικού διαλύματος RPE στην στήλη RNeasy spin. Φυγοκεντρούμε για 15s σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000*g (10000rpm) για να ξεπλυθεί η μεμβράνη της spin στήλης.
9. Προσθέτουμε 500μl ρυθμιστικό διάλυμα RPE στην στήλη RNeasy spin. Φυγοκεντρούμε για 2min σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000*g (10000rpm) για να ξεπλυθεί η μεμβράνη της στήλης spin (το τελευταίο γίνεται για να ξηραθεί η μεμβράνη ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη που πιθανόν δεν αφαιρέθηκε).
10. Προαιρετικό: Η στήλη RNeasy spin τοποθετείται σε ένα νέο σωλήνα συλλογής 2ml και απορρίπτεται ο παλιός με το διήθημα. Φυγοκεντρούμε σε μέγιστη ταχύτητα για 1min
11. Η στήλη RNeasy spin τοποθετείται σε νέο σωλήνα συλλογής 1,5ml. Προστίθενται 30-50μl νερό που δεν περιέχει RNάση κατευθείαν στη μεμβράνη της στήλης spin. Φυγοκεντρούμε για 1min σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000*g (10000rpm) ώστε να εξαχθεί το RNA.
12. Εάν η παραγωγή RNA είναι μεγαλύτερη των 30μg επαναλαμβάνουμε το προηγούμενο στάδιο με τη χρήση 30-50μl επιπλέον νερού που δεν περιέχει RNάση ή με τη χρήση του εκλουόμενου υγρού του προηγούμενου βήματος (εάν απαιτείται μεγαλύτερη συγκέντρωση RNA). Εφόσον χρησιμοποιηθεί το εκλουόμενο υγρό του προηγούμενου βήματος το παραγόμενο RNA θα είναι 15-30% λιγότερο από την ποσότητα που θα προκύψει με τη χρήση νερού που δεν έχει RNάση με την τελική όμως συγκέντρωση του RNA να είναι μεγαλύτερη.

Υδρόλυση DNA των δειγμάτων.

Επειδή κατά την απομόνωση του RNA με το RNeasy Plant Mini Kit παρατηρήθηκε μετά την ηλεκτροφόρηση (ηλεκτροφόρηση TAE βλέπε παρακάτω) του μετουσιωμένου δείγματος, ύπαρξη γενωματικού DNA, ακολουθήθηκε μια επιπλέον μέθοδος υδρόλυσης του DNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το kit των αντιδραστηρίων της DNάσης (Promega).

Σύσταση Μητρικού Διαλύματος

10X Ρυθμιστικού Διαλύματος αντίδρασης που παρέχεται με αυτό το ένζυμο περιέχει 400mM Tris-HCl (pH 8.0), 100mM MgSO₄ και 10mM CaCl₂.

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν:

2μl DNάσης

2μl 1X Ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης (Promega)

Ακολουθεί Vortex των δειγμάτων

0,5 μl RNase out (παρεμποδιστής της RNάσης)

Τοποθετώ 15,5 μl του δείγματος με RNA

Προσθέτω από το μητρικό μείγμα μέχρι τελικό όγκο 20μl

Τοποθέτηση στους 37 °C για 45 min

Προσθέτουμε 1 μl DNASE Stop Solution

Προσθέτουμε 180 μl dd H₂O αποστειρωμένο

Προσθέτουμε 200μl φαινόλη

Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές για 5 min

Σχηματίζονται δύο ευδιάκριτες φάσεις, με την υπερκείμενη φάση να περιέχει το RNA. Η υπερκείμενη φάση τοποθετείται σε νέο αποστειρωμένο eppendorf. Προσθέτουμε 100 μl φαινόλη και 100 μl χλωροφόρμιο. Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές 5 min. Από το προϊόν παίρνουμε την υπερκείμενη φάση και την τοποθετούμε σε νέο αποστειρωμένο eppendorf.

Προσθέτουμε 200μl χλωροφόρμιο

Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές 5 min

Η υπερκείμενη φάση τοποθετείται σε νέο αποστειρωμένο eppendorf

Προσθέτουμε 500μl αιθανόλη

Προσθέτουμε 10μl όξινο ανθρακικό νάτριο CHCOONa 3M pH=5,2

Το δείγμα αφήνεται για 12h στους -20°C

Φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές στους 4°C , 20 min

Το RNA παραμένει ως ίζημα

Στη συνέχεια, προσθέτουμε 200μl 70% αιθανόλη και φυγοκεντρούμε στις 13000 στροφές στους 4°C , για 20min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται. Φυγοκεντρούμε στα 15000g, 0,5sec

Το αφήνουμε μέσα σε πάγο με ανοικτό το καπάκι του eppendorf για 5min, για να εξατμιστεί η αιθανόλη.

Επαναδιαλύουμε σε 20μl dd αποστειρωμένο H_2O

Μετά την αντίδραση PCR και την ηλεκτροφόρηση TAE, η παρουσία μόνο των εκκινητών της ουμπικουτίνης δείχνει την πλήρη υδρόλυση του DNA.

Έλεγχος της ποιότητας του παραλαμβανόμενου RNA μέσω ηλεκτροφόρησης TAE σε πηκτή αγαρόζης 1,5% με φορμαμίδιο.

Μετά την παραλαβή του RNA ελέγχθηκε η ποιότητά του μέσω ηλεκτροφόρησης TAE. Για το σκοπό αυτό ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

50X ρυθμιστικό διάλυμα ανάπτυξης του ηλεκτροφορήματος των νουκλεϊνικών οξέων.

2M Tris-Οξεικό

50mM EDTA

Ρύθμιση του pH στο 7,0

Προετοιμασία πηκτής 30ml

Χρησιμοποιούμε 30ml 1X Tank ρυθμιστικό διάλυμα

Προσθέτουμε 300mg Αγαρόζη

- 1) Τοποθετούμε στον φούρνο μικροκυμάτων (1 min)
- 2) Προσθήκη 0,75 μl Βρωμιούχο αιθίδιο
- 3) Αφήνουμε το gel να κρυώσει καλά
- 4) Τοποθετούμε την πηκτή στη θήκη της συσκευής και βάζουμε το χτένι
- 5) Αφαιρούμε το χτένι όταν πήξει το gel.

10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης του Δείγματος

50 mM Tris-HCl pH 7,6

60% Γλυκερόλη

0,25% κυανούν της βρωμοφαινόλης

1μl Βρωμιούχο αιθίδιο

Διάλυμα αποδιάταξης RNA

Σε αποστειρωμένο erpendorf τοποθετούνται:

600μl φορμαμίδιο

2400μl dd H₂O

100μl 10X Ρυθμιστικό Διάλυμα Φόρτωσης του Δείγματος

Προετοιμασία μίγματος ηλεκτροφόρησης:

5 μl δείγματος RNA

15 μl Διάλυμα αποδιάταξης RNA

Θερμαίνουμε 5 λεπτά στους 65 °C

Ψύχουμε σε πάγο για 5 λεπτά

Φορτώνουμε την πηκτή

20 min σε τάση 70V

2.9 Παρασκευή cDNA

Μετά τον έλεγχο της ποιότητας του RNA, ακολούθησε η παρασκευή cDNA. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το AffinityScript Multi Temperature cDNA Synthesis Kit (Stratagene). Με τη διαδικασία αυτή, γίνεται σύνθεση cDNA από τα τμήματ του RNA που περιέχουν ουρά πολυ-A (mRNA). Σε σωλήνα PCR (200μl), τοποθετούμε:

- 1) 10 μl δείγματος καθαρού RNA
- 2) 5,7 μl dd H₂O
- 3) 1 μl εκκινητή ολιγο- (dT)
- 4) Επωάζουμε το μείγμα σε 65 °C για 5 min
- 5) Αφήνουμε το μείγμα για 10 min ώστε να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετά προσθέτω τα εξής:

2 μl 10X Ρυθμιστικό Διάλυμα AffinityScript RT

0,8 μl μείγμα dNTPs

0,5 μl παρεμποδιστή RNάσης

1 μl αντίστροφης μεταγραφάσης

Τα δείγματα επωάζονται για 42 °C 60min και η αντίδραση τερματίζεται στους

70 °C 15min

Το cDNA φυλάσσεται στους -20 °C

Η ποσοτικοποίηση έγινε με RT- PCR.

2.10 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 των ιόντων Mg^{+2} .

Κατά τη διάρκεια μιας τυπικής αντίδρασης, πρώτο στάδιο αποτελεί η αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, με τη θέρμανση του δείγματος. Ακολουθεί μείωση της θερμοκρασίας και υβριδισμός των εκκινητών στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες. Η σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων γίνεται με θέρμανση του δείγματος στη βέλτιστη θερμοκρασία για τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η όλη διαδικασία αποδιάταξης, υβριδισμού των εκκινητών και σύνθεσης της συμπληρωματικής αλυσίδας επαναλαμβάνεται για έναν αριθμό κύκλων (συνήθως 20-35). Κατά τη διάρκεια των διαδοχικών κύκλων και εφόσον δεν υφίστανται περιοριστικοί παράγοντες, όπως έλλειψη νουκλεοτιδίων και εκκινητών ή παραγωγή παρεμποδιστών της πολυμεράσης, η συσσώρευση των προϊόντων της αντίδρασης γίνεται με εκθετικό ρυθμό.

Πέρα από την τυπική αντίδραση ενισχύσεως δίκλωνων τμημάτων DNA, τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μια σειρά από παραλλαγές της βασικής διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω. Μια από τις παραλλαγές επιτρέπει τη χρήση, ως αρχικής μήτρας για την αντίδραση ενισχύσεως μορίων RNA (RT- PCR), τα οποία αρχικά μεταγράφονται σε cDNA με τη δράση του ενζύμου της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase). Επιπλέον, είναι δυνατή η επιλεκτική ενίσχυση του 5' ή 3' άκρου ενός mRNA με τη χρήση της τεχνικής PAGE- PCR.

Ενίσχυση Ακολουθιών DNA με τη Χρήση της Τεχνικής PCR.

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). Η τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

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

1. Μήτρα cDNA 1 μ l
2. Ορθόδρομος εκκινητής 1,6 μ l (0,016nmole)
3. Οπισθόδρομος εκκινητής 1,6 μ l (0,016nmole)
4. Μίγμα dNTPs (10mM το καθένα) 1 μ l
5. 10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR 5 μ l
6. Taq DNA πολυμεράση (1u/ μ l) 1 μ l
7. dH₂O 40 μ l

- 1 96°C για 60s
- 2 Αποδιάταξη: 96°C για 15s
- 3 Υβριδισμός εκκινητών: 53°C για 60s.
- 4 Επιμήκυνση: 72 °C για 30s

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

Γονίδιο	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Ορθόδρομου Εκκινητή	Νουκλεοτιδική Αλληλουχία Οπισθόδρομου Εκκινητή
AF289080.1 Feurtado , Banik, Bewley (2001)	5'-ccgaagccaatagagactcg- 3'	5'- tttgcgtcttgttcttcgtg- 3'

3. Αποτελέσματα

3.1 Χαρακτηρισμός cDNA κλώνων που κωδικοποιούν την α-γαλακτοζιδάση στην τομάτα.

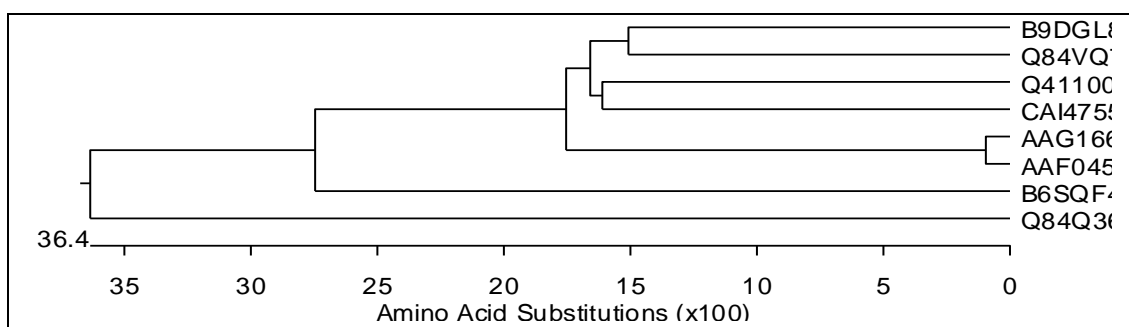
Η έρευνα με τον αλγόριθμο BLAST του NCBI (National Center for Biotechnology Information) στις διεθνείς γονιδιακές βάσεις δεδομένων έδειξε την πιθανή παρουσία ESTs (Expressed Sequence Tags) τα οποία κωδικοποιούν πιθανώς την α-γαλακτοσιδάση.

Η σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών της α-γαλακτοσιδάσης στην τομάτα (*Solanum lycopersicum*), με άλλες ήδη χαρακτηρισμένες αμινοξικές ακολουθίες φυτικών α-γαλακτοσιδασών (**Πίνακας 3.1**) έδειξε 99,7% μεταξύ των δύο ακολουθιών της τομάτας και, 74,1%, 73,7%, 73,2%, 69,8%, 62,9% και 52,6% ομολογία με τις αμινοξικές ακολουθίες των *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Coffea arabica*, *Phaseolus vulgaris*, *Helianthus annuus* και *Zea mays* αντίστοιχα.

		Percent Identity									
		1	2	3	4	5	6	7	8		
Divergence	1	■	99.7	74.1	73.7	73.2	69.8	62.9	52.6	1	AAG16693
	2	0.3	■	73.2	73.0	72.3	69.7	60.6	51.5	2	AAF04591
	3	31.8	33.2	■	76.6	75.3	75.3	61.6	53.8	3	B9DGL8 ARATH
	4	32.5	33.5	28.1	■	73.8	71.4	61.0	52.7	4	CAI47559 COFAR
	5	33.2	34.6	30.0	32.2	■	69.9	60.5	50.2	5	Q41100 PHAVU
	6	38.5	38.8	30.0	36.0	38.5	■	59.5	50.7	6	Q84VQ7 HELAN
	7	50.8	55.3	53.3	54.6	55.6	57.6	■	53.7	7	B69CF4 ZEAMA
	8	73.3	75.9	70.2	72.9	79.2	77.9	70.5	■	8	Q84Q36 ORYSA
		1	2	3	4	5	6	7	8		

Πίνακας 3.1. Ποσοστά ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών που προκύπτουν από τη σύγκριση της α-γαλακτοσιδάσης μεταξύ των φυτών της τομάτας (AAG16693, AAF04591, του *Arabidopsis thaliana* (ARATH), του ρυζιού (ORYSA), του καφέ (COFAR), του φασολιού (PHAVU), του ηλιάνθου (HELAN) και του αραβόσιτου (ZEAMA).

Το φυλογενετικό δένδρο των πρωτεϊνών της α-γαλακτοζιδάσης της τομάτας τις κατατάσσει σε ένα κλάδο μεταξύ των ευδικότυλων και μονοκότυλων φυτών (**Εικ. 3.1**)



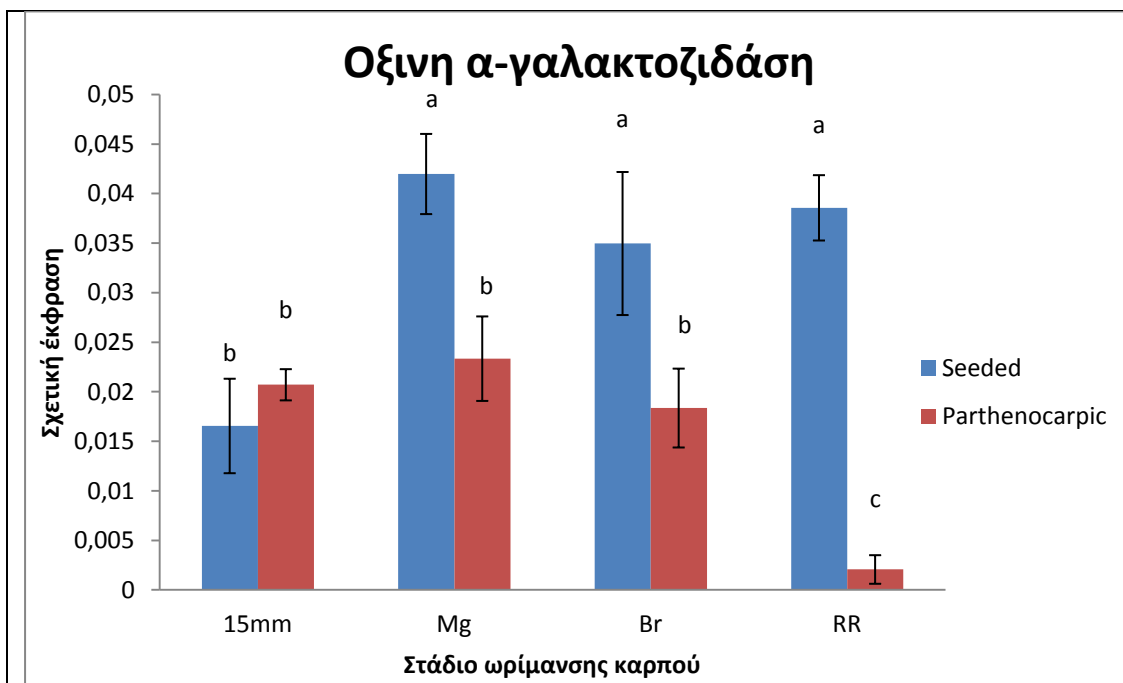
Εικ. 3.1 Φυλογενετικό δένδρο της α-γαλακτοζιδάσης. B9DGL8, *Arabidopsis thaliana*, Q84VQ7, *Helianthus annuus*, Q41100 *Phaseolus vulgaris*, CAI47559, *Coffea arabica*, AA616693 και AAF04591 *Solanum lycopersicum*, B6SQF4, *Zea mays*, Q84Q36 *Oryza sativa*.

3.2 Η έκφραση του γονιδίου της α-γαλακτοσιδάσης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας.

Προκειμένου να μελετηθεί η πορεία της συσσώρευσης των μεταγραφημάτων της α-γαλακτοσιδάσης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια της τομάτας τόσο σε ένσπερμους όσο και σε παρθενοκαρπικούς καρπούς, απομονώθηκε ολικό RNA μετατράπηκε σε cDNA και χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ποσοτικής PCR. Οι ποσότητες του cDNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση, κανονικοποιήθηκαν με βάση την ενίσχυση τμήματος ενός σταθερής έκφρασης γονιδίου (house keeping) της ουβικουϊτίνης (Ubiquitin), το οποίο εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της τομάτας.

Από τα αποτελέσματα της RT-PCR (**Εικόνα 3.2**), φαίνεται ότι η συσσώρευση των μεταγραφημάτων της α-γαλακτοζιδάσης ήταν μεγαλύτερη στους ένσπερμους καρπούς στα στάδια της ωρίμανσης τους ενώ ήταν μικρότερη στους αναπτυσσόμενους καρπούς. Επί πλέον η συσσώρευση των μεταγραφημάτων κατά το στάδιο του ανώριμου πράσινου καρπού ήταν τόσο στους παρθενοκαρπικούς όσο και στους ένσπερμους καρπούς χαμηλότερη. MG: mature green: ώριμος πράσινος

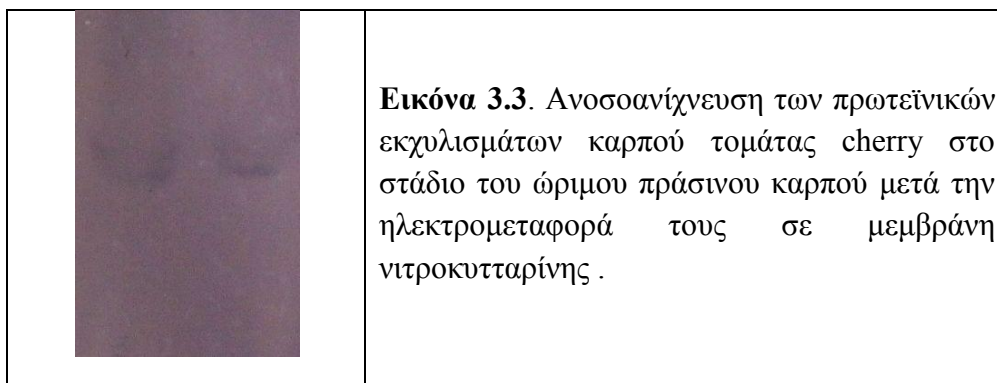
καρπός, Br: breaker: καρπός στο στάδιο αλλαγής χρώματος, RR: red ripe: ώριμος κόκκινος καρπός.



Εικ. 3.2 Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων της α-γαλακτοζιδάσης σε συγκεκριμένα στάδια της ανάπτυξης του καρπού. 15mm, ανώριμος πράσινος καρπός διαμέτρου 15mm. Mg, Br, και RR καρποί στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, στο στάδιο αλλαγής χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός.

3.3 Έλεγχος καταλληλότητας αντισωμάτων α-γαλακτοσιδάσης

Για τον ανοσοεντοπισμό της α-γαλακτοσιδάσης χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα εναντίον της α-γαλακτοζιδάσης του *Coffea arabica*. Για τον έλεγχο της καταλληλότητας των αντισωμάτων, οι ηλεκτροφορημένες πρωτεΐνες εκχυλίσματος ώριμου πράσινου καρπού μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και ακολούθησε ο ανοσοεντοπισμός αυτών. Όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.3** το αντίσωμα κατά της α-γαλακτοσιδάσης αναγνώρισε μια ηλεκτροφορητική ζώνη.

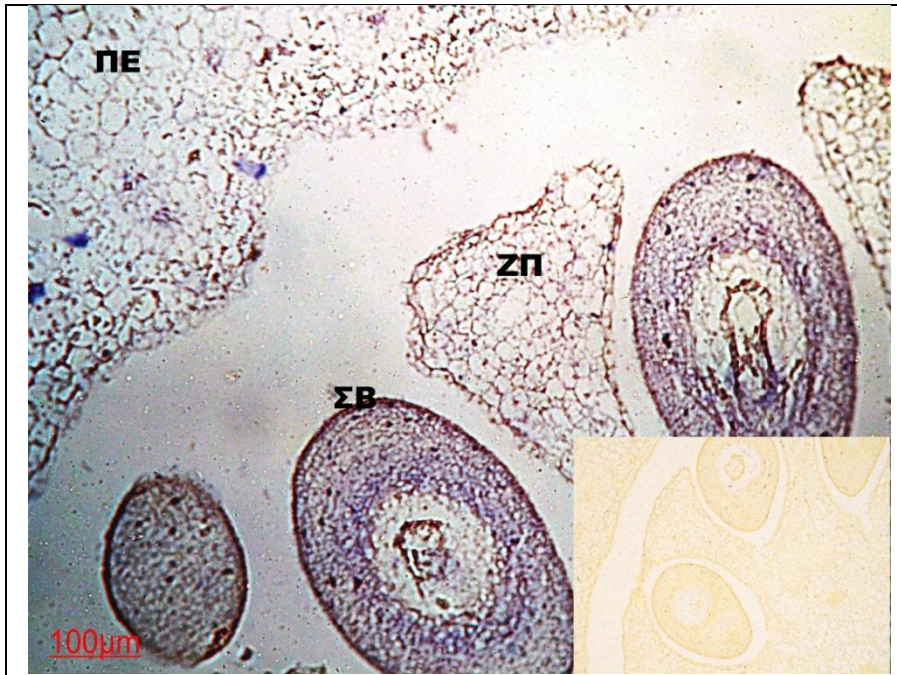


3.4 Ανοσοεντοπισμός της α-γαλακτοσιδάσης στις τομές των καρπών

Η α-γαλακτοσιδάση εντοπίστηκε σε ιστούς ένσπερων και παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας τύπου cherry σε διάφορα στάδια ανάπτυξης. Ο μωβ χρωματισμός δηλώνει την παρουσία της πρωτεΐνης του ενζύμου κατά τη στιγμή της προσήλωσης. Παρακάτω, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού του ενζύμου για κάθε στάδιο ανάπτυξης και οι αντίστοιχοι μάρτυρες.

3.4.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm.

Σε εγκάρσιες τομές στο στάδιο των 5mm του ένσπερου (**Εικόνα 3.4**) και παρθενοκαρπικού (**Εικόνα 3.5**) ανώριμου καρπού βρέθηκε πως το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες, καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Λιγότερο έντονο είναι το σήμα στην περιοχή του ζελατινώδους παρεγχύματος και στα κύτταρα του περικαρπίου.



Εικόνα 3.4 Ανοσοεντοπισμός της α-γαλακτοσιδάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στις σπερματικές βλάστες (ΣΒ) καθώς, και λιγότερο στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος (ΖΠ) και στα κύτταρα του περικαρπίου (ΠΕ) Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Ένθετος μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

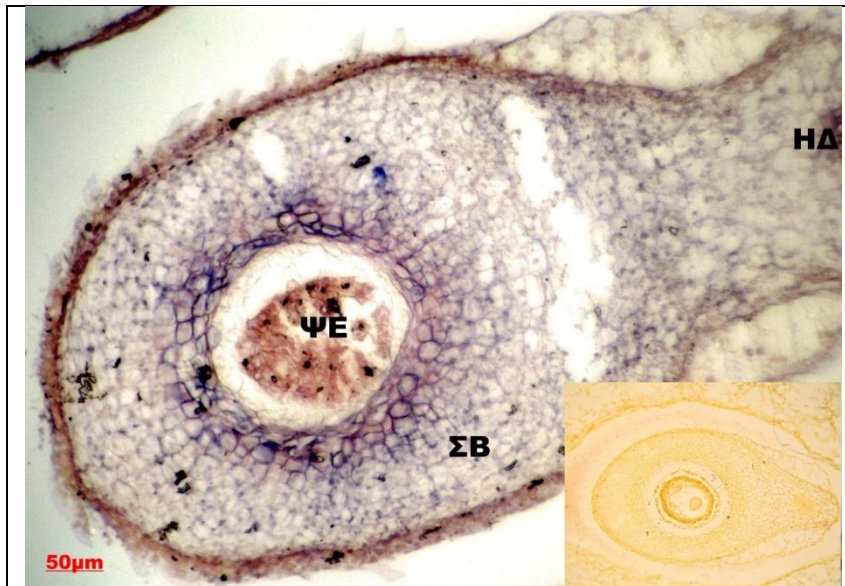


Εικόνα 3.5 Ανοσοεντοπισμός της α-γαλακτοσιδάσης σε παρθενοκαρπικό ανώριμο καρπό διαμέτρου 5mm. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στις σπερματικές βλάστες (ΣΒ) στις ημιαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ). Λιγότερο έντονο είναι το σήμα στα κύτταρα

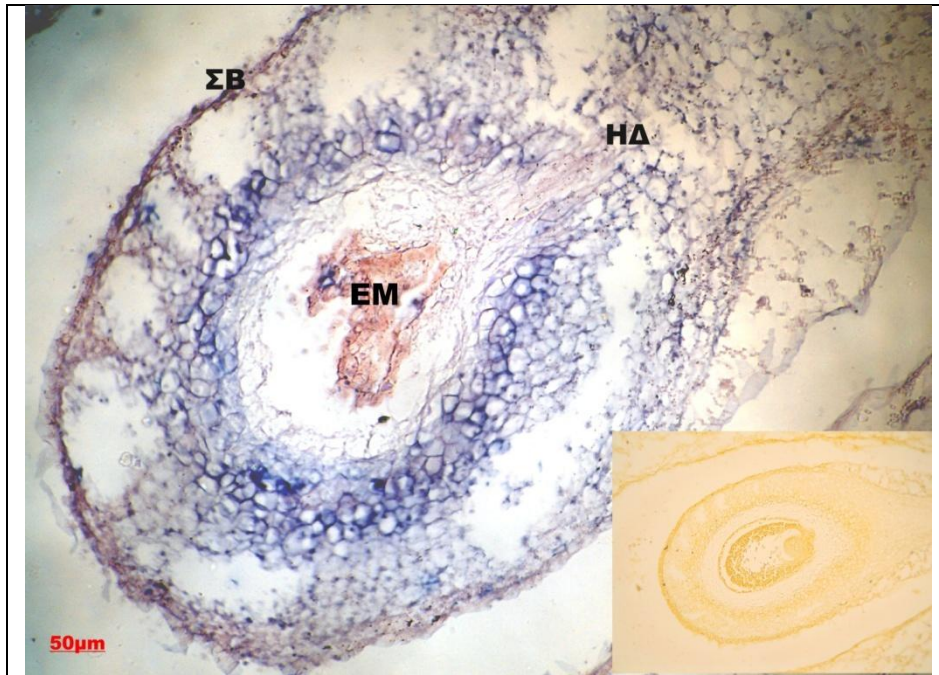
του ζελατινώδους παρεγχύματος (ΖΠ) και του περικαρπίου (ΠΕ). Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 5mm. Ένθετος μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

3.4.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm

Στο στάδιο του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, τόσο στους ένσπερμους(εικόνα 3.7) όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς(εικόνα 3.6), το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Ασθενέστερο ήταν το σήμα στα κύτταρα του περικαρπίου, του πλακούντα και στο ζελατινώδες παρέγχυμα.



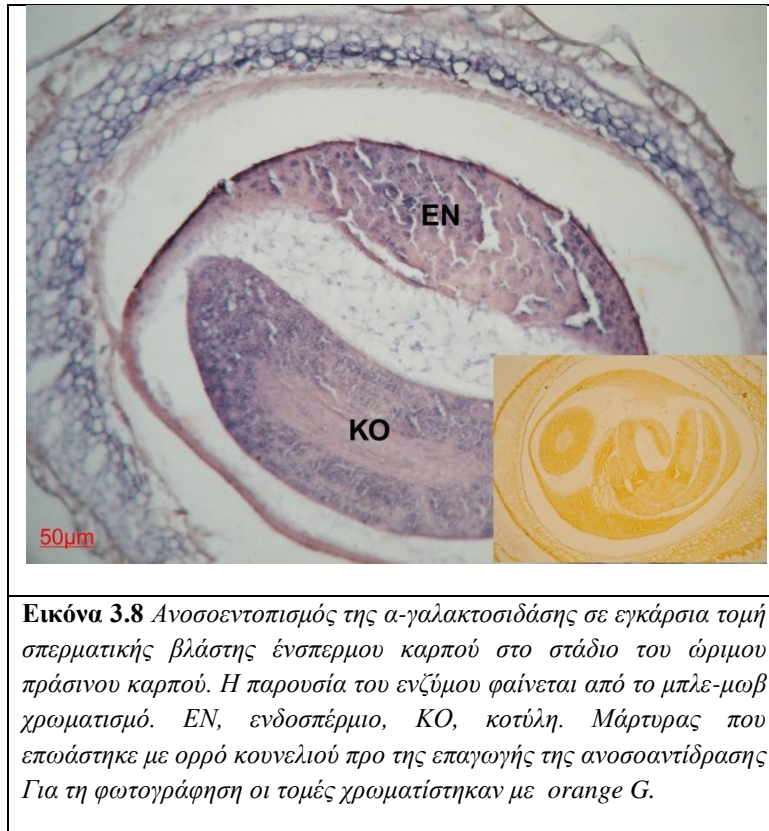
Εικόνα 3.6 Ανοσοεντοπισμός της α-γαλακτοσιδάσης σε παρθενοκαρπικό καρπό διαμέτρου 15mm σε μεγέθυνση. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ) καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ).(ΨΕ), ψευδοέμβρυο. Ένθετος μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G



Εικόνα 3.7 Ανοσοεντοπισμός της α- γαλακτοσιδάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 15mm. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ), ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) Ένθετος μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν Orange G

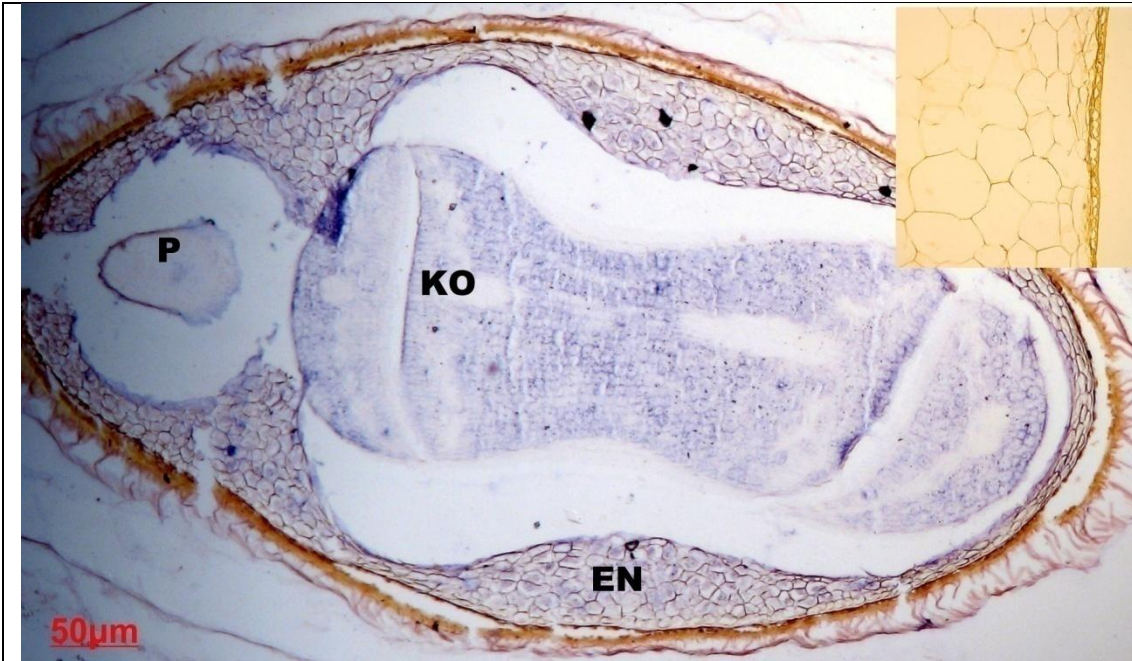
3.4.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού

Κατά το στάδιο του ώριμου ένσπερμου πράσινου καρπού η α-γαλακτοσιδάση εντοπίστηκε κυρίως στους ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου (**Εικόνα 3.8**). Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς όπως και στους υπόλοιπους ιστούς των ένσπερμων καρπών το σήμα του ανοσοεντοπισμού ήταν ασήμαντο.



3.4.4 Καρπός στο στάδιο αλλαγής χρώματος

Στον κανονικό καρπό κατά το στάδιο της αλλαγής χρώματος η α-γαλακτοσιδάση εντοπίστηκε κυρίως στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου σπέρματος (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9 Ανοσοεντοπισμός της α-γαλακτοσιδάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό., (P) Ρίζα, (KO) κοτύλη, (EN), ενδοσπέρμιο. Ένθετος Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

3.4.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού

Στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού η παρουσία του ενζύμου ήταν έντονη στο εσωτερικό των αναπτυσσόμενων σπερμάτων (**Εικόνα 3.10**), και εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.



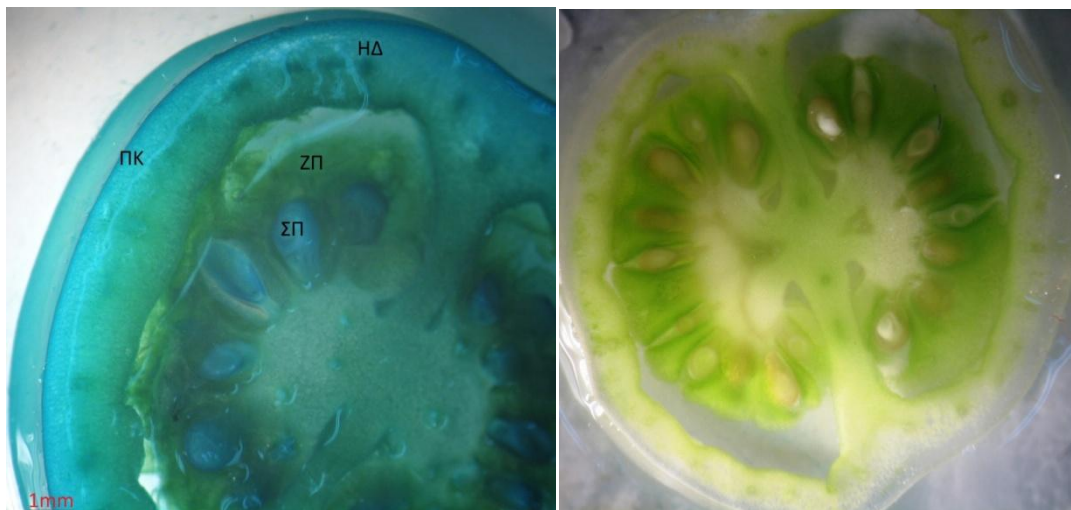
Εικόνα 3.10 Ανοσοεντοπισμός της α-γαλακτοσιδάσης σε εγκάρσια τομή στο

στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΕΜ, έμβρυο. Μάρτυρας που επώαστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

3.5 *In situ* εντοπισμός της δραστηριότητας της α-γαλακτοσιδάσης

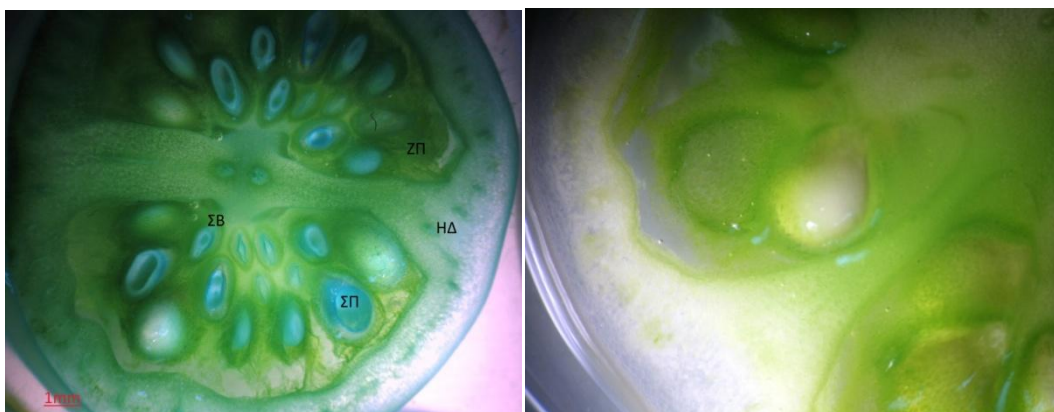
Δραστηριότητα της α-γαλακτοσιδάσης εντοπίστηκε σε ιστούς ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας τύπου cherry σε διάφορα στάδια ανάπτυξης με διάλυμα x-α-gal όπως φαίνεται στις **Εικόνες 3.11**-. Ο μπλέ χρωματισμός δηλώνει ότι το ένζυμο είναι ενεργό κατά τη στιγμή της προσήλωσης.

3.5.1 Ανώριμος πράσινος 15mm



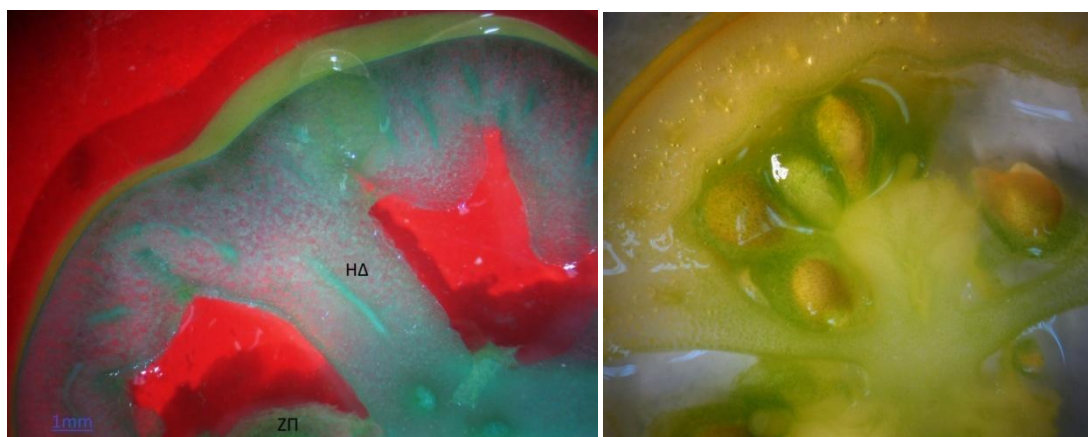
Εικόνα 3.11 Κατανομή δραστηριότητας της α-γαλακτοσιδάσης σε ανώριμους καρπούς 15mm σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Η δραστηριότητα του ενζύμου διακρίνεται με μπλέ χρωματισμό και είναι έντονη στις ηθμαγγειώδης δεσμίδες (ΗΔ), σπερματικές βλάστες (ΣΒ) και περικάρπιο (ΠΕ)..

3.5.2 Ωριμος πράσινος καρπός



Εικόνα 3.12 Κατανομή δραστηριότητας της α -γαλακτοσιδάσης σε ώριμους πράσινους καρπούς σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Η δραστηριότητα του ενζύμου διακρίνεται με μπλέ χρωματισμό και είναι έντονη στις, σπερματικές βλάστες (ΣΒ), ηθμαγγειώδης δεσμίδες (ΗΔ).

3.5.3 Καρπός στο στάδιο αλλαγής χρώματος

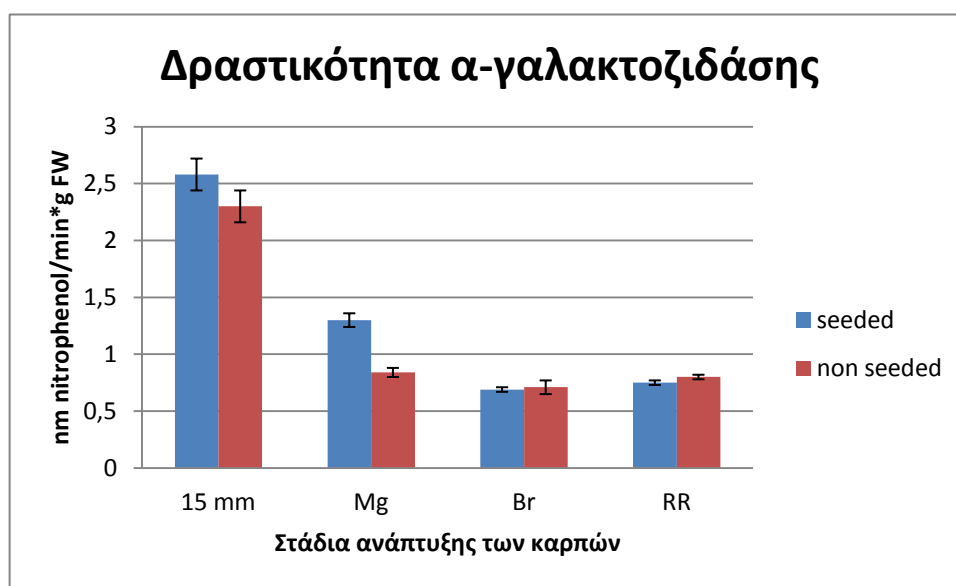


Εικόνα 3.13 Κατανομή δραστηριότητας της α -γαλακτοσιδάσης σε ώριμους καρπούς στο στάδιο αλλαγής χρώματος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο μάρτυρα. Η δραστηριότητα του ενζύμου διακρίνεται με μπλέ χρωματισμό και είναι έντονη στις, ηθμαγγειώδης δεσμίδες (ΗΔ) και στις σπερματικές βλάστες (ΣΒ).

3.6 Ο προσδιορισμός της *in vitro* δραστηριότητας της α -γαλακτοσιδάσης.

Η δραστηριότητα της α -γαλακτοσιδάσης προσδιορίστηκε στα τέσσερα υπό εξέταση στάδια (15mm, ώριμος πράσινος καρπός, στάδιο αλλαγής χρώματος, ώριμος

κόκκινος καρπός) τόσο σε ένσπερμους όσο και σε παρθενοκαρπικούς καρπούς. Τα αποτελέσματα φανερώνουν ότι η δραστηριότητα του ενζύμου είναι πιο έντονη στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του καρπού και μειώνεται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσής του. Η δραστηριότητα του ενζύμου στους ένσπερμους καρπούς κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους είναι ελαφρώς υψηλότερη από ότι στους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Από μελέτη της αμινοξικής ακολουθίας στο ExPASy-protein tools το ένζυμο έχει 80% πιθανότητα να βρίσκεται εξωκυτταρικά.

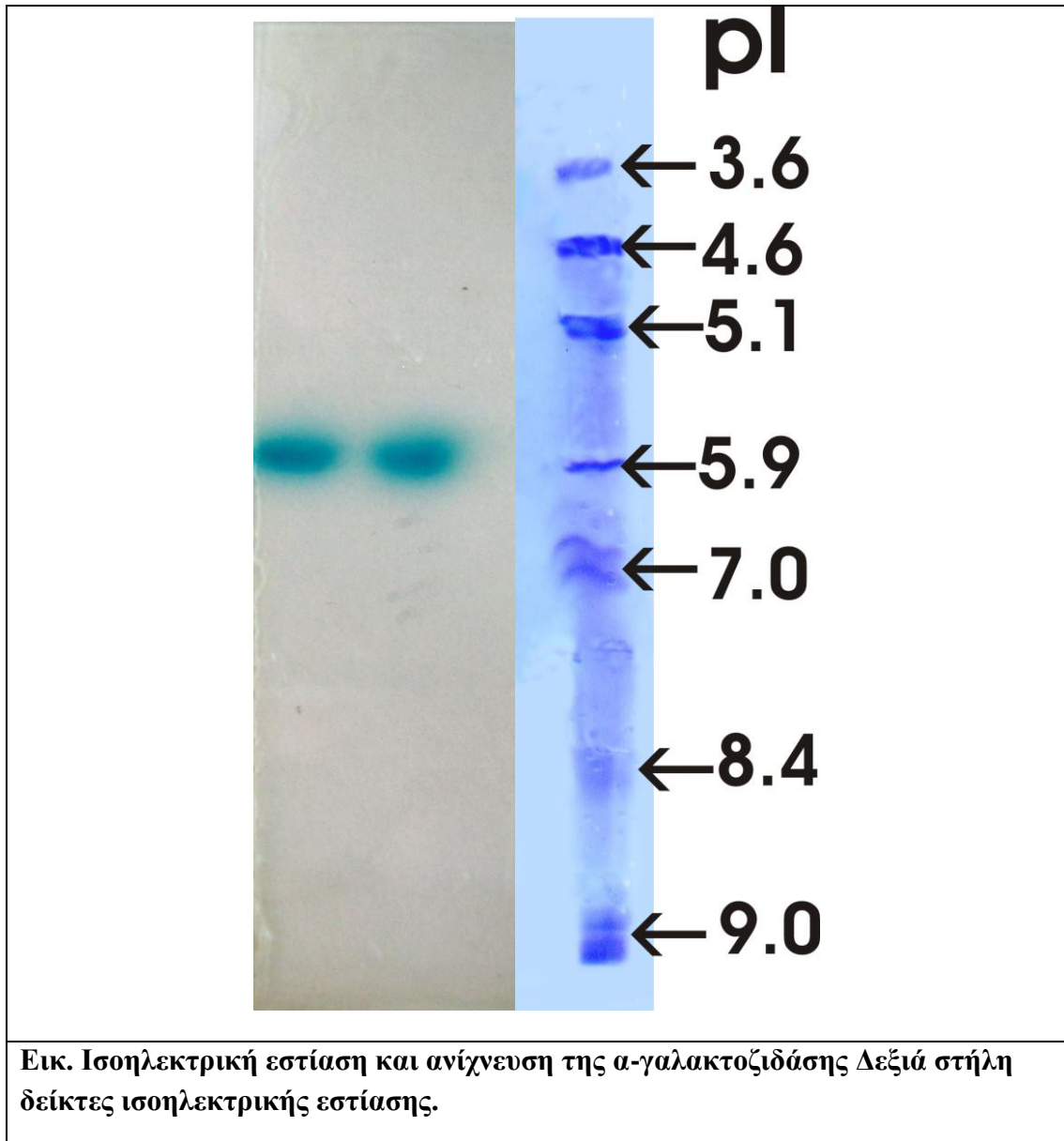


Σχήμα 3. Δραστηριότητα της α-γαλακτοζιδάσης σε 4 στάδια ανάπτυξης {ανώριμος καρπός διαμέτρου 15mm, ώριμος πράσινος καρπός (MG), καρπός στην αλλαγή χρώματος (Breaker) και ώριμος κόκκινος καρπός(RR)} παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας τύπου cherry. Οι μπάρες δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

3.7 Ισοηλεκτρική εστίαση

Για τη διερεύνηση της παρουσίας ισοτύπων του ενζύμου στα εκχυλίσματα των καρπών χρησιμοποιήσαμε την τεχνική της ισοηλεκτρικής εστίασης. Ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίστηκε στην περιοχή του pH 5,6-5,8.

Αναζήτηση του ισοηλεκτρικού σημείου των AAG16693 και AAF04591, στο Exrasy-protein tools, απέδωσε ισοηλεκτρικό σημείο της αλληλουχίας των αμινοξέων χωρίς τις πιθανές μεταμεταφραστικές τροποποιήσεις pI 4.95 και 5.3 αντίστοιχα.



Εικ. Ισοηλεκτρική εστίαση και ανίχνευση της α-γαλακτοζιδάσης Δεξιά στήλη δείκτες ισοηλεκτρικής εστίασης.

4. Συζήτηση

Χαρακτηρισμός cDNA κλώνων που κωδικοποιούν την α-γαλακτοσιδάση της τομάτας.

Από έρευνα στη βάση δεδομένων NCBI εντοπίσαμε δύο νουκλεοτιδικές ακολουθίες στην τομάτα τις *AK326720,1* και *MN_001247042,1* που κωδικοποιούν την α-γαλακτοσιδάση. Η μετάφραση αυτών των αλληλουχιών απέδωσε δύο πρωτεϊνικές αλληλουχίες την *AAG16693.1* και την *AAF0459*. Μετά από έλεγχο ομοιότητας των τελευταίων αλληλουχιών βρέθηκε ότι παρουσίασαν ομοιότητα 99,7% οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες θεωρήθηκαν ως μία και επ'αυτής σχεδιάστηκαν οι εκκινητές.

Το φυλογενετικό δένδρο των πρωτεϊνών της α-γαλακτοσιδάσης της τομάτας τις κατατάσσει σε ένα κλάδο μεταξύ των ευδικότυλων και μονοκότυλων φυτών (**Εικ. 3.1**)

Η έκφραση του γονιδίου της α-γαλακτοσιδάσης

Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων ήταν μεγαλύτερη στους ένσπερους καρπούς (**εικόνα 3.2**) πιθανόν λόγω της ύπαρξης του ενζύμου στο σπέρμα όπως καταγράφηκε και από τους Feurtado *et al* (2001) Πέραν αυτής της αναφοράς έκφραση του γονιδίου της όξινης α-γαλακτοσιδάσης δεν εντοπίστηκε στη διεθνή βιβλιογραφία.

Ο ανοσοεντοπισμός και η *in situ* δραστηριότητα του ενζύμου.

Όσον αφορά τον ανοσοεντοπισμό και τον εντοπισμό της δραστηριότητας της α-γαλακτοσιδάσης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των ένσπερων και παρθενοκαρπικών καρπών, η παρουσία του ενζύμου ήταν εντονότερη στους παρακάτω ιστούς.

Στο περικάρπιο τόσο των ένσπερων όσο και των παρθενοκαρπικών καρπών. Η παρουσία του ενζύμου ίσως να σχετίζεται με την αύξηση του καρπού και συγκεκριμένα με την αύξηση της ελαστικότητας των κυτταρικών τοιχωμάτων, κατά την αύξηση του μεγέθους των κυττάρων και την κυτταρική διαίρεση, μέσω της αλληλεπίδρασής της με τις γαλακτομαννάνες (Bewley, 1997; Redgwell *et al.*, 2003; Marraccini *et al.*, 2005).

Στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες τόσο των έσπερμων όσο και των παρθενοκαρπικών καρπών, όπου το ένζυμο ίσως σχετίζεται με την πιθανή αποδόμηση και μεταφορά της σταχυόζης στον ηθμό (Keller and Pharr, 1996; Gao and Schaffer, 1999, Pharr and Sox, 1984; Gaudreault and Webb, 1986).

Στους ένσπερμους καρπούς το ένζυμο εντοπίστηκε στις σπερματικές βλάστες, το ενδοσπέρμιο και τα όργανα του εμβρύου, όπως αναφέρουν και οι Feurtado *et al* (2001). Παρουσία του ενζύμου στους ιστούς αυτούς ίσως σχετίζεται με την , το οποίο πιθανολογεί τη συμβολή του ενζύμου στην κυτταρική αύξηση.

Ισοηλεκτρική εστίαση

Βρέθηκε μια όξινη α-γαλακτοζιδάση με pI που κυμαίνεται στην περιοχή 5,6-5,8. Στην πλειονότητα των φυτών η α-γαλακτοζιδάση απαντάται σε δυο ή περισσότερους ισότυπους (όξινη και αλκαλική)(Soh *et al.*,2006, Kim *et al.*, 2003). Στην τομάτα όμως, εντοπίσαμε μόνο μία. Ένα άλλο γονίδιο που εντοπίστηκε ομοιάζει περισσότερο με ένζυμα που σχετίζονται με την αποδόμηση ή τη σύνθεση των RFO και γιαυτό το λόγο τα αποτελέσματα που αφορούν τις μεταβολές των μεταγραφημάτων του κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού δεν αναφέρονται. Τα αποτελέσματα που αφορούν την ισοηλεκτρική εστίαση της α-γαλακτοζιδάσης συμφωνούν εν μέρει με αυτά των Feurtado *et al* (2001) οι οποίοι ισχυρίζονται ότι το ισοηλεκτρικό σημείο του ενζύμου είναι 4,6-4,8. Η αναζήτηση του pI του ενζύμου βάσει της αμινοξικής ακολουθίας μέσω ExPASy tools απέδωσε pI 4.95.

Δραστικότητα α-γαλακτοζιδάσης

Η δραστικότητα του ενζύμου (**Σχήμα 3**), παρουσιάζει μέγιστη τιμή στο στάδιο των ανώριμου πράσινου καρπού διαμέτρου 15mm, τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, και στη συνέχεια μειώνεται. Αυτό ίσως να οφείλεται στην αύξηση του καρπού όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

5. Συμπεράσματα

- Βρέθηκε μια μόνο όξινη α-γαλακτοζιδάση στον καρπό της τομάτας.
- Η συγκέντρωση και η έκφραση του ενζύμου ήταν μεγαλύτερη στους ένσπερμους από ότι στους παρθενοκαρπικούς.
- Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν μεγαλύτερη στους ιστούς της σπερματικής βλάστης από ότι στους υπόλοιπους ιστούς του καρπού.

6. Βιβιογραφία

- Ολύμπιος ΧΜ** (2001) Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. Σταμούλης, Αθήνα. σελ. 40-44
- Abdalla AA, Verkerk K** (1968) Growth, flowering and fruit set of the tomato at high temperature. *Neth J Agri Sci* **16**: 71-76
- Allaby M** (1998) Oxford dictionary of plant sciences. Oxford University Press, New York. pp. 262
- Archbold DD, Jr Dennis FG, Fiore JA** (1982) Accumulation of ¹⁴C labelled material from foliarapplied ¹⁴C sucrose by tomato ovaries during fruit set and initial development. *J Am Soc Hort Sci* **107**: 19-23
- Asahira, T., H. Takagi, Y. Takeda and Y. Tsukamoto.** 1968. Studies on fruit development in tomato II. Cytokinin activity in extracts from pollinated, auxin-and gibberellin-induced parthenocarpic tomato fruits and its effect on the histology of the fruit. *Memoirs Res. Inst. Food Sci. Kyoto Univ.* **29**: 24–54.
- Ashworth, S., Hume, S. P., Lammertsma, A. A., Opacka-Juffry, J., Shah, F., and Pike, V. W.** (1996). Development of central 5-HT 2A receptor radioligands for PET: Comparison of [H]RP 62203 and [3H]SR 46349B kinetics in rat brain. *Nucl Med Biol* **23**: 245–250.
- Atherton J, Rudich G** (1986) Tomato crop. A scientific basis for improvment. Chapman and Hall UK
- Bachmann M.F., T.M. Kundig, G. Freer, Y. Li, C.Y. Kang, D.H. Bishop, H. Hengartner, R.M. Zinkernagel,** (1994). Induction of protective cytotoxic T cells with viral proteins *Eur. J. Immunol.*, 24 (1994), pp. 2128–2236
- Bewley J.D.,** (1997), Breaking down the walls—a role for endo-b-mannanase in release from seed dormancy? *Trends Plant Sci.* **2**, 464–469.

- Bloechl, A., Peterbauer, T., Hofmann, J., Richter, A.,** 2008. Enzymatic breakdown of raffinose oligosaccharides in pea seeds. *Planta*. **10**.1007/s00425-008-0722-4.
- Bloechl, A., Peterbauer, T., Richter, A.,** 2007. Inhibition of raffinose oligosaccharide breakdown delays germination of pea seeds. *J. Plant Physiol.* **164**, 1093–1096.
- Bulpin, P.V., Gidley, M.J., Jeffcoat, R.,** 1990. Development of a biotechnological process for the modification of galactomannan polymers with plant agalactosidase. *Carbohydr. Polym.* **12**, 155–168.
- Bunger-Kibler S, Bangerth F** (1982) Relationship between cell number, cell size and fruit size of seeded fruits of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), and those induced parthenocarpically by the application of plant growth regulators. *Plant Growth Regul* **1**: 143-154
- Carmi, N., Zhang, G., Petreikov, M., Gao, Z., Eyal, Y., Granot, D., SchaVer, A.A.,** 2003. Cloning and functional expression of alkaline α -galactosidase from melon fruit: similarity to plant SIP proteins uncovers a novel family of plant glycosyl hydrolases. *Plant J.* **33**, 97–106.
- Carpita NC, Gibeaut DM** (1993) Structural models of primary cell walls in Xowering plants: consistency of molecular structures with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**:1–30
- Cassab GI.,** (1998) Plant cell wall proteins. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**:281–309
- Chrost · Bozena, Uener Kolukisaoglu, Burkhard Schulz, · Karin Krupinska,** (2007). An α -galactosidase with an essential function during leaf development. *Planta* (2007) **225**:311–320
- Chrost B, Krupinska K** (2000). Genes with homologies to known α -galactosidases are expressed during senescence of barley leaves. *Physiol Plant* **110**:111–119

- Chrost B, Schmitz K** (2000). Purification and characterization of multiple forms of α -galactosidases in *Cucumis melo* plants. *J Plant Physiol* **156**:483–491
- Chrost B, Daniel A, Krupinska K** (2004) Regulation of α -galactosidase gene expression in primary foliage leaves of barley (*Hordeum vulgare* L.) during dark-induced senescence. *Planta* **218**:886–889
- Coombe, B.** (1976). The development of fleshy fruits. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **27**, 207–228.
- Crookes PR, Grierson D** (1983) Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. *Plant Physiol* **172**: 1088-1093
- Darley CP, Forrester AM, McQueen-Mason SJ** (2001) The molecular basis of plant cell wall extension. *Plant Mol Biol* **47**:179–195
- Davies JW, Cocking EC** (1965). Protein synthesis in tomato fruit locule tissue: Incorporation of amino acids into protein by aseptic cell-free systems. *Biochem. J.* **104**:23-33.
- Dey PM, Campillo ED** (1984) Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **56**: 141–249.
- Dey, P.M., Pridam, J.B.,** (1972). Biochemistry of α -galactosidases. *Adv. Enzymol.* **36**, 114–118.
- Falavigna, A., Badino, M. and Soressi, G. P.** (1978). Potential of the monomendelian factor *pat* in the tomato breeding for industry. *Genetica Agraria* **32**, 159-160
- Falkoski, D.L., Guimaryes, V.M., Callegari, C.M., Reis, A.P., Barros, E.G., Rezende, S.T.,** 2006. Processing of soybean products by semipurified plant and microbial α -galactosidases. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 10184–10190.

- FAO** (1985). Αναφορά από **Wangdi PC** (1992) Cherry tomato varietal trial. In: Training report 1991. 10th Regional Training Course in Vegetable Production and Research. AVRDC-TOP Bangkok, Thailand
- Fialho RC, Bócher J** (1995) Changes in levels of foliar carbohydrates and myo-inositol before premature leaf senescence of *Populus nigra* induced by a mixture of O₃ and SO₂. *Can J Bot* **74**:965–970
- Ganter, C., Bock, A., Buckel, P., Mattes, R.**, 1988. Production of thermostable recombinant α-galactosidase suitable for raffinose elimination from sugar beet syrup. *J. Biotechnol.* **8**, 301–310.
- Gao Z, Schaffer AA** (1999) A novel alkaline α-galactosidase from melon fruit with a substrate preference for raffinose. *Plant Physiol* **119**:979–987
- Gaudreault PR, Webb JA** (1986) Alkaline α-galactosidase activity and galactose metabolism in the family cucurbitaceae. *Plant Sci* **45**: 71–75
- George W, Scott J, Spiltstoesser W** (1984) Parthenocarpy in tomato. *Hort Rev* **6**: 65-84
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451
- Grierson D, Kader AA** (1986) Fruit ripening and quality. In: The Tomato Crop. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company. pp. 241-275
- Gough C, Hobson GE** (1990) A comparison of the productivity, quality, shelf life characteristics and consumer reaction to the crop from cherry tomato plants grown at different levels of salinity. *J Hort Sc* **65**: 431-439
- Guimaraes, V.M., Rezende, S.T., Moreira, M.A., Barros, E.B., Felix, C.R.**, (2001). Characterization of α-galactosidases from germinating soybean seed and their use for hydrolysis of oligosaccharides. *Phytochemistry* **58**, 63–67.

- Gustafson FG** (1936) Inducement of fruit development by growth promoting chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* **22**: 628-636
- Hallman E, Kobryń J** (2003) Yield and quality of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) cultivated on rockwool and cocofibre. *Acta Hort* **614**: 693-697
- Harris WM, Spurr AR** (1969) Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am J Bot* **56**: 380–389
- Haritatos E., Medville R., Turgeon R.** (2000). Minor vein structure and sugar transport in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211** 105–111
- HEISER C., ANDERSON G.** 1999. “New” Solanums In: Perspectives on new crops and new uses. J. JANICK (Ed.) ASHS Press, Aleksandria, VA: 379-384 pp.
- Hinesley, L., D. Pharr, L. Snelling and S. Funderburk.** (1992). Foliar raffinose and sucrose in four conifer species: relationships with seasonal temperature. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **117**:852–855.
- Ho LC, Sjut V, Hoad GV** (1983) The effect of assimilate supply on fruit growth and hormone levels in tomato plants. *Plant Growth Regul* **1**: 155-171
- Ho LC, Hewitt JD** (1986) Fruit development. In: The Tomato Crop. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company. pp. 201-239
- Horbowicz, M., Brenac, P., Obendorf, R.L.,** 1998. Fagopyritol B1, O-a-D-galactopyranosyl-(1-2)-D-chiro-inositol, a galactosyl cyclitol in maturing buckwheat seeds associated with desiccation tolerance. *Planta* **205**, 1–11.
- Hobson G** (1988) Cherry tomatoes. The Garden pp 55-60
- Houghtaling, H.B.** (1935). A developmental analysis of size and shape in tomato fruits. Bulletin of the Torrey Botanical Club 62, 243-252: 250. 1996.
- Howlett FS** (1939) The modification of flower structure by environment in varieties of *Lycopersicon esculentum*. *J Agr Res* **58**: 79-117

- Janes BE** (1941) Some chemical differences between artificially produced parthenocarpic fruits and normal seeded fruits of tomato. *Am J Bot* **28**: 639-646
- Karr-Lilienthal, L.K., Bauer, L.L., Utterback, P.L., Zinn, K.E., Frazier, R.L., Parsons, C.M., Fahey Jr., G.C.**, 2006. Chemical composition and nutritional quality of soybean meals prepared by extruder/expeller processing for use in poultry diets. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 8108–8114.
- Keller, F., Pharr, D.M.**, 1996. Metabolism of carbohydrates in sinks and sources: galactosyl-sucrose oligosaccharide. In: Zamski, E., Schaffer, A.A. (Eds.), *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops*. Marcel Dekker, New York, pp. 157–184.
- Kim, W.D., Kaneco, S., Park, G.G., Tanaka, H., Kusakabe, I., Kobayashi, H.**, (2003). Purification and characterization of α -galactosidase from sunflower seeds. *Biotechnol. Lett.* **25**, 353–358.
- Koltunow AM, Grossniklaus U** (2003) Apomixis: A developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 547-574
- Lee, R.H., Lin, M.C., Chen, S.C.**, 2004. A novel alkaline α -galactosidase gene is involved in rice leaf senescence. *Plant Mol. Biol.* **55**, 281–295.
- Long VH** (1998) Cherry tomato seed production. AVRDC-ARC Research Report
- Lukyanenko AN** (1991) Parthenocarpy in tomato. In: Genetic improvement of tomato (ed. Kalloo G). *Monographs on Theor Appl Genet* Springer-Verlag, Berlin. pp. 167-177
- Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP** (1978) Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant Cell Physiol* **19**: 1281-1288
- Margolles-Clark, E., Tenkanen, M., Luonteri, E., Penttila, M.**, (1996).

- Three α -galactosidase genes of *Trichoderma reesei* cloned by expression in yeast. *Eur J. Biochem.* **240**, 104–111.
- Marraccini, P., Rogers, W.J., Caillet, V., Deshayes, A., Granato, D., Lausanne, F., Lechat, S., Pridmore, D., Putiard, V.**, 2005. Biochemical and molecular characterization of α -D-galactosidase from coffee beans. *Plant Physiol. Biochem.* **43**, 909–920.
- Meredith FI, Purcell AE** (1966) Changes in the concentration of carotenes of ripening homestead tomatoes. *J Am Soc Hort Sci* **89**: 544-548
- Mohr WP, Stein M** (1969) Fine structure of fruit development in tomato. *Can J Plant Sci* **49**: 549–553
- Muller, C. H. (1940)**. Plant succession in the *Larrea–Flourensia* climax. *Ecology* **21**, 206–212.
- Nitsch, J. P. 1952**. Plant hormones in the development of fruits. *Quart. Rev. Biol.* **27**, 33.
- Nogler, G.A.** (1984a). Gametophytic apomixis. In *Embryology of Angiosperms*, B.M. Johri, ed (Berlin: Springer-Verlag), pp. 475–518.
- Nogler, G.A.** (1984b). Genetics of apospory in apomictic *Ranunculus auricomus*. V. Conclusion. *Bot. Helv.* **94**, 411–422.
- Nunan KJ, Davies C, Robinson SP, Fincher GB** (2001) Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development. *Planta* **214**:257–264
- Omidiji, M.O.**, 1979. Crossability relationships between some species of *Solanum*, *Lycopersicon* and *Capsicum* cultivated in Nigeria. In: Hawkes, J.G., Lester, R.N. & Skelding, A.D. (Editors). *The biology and taxonomy of the Solanaceae*. Academic Press, London, United Kingdom. pp. 599–604.
- Osborne, D.J. and F.W. Went.** 1953. Climatic factors influencing parthenocarpy and normal fruit-set in tomatoes. *Bet. Gaz.* **114**:312-322.

- Pennycooke JC, Jones ML, StushnoV C** (2003) Down-regulating α -Galactosidase enhances freezing tolerance in transgenic petunia. *Plant Physiol* **133**:1–9
- Pharr DM, Sox HN** (1984) Changes in carbohydrate and enzyme levels during the link to source transition of leaves of *Cucumis sativus* L., a stachyose translocator. *Plant Sci Lett* **35**: 187–193
- Philouze J** (1983b) Natural parthenocarpy in tomato. I. Bibliographical review. *Agronomie* **3**: 611- 620
- Philouze J** (1989) Natural parthenocarpy in tomato. IV. A study of the polygenic control of parthenocarpy in line 75/59. *Agronomie* **9**: 63-75
- Philouze J, Maisonneuve B** (1978) Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety *Severianin*. *Tomato Genet Coop Rep* **28**: 12-13
- Philouze J, Pecaut P** (1986) Natural parthenocarpy in tomato. III. Study of the parthenocarpy due to the gene *pat* (parthenocarpic fruit) in the line *Montfavet 191*. *Agronomie* **6**: 243-248
- Quiros CF** (1974). Αναφορά από **Warnock SJ** (1988) A review of taxonomy and phylogeny of the genus *Lycopersicon*. *Hortscience* **23**: 669-673
- Rabinowitch HD, Budowski P, Kedar N** (1975) Carotenoids and epoxide cycles in mature-green tomatoes. *Planta* **122**: 91–97
- Raffo A, Leopardi C, Fogliano V, Ambrosino P, Salucci M, Gennaro L, Bugianesi R, Giufridda F, Quaglia G** (2002) Nutritional value of cherry tomatoes (*Lycopersicon esculentum* cv. *Naomi F1*) harvested at different ripening stages. *J Agr Food Chem* **50**: 6550–6556
- Redgwell, R.J., Curti, D., Rogers, J., Nicolas, P., Fischer, M.,** (2003). Changes to the galactose/mannose ratio in galactomannans during coffee bean (*Coffea Arabica* L.) development: implications for in vivo modification of galactomannan synthesis. *Planta* **217**, 316–326.

- Reid, J.S.G., Meier, H.**, 1973. Enzymatic activities and galactomannan mobilization in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L. Leguminosae). Secretion of α -galactosidase and β -mannosidase by the aleurone layer. *Planta* **12**, 301–308.
- Rick, C. M.**, (1976). Natural variability in wild species of *Lycopersicon* and its bearing on tomato breeding. *Genet. Agrar.* **30**(3/4):249-259.
- Rick CM** (1978) The tomato. *Sci Amer* **239**: 77-87
- Rosso, S.W.** (1968) The ultrastructure of chromoplast development in red tomatoes. *Journal of Ultrastructural Research* **25**, 307–322.
- Rubatzhy VE, Yamaguchi M** (1997) World vegetables (principles, production and nutritive values). Chapman and Hall, London. pp. 533-553
- Ryden P, Sugimoto-Shirasu K, Smith AC, Findlay K, Reiter WD, McCann MC** (2003) Tensile properties of Arabidopsis cell walls depend on both a xyloglucan cross-linked network and rhamnogalacturonan II-borate complexes. *Plant Physiol* **132**:1033–1040
- Santarius K. A.**, (1973). *Planta* **14**. VIII. 1973, Volume 113, Issue 2, pp 105-114
- Santarius K. A., Milde H.**, (1977). *Planta* **136**, 163-166
- Sawhney VK, Greyson RI** (1971) Induction of multilocular ovary in the tomato by gibberellic acid. *J Am Soc Hort* **96**: 196-198
- Setha OE** (1995) Cherry tomato varietal trial. ARC Training report
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Park, G.-G., Komatsu, Y., Sato, T., Kaneko, R., Nagasaki, H., Yoshida, S., Kasamo, K., Kusakabe, I.**, (1995a). Purification and some properties of α -galactosidase from *Penicillium purpurogenum*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 2333–2335.
- Shibuya, H., Kobayashi, H., Sato, T., Kim, W.-S., Yoshida, S., Kaneko, S., Kasamo, K., Kusakabe, I.**, (1997). Purification, characterization and cDNA

cloning of a novel α -galactosidase from *Mortierella vinacea*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 592–598.

Simpson DJ, Baqar MR, Mcglasson WB, Lee TH (1976) Changes in Ultrastructure and Pigment Content During Development and Senescence of Fruits of Normal and *rin* and *nor* Mutant Tomatoes. *Australian Journal of Plant Physiology* **3**, 575–587.

Smart EL, Pharr DM, (1980). Characterization of α -galactosidase from cucumber leaves. *Plant Physiol* **66**:731–734

Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **29**: 417–426

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

Thompson JE, Froese CD, Madey E, Smith MD, Hong YD (1998). Lipid metabolism during plant senescence. *Prog Lipid Res* **37**:119–141

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

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

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

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

- Walker, JR, A Kovarik, JS Allen, RA Gustafson** (1975). Regulation of bacterial cell division: temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* that are defective in septum formation. *J. Bacteriol.* **123**(2):693-703
- Wiemken V., Ineichen K.**, (1993). *Effect of temperature and photoperiod on the raffinose content of spruce roots.* *Planta*; **190**:387-392.
- Wilson LA, Sterling C** (1976) Studies on the cuticle of tomato fruit. I. Fine structure of the cuticle. *Z Pflanzenphysiol* **77**: 359 – 371.
- Xuan PT** (1999) Effect of potassium nitrate on seed production of cherry tomato. ARC Training report
- Zhao, T.Y., Corum, J.W., Mullen, J., Meeley, R.B., Helentjaris, T., Martin, D., Downie, B.**, 2006. An alkaline alpha-galactosidase transcript is present in maize seeds and cultured embryo cells, and accumulates during stress. *Seed Sci. Res.* **16**, 107–121.