

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ**

**ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ**  
**ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗ ΚΑΙ ΣΥΓΧΡΟΝΑ**  
**ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑΣ ΚΑΙ**  
**ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ**

**Ανοσοεντοπισμός και δραστικότητα της**  
**πυροφωσφορυλάσης της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης**  
**(UGPάσης) σε παρθενοκαρπικούς και μη καρπούς τομάτας**  
**τύπου cherry κατά τη διάρκεια ανάπτυξής τους.**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗ**  
**ΚΑΘΗΓΗΤΗ Κ. ΑΚΟΥΜΙΑΝΑΚΗ**

**ΡΟΥΝΗΣ Α. ΒΑΣΙΛΗΣ**

**ΑΘΗΝΑ 2011**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗ  
ΚΑΘΗΓΗΤΗ Κ. ΑΚΟΥΜΙΑΝΑΚΗ**

**Ανοσοεντοπισμός και δραστικότητα της  
πυροφωσφορυλάσης της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης  
(UGPάσης) σε παρθενοκαρπικούς και μη καρπούς τομάτας  
τύπου cherry κατά τη διάρκεια ανάπτυξής τους.**

Η ανάθεση της παρούσας μελέτης  
έγινε με απόφαση της υπ. αριθ. 186  
της 16/02/2011 Γενικής Συνέλευσης  
του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Αν. Καθηγητής Κ. Ακουμιανάκης Επιβλέπων

Καθηγητής Χ. Πάσσαμ Μέλος

Αν. Καθηγητής Γ. Αϊβαλάκις Μέλος

## Περίληψη.

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η πυροφωσφορυλάση της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζη (UGPάση) σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς τομάτας τύπου cherry, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Τα στάδια που επιλέχθηκαν ήταν νεαροί πράσινοι καρποί διαμέτρου 5mm και 15mm, ώριμοι πράσινοι καρποί, καρποί στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι καρποί. Οι παρθενοκαρπικές τομάτες αναπτύχθηκαν μετά την αφαίρεση των ανθών από κλειστά άνθη και την ακόλουθη εφαρμογή 50ppm β-ναφθοξυοξικού οξέος. Για τη μελέτη του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ο ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης και η εκτίμηση της δραστηριότητας του ενζύμου σε εκχυλίσματα των καρπών από τα παραπάνω στάδια (εκτός του σταδίου των 5mm). Η UGPάση εντοπίστηκε έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες σε όλα τα υπό μελέτη στάδια, τόσο στους παρθενοκαρπικούς όσο και στους ένσπερμους καρπούς. Στους ένσπερμους καρπούς η UGPάση εντοπίστηκε έντονα στα όργανα του εμβρύου και το ενδοσπέρμιο. Τέλος, η UGPάση εντοπίστηκε στο περικάρπιο και το ζελατινώδες παρέγχυμα των καρπών, το σήμα όμως του εντοπισμού ήταν λιγότερο έντονο. Από τον εντοπισμό του ενζύμου είναι δυνατόν να λεχθεί ότι το ένζυμο είναι ενεργό σε όλο σχεδόν τον καρπό. Η δραστηριότητα του ενζύμου ήταν κατά τι υψηλότερη στους ένσπερμους καρπούς σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς, γεγονός το οποίο, σε συνδυασμό με τις ενδείξεις από τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης, είναι δυνατόν να αποδοθεί κατά το μέγιστο μέρος της στην ανάπτυξη του εμβρύου. Το πρότυπο αυτό του εντοπισμού παραπέμπει στη συμμετοχή της UGPάσης στη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων κυρίως στους αναπτυσσόμενους ιστούς. Μέρος της αυξημένης δραστηριότητας του ενζύμου στα στάδια του ώριμου πράσινου καρπού είναι δυνατόν να συσχετιστεί με την υδρόλυση της σακχαρόζης που συμβαίνει στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του καρπού. Τέλος μελετήθηκε η έκφραση των γονιδίων που κωδικοποιούν το ένζυμο.

## **Abstract**

In the present study the activity and immunolocalization of uridine diphosphate pyrophosphorylase (UGPase) in parthenocarpic and seeded tomato fruits were studied. The selected stages of fruits were: developing fruits of diameter 5mm and 15mm, mature green, breaker and red ripe fruits. Parthenocarpic fruits were developed after the application of 50ppm  $\beta$ -naphthoxyacetic acid on emasculated closed flowers. UGPase was heavily localized in vascular bundles of all organs examined of arthenocarpic and seeded fruits. In seeded fruits the UGPase protein was also heavily localized in embryo organs and in the endosperm. The localization signal was however less intense in locular parenchyma and pericarp. From immunolocalization pattern it is possible to conclude that the enzyme is active in all fruit tissues. Enzyme activity was slightly higher in seeded than in parthenocarpic fruits, which could be attributed mainly to the growth of the embryo. The pattern of localization points to the possible involvement of UGPase in cell wall biosynthesis, mainly in developing tissues. A part of the higher enzyme activity in the mature green fruits is possible to be correlated with sucrose breakdown that occurs in the last stages of fruit development. Finally, the expression of the genes coding the enzyme was studied.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Κ. Ακουμιανάκη καθώς και στο Εργαστήριο της Φυσιολογίας Φυτών, στα πλαίσια του προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω: Τον επιβλέποντα, Αν. Καθηγητή κ. Κ. Ακουμιανάκη καθώς και τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής, Καθηγητή κ. Χ. Πάσσαμ και τον Αν. Καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι για τις διορθώσεις που εισηγήθηκαν καθώς και για την αξιολόγηση της παρούσας μελέτης.

Τον Δρ. Ι. Καραπάνο, τον υποψήφιο διδάκτορα Γ. Τσανικλίδη, την Δρ Α.Ε. Νικολοπούλου, και τους συνάδελφους Φ. Γρηγορίου, Κ. Σκαρμούτσο για την αμέριστη και διαρκή βοήθειά τους καθώς και για την άψογη συνεργασία μας.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένεια μου για την ηθική και οικονομική συμπαράσταση, δίχως την υπομονή και την κατανόησή τους δεν θα μπορούσα να πραγματοποιήσω το στόχο μου.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή .....	8
1.1 Η τομάτα cherry.....	9
1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας.....	9
1.1.2 Φυλογένεση - βοτανική ταξινόμηση και καταγωγή της τομάτας τύπου cherry. 9	
1.1.3 Διαιτητική αξία του καρπού της τομάτας τύπου cherry. ....	11
1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry.....	12
1.1.5 Μορφολογία και ανατομία του καρπού.....	13
1.1.6 Η ανάπτυξη του καρπού.....	16
1.1.6.1 Πρώιμη ανάπτυξη καρπού.....	17
1.1.6.2 Ωριμος πράσινος καρπός.....	19
1.1.6.3 Ωρίμανση του καρπού.....	20
1.2 Η Παρθενοκαρπία.....	21
1.2.1 Οι τρεις κύριες πηγές παρθενοκαρπίας στην τομάτα.....	22
1.2.2 Μηχανισμός της παρθενοκαρπίας.....	22
1.2.3 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα.....	25
1.2.4 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία.....	26
1.2.5 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας.....	26
1.3 Η πυροφωσφορυλάση της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UGPάση).....	28
1.3.1 Δομή του ενζύμου.....	31
1.3.1.1 Δομή της UGPάσης στο <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	31
1.3.1.2 Δομή των υπομονάδων της Ugp1p.....	32
1.3.1.3 Κατάσταση ολιγομερίωσης της Ugp1p.....	33
1.3.1.4 Η UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (AGX1) ως πρότυπο των UGPασών.....	33
1.3.1.5 Δομή της UGPάσης στο <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	34
1.3.1.6 Κατάσταση ολιγομερίωσης της UGPάσης στο <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	36
1.3.2 Η ρύθμιση της ενεργότητας της UGPάσης.....	36
1.3.2.1 Η ολιγομερίωση ως γενικός ρυθμιστικός μηχανισμός των πυροφωσφορυλασών.....	36
1.3.2.2 Άλλοι μηχανισμοί ρύθμισης της ενεργότητας της UGPάσης.....	38
1.3.3 Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου.....	39
1.3.3.1 Η ρύθμιση της έκφρασης της UGPάσης από τη σακχαρόζη.....	42
1.3.3.2 Η ρύθμιση της έκφρασης της UGPάσης κάτω από συνθήκες καταπόνησης.....	43
1.4 Πόσα γονίδια κωδικοποιούν την UGPάση.....	44
1.5 Η βιοσύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων και η UGPάση.....	46
1.6 Ο ρόλος της UGPάσης στη ροή των μεταβολιτών.....	50
1.7 Εντοπισμός της δραστηριότητας του ενζύμου.....	51
1.8 Σκοπός της μελέτης.....	51
2. Υλικά & Μέθοδοι.....	53
2.1 Οι διαδικασίες του πειράματος.....	54
2.2 Το φυτικό υλικό.....	54
2.3 Ιστοχημική μελέτη.....	56
2.4 Η εκχύλιση του ενζύμου.....	57
2.5 Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.....	58
2.6 Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της UGPάσης.....	59

2.7 Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών .....	60
2.8 Η ανοσοβιοχημική μελέτη. ....	61
2.9 Ο ανοσοεντοπισμός της UGRάσης. ....	63
2.10 Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς. ....	66
2.11. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real time PCR). .....	71
3. Αποτελέσματα.....	74
3.1 Χαρακτηρισμός cDNA κλώνων που κωδικοποιούν την UGRάση στην τομάτα. .....	75
3.2 Η έκφραση του γονιδίου της UGRάσης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας.....	80
3.3 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων. ....	81
3.4 Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης. ....	82
3.4.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm. ....	82
3.4.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm .....	84
3.4.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού .....	87
3.4.4 Στάδιο αλλαγής χρώματος .....	89
3.4.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού.....	91
3.5 Εντοπισμός της δραστηριότητας της UGRάσης. ....	93
3.6 Ο προσδιορισμός της <i>in vitro</i> δραστηριότητας της UGRάσης.....	94
4. Συζήτηση.....	95
4.1 Ο ανοσοεντοπισμός και η <i>in situ</i> δραστηριότητα του ενζύμου.....	96
4.2 Η UGRάση και ο μεταβολισμός της σακχαρόζης. ....	102
4.3 Η έκφραση των γονιδίων της UGRάσης. ....	105
5. Συμπεράσματα. ....	107
6. Βιβλιογραφία. ....	109

## **1. Εισαγωγή**



## 1.1 Η τομάτα cherry.

### 1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας.

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

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

Ο Muller (1940) διαχώρισε το γένος σε δύο κύρια υπογένη με βάση το χρώμα των καρπών: το *Eulycopersicon* (έγχρωμοι καρποί) και *Etiopersicon* (πράσινοι καρποί). Ο Rick (1976) πρότεινε έναν πιο αναλυτικό και αντικειμενικό διαχωρισμό, ο οποίος κατατάσσει τα είδη σε δύο κύρια συμπλέγματα: το *esculentum*, που περιλαμβάνει ήδη που μπορούν να διασταυρωθούν με την καλλιεργούμενη τομάτα (όπως τα *S. lycopersicum* L., *S. pimpinellifolium* L., *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. neorickii*, *S. chmielewskii*, *S. habrochaites*, *S. pennellii*) και το σύμπλεγμα *peruvianum* με είδη που δεν μπορούν να διασταυρωθούν με το *S. lycopersicum* (*S. chilense*, '*S.N. peruvianum*', L., '*S.N. peruvianum*' var. *humifusum*) (Atherton & Rudich, 1986).

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

Σύμφωνα με τον Quiros (1974) υπάρχει μία φυλογενετική σειρά η οποία οδηγεί με αφετηρία έναν πρόγονο πριν την εμφάνιση του *Solanum*, στο *S. peruvianum*, μετά στο *S. hirsutum*, ακολούθως στο *S. lycopersicon* var. *cerasiforme*

και τελικά στην καλλιεργούμενη τομάτα. Τα *S. pimpinellifolium*, *S. cheesmanii*, *S. penellii*, *S. minutum*, (*S. chmielewskii* και *S. parviflorum*), καθώς και το *S. chilense* είναι αποκλίνοντες τύποι από αυτόν τον κύριο κορμό.

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

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

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

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

*cerasiforme*, με αποτέλεσμα οι δύο αυτοί τύποι να μπορούν να διασταυρωθούν ελεύθερα (Taylor, 1986).

### **1.1.3 Διαιτητική αξία του καρπού της τομάτας τύπου cherry.**

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

Μάλιστα, ο Hobson (1988) αναφέρει ότι εκτός της υψηλότερης περιεκτικότητας σακχάρων (με κυρίαρχα τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη), η γλυκύτητα στη γεύση των cherry αποδίδεται και στην παρουσία της σακχαρόζης όπου απαντάται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες του 0,5% του 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 ώριμης τομάτας τύπου cherry, παρέχουν 22 θερμίδες ενέργειας, 1,1g πρωτεΐνης, 0,2g λίπους, 4,7g υδατανθράκων, 13mg Ca, 27mg P, 0.5mg Fe, 3mg Na, 900 IU βιταμίνης A, 0,06mg βιταμίνης B1, 0,04mg βιταμίνης B2, 0,7mg νιασίνης και 23mg βιταμίνης C (FAO, 1985). Οι καρποί τομάτας τύπου cherry αποτελούν καλή πηγή βιταμινών και αλάτων, με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα (Long, 1998), ενώ χαρακτηρίζονται από σχετικά υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών ουσιών (ιδιαίτερα καροτενοειδών όπως το λυκοπένιο και το β-καροτένιο) που τους προσδίδει υψηλή αντιοξειδωτική ικανότητα (Raffo *et al.*, 2002).

Οι ίδιοι ερευνητές μελέτησαν το περιεχόμενο των καρπών σε βασικά αντιοξειδωτικά (καροτενοειδή, ασκορβικό οξύ, φαινολικά συστατικά) σε διαφορετικά

στάδια ωριμότητας. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν τη σχετικά υψηλή περιεκτικότητα των καρπών τομάτας cherry σε καροτενοειδή, που μάλιστα αυξάνεται με την πρόοδο της ωριμότητας των καρπών, έτσι ώστε στο στάδιο της πλήρους ωριμότητας να παρουσιάζουν το μέγιστο επίπεδο καροτενοειδών, καθώς και αντιοξειδωτικής δραστηριότητας των μη υδατοδιαλυτών αντιοξειδωτικών.

#### **1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry.**

##### **Βλαστός**

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

##### **Φύλλα**

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

##### **Άνθη-ταξιανθίες**

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

### **Σπέρματα**

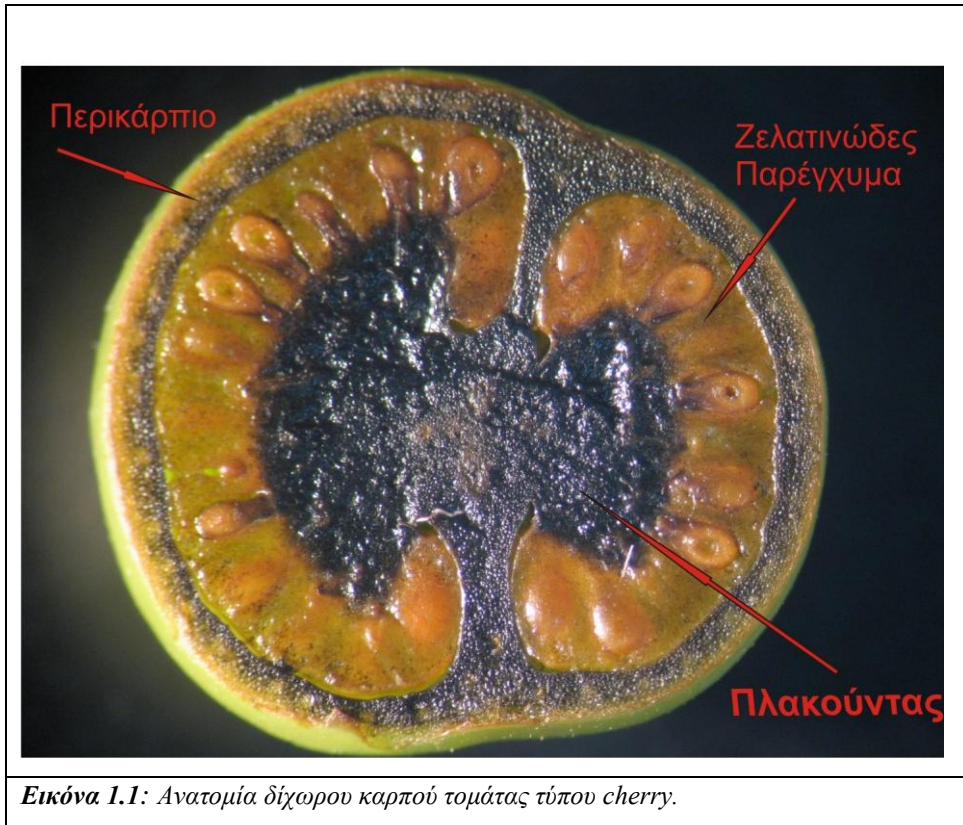
Το βάρος των σπερμάτων δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των ποικιλιών cherry και των μεγαλόκαρων ποικιλιών. Το βάρος 1000 σπόρων της cherry είναι περίπου 2.1g ενώ στις μεγαλόκαρες τομάτες είναι περίπου 2.2g (Xuan, 1999).

### **Καρπός**

Ο καρπός είναι κίτρινος ή κόκκινος, με στρογγυλό ή απιδοειδές σχήμα (Long, 1998). Ο χαρακτηρισμός cherry αναφέρεται στο σχήμα και μέγεθος του καρπού, ο οποίος μοιάζει με τους αντίστοιχους του κερασιού (Allaby, 1998). Οι καρποί είναι δίχωροι και σπάνια τρίχωροι (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.

#### **1.1.5 Μορφολογία και ανατομία του καρπού.**

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



*Εικόνα 1.1: Ανατομία δίχωρου καρπού τομάτας τύπου cherry.*

### **Περικάρπιο**

Το περικάρπιο προέρχεται από τα τοιχώματα της ωοθήκης και αποτελείται από το εξοκάρπιο, από το παρεγχυματικό μεσοκάρπιο με τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και από ένα μονοκύτταρο στρώμα ενδοκαρπίου που επικαλύπτει χώρους που βρίσκονται οι σπερματικές βλάστες. Τα κύτταρα του περικαρπίου υφίστανται ανατομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας σχηματισμού του καρπού. Μία έως δύο μέρες μετά τη γονιμοποίηση, τα μικρά χυμοτόπια μέσα σε κάθε κύτταρο ενώνονται ώστε να σχηματιστεί ένα κεντρικό χυμοτόπιο (Mohr and Stein, 1969). Στις ακόλουθες δύο εβδομάδες το κυτταρόπλασμα μειώνεται σε ένα λεπτό περιφερειακό στρώμα. Συγχρόνως, 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 Sprui, 1969). Στους πράσινους καρπούς τα επιδερμικά κύτταρα τείνουν να έχουν λιγότερο άμυλο σε σχέση με αυτά του εσωτερικού παρεγχύματος (Rosso, 1968). Ο κύριος όγκος της κυτταρικής διαίρεσης στο περικάρπιο πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά την άνθηση (Davies and Cocking, 1965) αν και οι Asahira *et al.* (1968) αναφέρουν πως κυτταρικές διαιρέσεις μπορεί να υπάρξουν και κατά τη δεύτερη εβδομάδα. Ωστόσο, στο *L. pimpinellifolium* κυτταρική διαίρεση παρατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού (Houghtalin, 1935).

### **Το εξωκάρπιο**

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

### **Το ζελατινώδες παρέγχυμα**

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

χώρους. Παρά τον παραπάνω εκφυλισμό, οι πρωτοπλάστες συνήθως παραμένουν άθικτοι.

### **Ο πλακούντας**

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

### **Ηθμαγγειώδεις δεσμίδες**

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

#### **1.1.6 Η ανάπτυξη του καρπού.**

Στις σύγχρονες ποικιλίες τομάτας η ανάπτυξη του καρπού αρχίζει με τη γονιμοποίηση. Το νωπό βάρος της ωοθήκης τότε είναι περίπου 5-10mg ενώ το βάρος του ώριμου προϊόντος μπορεί να κυμαίνεται από 15g στην κερασόμορφη τομάτα (cherry) έως και 450g στις επιτραπέζιες. Η αύξηση του καρπού της τομάτας μπορεί να παρασταθεί από μία σιγμοειδή καμπύλη η οποία διαιρείται σε τρεις περιόδους. Αρχικά, στις πρώτες δύο-τρεις εβδομάδες η ανάπτυξη είναι βραδεία και ο καρπός αποκτά μόλις το 10% του τελικού του βάρους. Στη φάση αυτή η ανάπτυξη της ωοθήκης παύει κατά την άνθηση αλλά ξαναρχίζει μετά τη γονιμοποίηση. Η είσοδος προϊόντων αφομοίωσης από τα φύλλα στην ωοθήκη αυξάνεται ουσιαστικά δύο



ημέρες μετά την επικονίαση (Archbold *et al.*, 1982) και ο ημερήσιος ρυθμός συσσώρευσης ξηράς ουσίας αυξάνεται από 30mg σε 150mg έως το τέλος της πρώτης εβδομάδας (Ho *et al.*, 1983). Ακολουθεί μία περίοδος ταχύτατης ανάπτυξης που διαρκεί τρεις έως πέντε εβδομάδες. Στη φάση αυτή, που φτάνει μέχρι το στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, ο καρπός αποκτά το μεγαλύτερο μέρος του βάρους του. Ο σχηματισμός του καρπού ολοκληρώνεται μετά και τη τρίτη περίοδο που διαρκεί δύο εβδομάδες και που χαρακτηρίζεται από αργή ανάπτυξη. Στη φάση αυτή παρατηρείται μικρή αύξηση του βάρους αλλά και έντονες μεταβολικές διεργασίες στον καρπό.

#### 1.1.6.1 Πρώιμη ανάπτυξη καρπού.

Σύμφωνα με τους Gillaspay *et al.* (1993) η πρώιμη ανάπτυξη του καρπού μπορεί επιπλέον να διαχωριστεί σε τρεις φάσεις.

Η πρώτη φάση περιλαμβάνει την ανάπτυξη της ωοθήκης καθώς και τη διαδικασία της επιλογής της καρπόπτωσης ή συνέχισης των κυτταρικών διαιρέσεων, δηλαδή την καρπόδεση. Στη δεύτερη φάση η ανάπτυξη του καρπού βασίζεται κυρίως σε κυτταρικές διαιρέσεις, ενώ στη τρίτη πραγματοποιείται αύξηση του μεγέθους των κυττάρων έως ότου ο καρπός αποκτήσει το τελικό του μέγεθος (Ho and Hewitt, 1986). Πιο συγκεκριμένα:

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

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

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

αποκτήσει το ώριμο μέγεθος της. Στη φάση αυτή η δραστητικότητα των κυτταρικών διαιρέσεων παραμένει προσωρινά μειωμένη μέχρι να ολοκληρωθεί η γονιμοποίηση.

Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης η εξέλιξη της καρπόδεσης έπεται την επιτυχημένη ολοκλήρωση της επικονίασης και γονιμοποίησης. Η γονιμοποίηση που ακολουθεί την επικονίαση προϋποθέτει τη βλάστηση της γύρης, τη διείσδυση και ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα μέσα στο 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 (Mapelli *et al.*, 1978; Varga and Bruinsma, 1986; Bohner and Bangerth, 1988a). Μετά την ολοκλήρωση της φάσης των κυτταρικών διαιρέσεων και για τις επόμενες έξι έως επτά εβδομάδες παρατηρείται μεγέθυνση των κυττάρων και συνεπώς του καρπού. Πριν την μεγέθυνση τους τα διαιρούμενα κύτταρα του καρπού είναι μικρά σε μέγεθος, σφικτά συμπιεσμένα και πλούσια σε κυτταροπλασματικές ουσίες, ενώ διαθέτουν και μικρά χυμοτόπια. Καθώς 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 (Coomble, 1976). Στον καρπό της τομάτας, ο όγκος των κυττάρων στον πλακούντα, στο ζελατινώδες παρέγχυμα και στο εσωτερικό περικάρπιο μπορεί να δεκαπλασιαστεί, αλλά τα κύτταρα που αποτελούν το εξωτερικό περικάρπιο επειδή συνεχίζουν να διαιρούνται αυξάνονται λιγότερο.

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

#### 1.1.6.2 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 C<sub>3</sub> φυτού. Επίσης, στους χλωροπλάστες του ανώριμου καρπού μπορούν να διακριθούν και αμυλόκοκκοι αλλά μειώνονται όσο η ανάπτυξη πλησιάζει τον πράσινο ώριμο καρπό. Οι χλωροπλάστες επίσης περιέχουν τις χρωστικές του καρπού, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Οι επικρατέστερες χρωστικές στους πράσινους καρπούς αποτελούνται από ένα μίγμα χλωροφύλλης α

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

#### 1.1.6.3 Ωρίμανση του καρπού

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

Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης πραγματοποιούνται πολλές αλλαγές και σε υποκυτταρικό επίπεδο. Καταρχάς παρατηρούνται αλλαγές στα κυτταρικά τοιχώματα και ειδικά στην περιοχή του μεσοτοιχείου, 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 Spruit, 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, 1942; 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 και συνεπώς την καρπόδεση. Έχει αποδειχθεί ότι η παρθενοκαρπία αποτελεί ένα ενδιαφέρον χαρακτηριστικό για την αποφυγή χαμηλής καρπόδεσης σε ακραίες συνθήκες. Στην περίπτωση της προαιρετικής παρθενοκαρπίας, η ανάπτυξη του παρθενοκαρπικού καρπού υφίσταται ακόμη και σε συνθήκες που δεν επιτρέπουν την επικονίαση. Στην τομάτα, η αποτυχία της καρπόδεσης αποτελεί συνηθισμένο φαινόμενο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες

τόσο στον αγρό όσο και στο θερμοκήπιο (Howlett, 1939; Rick, 1978). Τέτοιες συνθήκες αποτελούν η χαμηλή ή υψηλή υγρασία, η χαμηλή ένταση φωτισμού, η χαμηλή ή υψηλή θερμοκρασία και οι υψηλής εντάσεως άνεμοι (George *et al.*, 1984).

Βέβαια, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η παρθενοκαρπία έχει μεγάλη σημασία για τις καλλιέργειες στις οποίες οι άσπερμοι καρποί παρουσιάζουν μεγάλη ζήτηση από το καταναλωτικό κοινό, όπως οι μπανάνες, εσπεριδοειδή κ.α. (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 γήρανση του. Παρά τα πλεονεκτήματα που μπορεί να παρουσιάζει ένας άσπερμος καρπός η χρήση του φαινομένου της παρθενοκαρπίας στη γεωργία είναι περιορισμένη. Άλλωστε, μεταλλάξεις που δημιουργούν παρθενοκαρπικούς καρπούς συχνά παρουσιάζουν πλειοτροπικές δράσεις αλλά και συνδέονται με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά όπως αρσενική και θηλυκή στειρότητα ή μικρότερους και κακοσχηματισμένους καρπούς (Vagoquaux *et al.*, 2000).

### **1.2.1 Οι τρεις κύριες πηγές παρθενοκαρπίας στην τομάτα.**

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

### **1.2.2 Μηχανισμός της παρθενοκαρπίας.**

Διάφοροι ερευνητές αναφέρουν ότι οι γιββερελλίνες προάγουν την ανάπτυξη άσπερμων καρπών (Bunger-Kibler and Bangerth, 1983; Sjut and Bangerth, 1982; Alabadi *et al.*, 1996; Fos *et al.*, 2000). Επίσης, για τη σειρά RP75/59 προτάθηκε ότι τα *pat-3/pat-4* είναι υπεύθυνα για την αύξηση της συγκέντρωσης του GA<sub>1</sub> και του GA<sub>3</sub> στις ωοθήκες πριν την επικονίαση (Fos *et al.*, 2001). Πρόσφατα, η ανάλυση της

έκφρασης των γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα κλειδιά που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των γιββερελλινών έδειξε μια υψηλή και συνεχή έκφραση του GA<sub>20-ox1</sub> στις ωοθήκες των *pat-1* μεταλλάξεων, όταν στις ωοθήκες του άγριου τύπου η έκφραση του γονιδίου αυτού αυξάνεται μόνο μετά την επικονίαση ή τη γονιμοποίηση (Olimpieri *et al.*, 2007). Επιπρόσθετα, οι ερευνητές μελέτησαν την επίδραση της διαφορικής έκφραση του γονιδίου στη συσσώρευση των GAs: πριν την άνθηση η σύνθεση των γιββερελλινών διακόπηκε ανάμεσα στην GA<sub>19</sub> και GA<sub>20</sub> στις ωοθήκες άγριου τύπου. Αντίθετα, στις ωοθήκες *pat-1*, τα GA<sub>20</sub> και το ενεργό GA<sub>1</sub> βρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις (Olimpieri *et al.*, 2007). Το μονοπάτι βιοσύνθεσης του GA φαίνεται να αποτελεί το κλειδί για την έναρξη σχηματισμού του άσπερμου καρπού και στα τρία μεταλλάγματα (*pat-1*, *pat-2* *pat-3/pat-4*).

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

Εκτός των γιββερελλινών και η αυξίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παρθενοκαρπικών καρπών. Γενικά η αυξίνη συντηρεί το επίπεδο της GA<sub>3</sub> οξειδάσης και συνεπώς της βιοσύνθεσης GA<sub>1</sub> (Ross *et al.*, 2000). Παρόλα αυτά οι ακριβείς αλληλεπιδράσεις μεταξύ γιββερελλινών και αυξίνης ποικίλουν ανάλογα με το όργανο του φυτού (Ross and O'Neil, 2001).

Πρόσφατα, ο ρόλος της αυξίνης στην παρθενοκαρπία αναβαθμίστηκε με την εισαγωγή του γονιδίου *ARF8* στο *Arabidopsis* και του *IAA9* στην τομάτα. Στο

μετάλλαγμα *fwf* του *Arabidopsis*, ο παράγοντας απόκρισης στην αυξίνη 8 (ARF8) είχε ως αποτέλεσμα το διαχωρισμό της ανάπτυξης του καρπού από επικονίαση και γονιμοποίηση και οδήγησε στο σχηματισμό παρθενοκαρπικού καρπού (Goetz *et al.*, 2006). Όταν το ARF8 είναι λειτουργικό, τότε εμφανίζεται ως αναστολέας καθώς σταματά την περαιτέρω ανάπτυξη της ωοθήκης όταν δεν υπάρχει γονιμοποίηση. Μάλιστα, προτείνεται πως το ARF8 προσδένεται στις πρωτεΐνες Aux/IAA ώστε να σχηματισθεί πρωτεϊνικό σύμπλοκο το οποίο προσδένεται στους προαγωγείς ενός εύρους γονιδίων που αποκρίνονται στην αυξίνη τα οποία διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην έναρξη του σχηματισμού των καρπών και την ανάπτυξή τους.

Οι Groot *et al.* (1987) έδειξαν ότι όταν ο καρπός αναπτύσσεται κανονικά, το τελικό του μέγεθος σχετίζεται θετικά με τον αριθμό των σπερμάτων του. Κάτι αντίστοιχο φαίνεται να συμβαίνει και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Οι άσπερμοι καρποί της *Severianin* περιέχουν ψευδοέμβρυα, δομές που μοιάζουν με τους σπόρους που απαντούν σε παρθενοκαρπικούς καρπούς που επάγονται με τη χρήση αυξινών (Lin *et al.*, 1983). Τα ψευδοέμβρυα αυτά σχηματίζονται από την εσωτερική στοιβάδα των χιτώνων των σπερματικών βλαστών (Asahira *et al.*, 1967). Οι Kataoka *et al.* (2003) αναφέρουν πως η ανάπτυξη του ψευδοέμβριου σχετίζεται στενά με την καρπόδεση και την ανάπτυξη. Γι' αυτό το λόγο τα ψευδοέμβρυα μπορούν να λειτουργήσουν ως υποκατάστατα σπερμάτων σε ότι αφορά τον έλεγχο της ανάπτυξης του καρπού. Στην *Severianin* η ανάπτυξη των ψευδοέμβριων συσχετίζεται με την ανάπτυξη του καρπού και βρίσκεται υπο τον έλεγχο του GA<sub>3</sub> και/ή του ουνικοναζολίου (uniconazole), ενός παρεμποδιστή της βιοσύνθεσης γιββερελλινών (Kataoka *et al.*, 2003).

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

Στο στάδιο της κυτταρικής επιμήκυνσης του παρθενοκαρπικού καρπού, βρέθηκε ότι η αυξίνη συντίθεται κατά κύριο λόγο μέσα στα επιμηκυνόμενα κύτταρα (Kojima *et al.*, 2003). Στο τέλος του σταδίου της επιμήκυνσης, ο αποπλάστης του περικαρπίου αναφέρεται ότι συμμετέχει επίσης και στη σύνθεση της αυξίνης. Οι



ερευνητές βρήκαν μικρότερη συγκέντρωση αυξίνης στα εντός του εσωτερικού των χώρων της ωοθήκης, παρά στο περικάρπιο. Στους επικονιασμένους καρπούς, η αυξίνη πιθανόν συντίθεται στα αναπτυσσόμενα σπέρματα διότι σε αυτά οι συγκεντρώσεις της αυξίνης είναι υψηλότερη (Kojima *et al.*, 2003).

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

### 1.2.3 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα.

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

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

Οι Ho and Hewitt (1986) αναφέρουν μια ποικιλία από χημικές ουσίες που προάγουν την καρπόδεση σε παρθενοκαρπικούς καρπούς. Το 2-ναφθυλοξικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε συγκεντρώσεις 40-60ppm. Επίσης, εφαρμογή βρίσκει το 2-(3-χλωροφαινόξυ) προπιονικό οξύ στα 25-40ppm μόνο για καλλιέργεια θερμοκηπίου και το N-m-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.

#### **1.2.4 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία.**

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

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

#### **1.2.5 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας.**

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

κατηγοριοποίησαν τους παραμορφωμένους παρθενοκαρπικούς καρπούς σε πέντε κατηγορίες.

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

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

### 1.3 Η πυροφωσφορυλάση της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UGPάση).

Η πυροφωσφορυλάση της ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UGPάση) (EC 2.7.7.9) ανήκει στην οικογένεια των γλυκοζυλοτρανσφερασών (PF01702) (Sonnhammer *et al.*, 1997) και εμπλέκεται στην παραγωγή ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UDP-γλυκόζη). Η UDP-γλυκόζη είναι η ενεργοποιημένη μορφή γλυκόζης που υπάρχει σε όλους τους οργανισμούς και θεωρείται ένα πρόδρομο μόριο κλειδί για τη σύνθεση πολυσακχαριδίων. Εμπλέκεται στις αντιδράσεις μεταφοράς γλυκόζης καθώς και ως πρόδρομο μόριο για την παραγωγή πολλών ενεργοποιημένων μορφών σακχάρων.

Η UGPάση απαντάται σε όλους τους προκαρυωτικούς και ευκαρυωτικούς οργανισμούς, παρουσιάζει σημαντική δραστικότητα στο μεταβολισμό των υδατανθράκων και καταλύει την αμφίδρομη αντίδραση παραγωγής UDP-γλυκόζης και πυροφωσφορικών (PPi) από 1-φωσφορογλυκόζη (Glc-1-P) και ουριδινοτριφωσφορικό οξύ (UTP). Η αντίδραση της UGPάσης, είναι συντηρημένη στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και συνήθως γίνεται με την παρουσία ιόντος ( $Mg^{2+}$ ) (Turnquist and Hansen, 1974):



Η παραπάνω αντίδραση εξαρτάται από την μεταβολική κατάσταση των ιστών. Σε φωτοσυνθετικούς ιστούς (νέα και ώριμα φύλλα), η UGPάση δρα σε συνεργασία με τη συνθάση της φωσφορικής σακχαρόζης (SPS), αφομοιώνει 1-φωσφορογλυκόζη σε UDP-γλυκόζη και εμπλέκεται κυρίως στη σύνθεση σακχαρόζης που είναι το κύριο φωτοσυνθετικό προϊόν. Η σακχαρόζη είτε αποθηκεύεται στο χυμοτόπιο είτε διακινείται προς τους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς όπου υδρολύεται και χρησιμοποιείται ως πηγή ενέργειας κατά τη διάρκεια της αναπνοής ή ως πηγή άνθρακα για τη βιοσύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων ή προϊόντων του ενδιάμεσου μεταβολισμού (Witt, 1992; Kleczkowski, 1994; Amor *et al.*, 1995; Johansson *et al.*, 2002, Flores-Diaz *et al.*, 1997; Bishop *et al.*, 2002). Επίσης, οι Okazaki *et al.* (2009)

κατέδειξαν τη συνεισφορά του ενζύμου στη σύνθεση θειολιπιδίων στους χλωροπλάστες.

Σε μη φωτοσυνθετικούς ιστούς, συμπεριλαμβανομένων των φυλλικών καταβολών, που εξαρτώνται από τα εισαγόμενα αποθέματα άνθρακα, η UGPάση συνδέεται με τα μονοπάτια αποδόμησης της σακχαρόζης μέσω μετατροπής της UDP-γλυκόζης που παράγεται από τη συνθάση της σακχαρόζης (SuSy) (ap Rees, 1992; Winter and Huber, 2000), σε 1-φωσφορογλυκόζη για τη χρήση της σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες (Winter and Huber, 2000). Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η δεξαμενή UDP-γλυκόζης στα ώριμα φύλλα προέρχεται από την 1-φωσφορογλυκόζη μέσω της αντίδρασης της UGPάσης ενώ στους ιστούς κατανάλωσης, η μεγαλύτερη παραγωγή UDP-γλυκόζης προέρχεται από τη συνθάση της σακχαρόζης (SuSy) (Zrenner *et al.*, 1995; Tang and Sturm, 1999). Οι UGPάση και SuSy καταλύουν αντιστρεπτές αντιδράσεις και κατά αυτό τον τρόπο μπορούν να εμπλέκονται στη σύνθεση και αποδόμηση της σακχαρόζης πράγμα που εξαρτάται από τη μεταβολική κατάσταση του κυττάρου. Σε αναπτυσσόμενα σπέρματα δημητριακών, η UGPάση μπορεί επίσης να συνδεθεί με την κυτοπλασματική AGPάση και να μετατρέψει άμεσα την UDP-γλυκόζη σε ADP-γλυκόζη που χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση αμύλου (Kleczkowski, 1994). Επίσης, έχει αναφερθεί ότι κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (Echeverria *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 1980) η UDP-γλυκόζη είναι δυνατόν να συμμετέχει άμεσα στη βιοσύνθεση του αμύλου. Αυτό επιβεβαιώνει την στενή σχέση των αντιδράσεων μεταβολισμού της σακχαρόζης και σύνθεσης αμύλου στα αναπτυσσόμενα σπέρματα.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, η UDP-γλυκόζη το προϊόν του ενζύμου, χρησιμοποιείται στη σύνθεση αποθησαυριστικών πολυσακχαριδίων όπως είναι γλυκογόνο στα ζώα (Alonso *et al.*, 1995), τμήματα γλυκανών στα γλυκολιπίδια και στις γλυκοπρωτεΐνες, δισακχαριδίων τρεχαλόζης (στις ζύμες), σακχαρόζης που είναι η κύρια ουσία μεταφοράς των υδατανθράκων στα φυτά (Feingold and Barber, 1990; Mikami *et al.*, 2001; Bishop *et al.*, 2002; Yagi *et al.*, 2003) και δομικών πολυσακχαριδίων όπως κυτταρίνη (Gibeaut, 2000). Πιο συγκεκριμένα, η UDP-γλυκόζη είναι απ' ευθείας πρόδρομο μόριο στη σύνθεση της κυτταρίνης και καλλόζης που γίνεται στο πλασμάλλημα και συνεισφέρει κατά τον τρόπο αυτό έμμεσα στο σχηματισμό όλων των άλλων πολυσακχαριτών των κυτταρικών τοιχωμάτων (Schlupmann *et al.*, 1994; Amor *et al.*, 1995; Gibeaut, 2000; Johansson *et al.*, 2002; Seifert, 2004). Η UDP-γλυκόζη είναι επίσης το πρόδρομο μόριο του UDP-

γλυκουρονικού οξέος (Aw and Jones, 1982, 1984) και της UDP-γαλακτόζης που είναι δότες γλυκοσυλίων και συνεισφέρουν σε διάφορες διαδικασίες όπως η σύνθεση των πρωτεογλυκανών (Silbert and Sugumaran, 1995). Στην αντίθετη κατεύθυνση, οι αντιδράσεις που καταλύονται από την τρανσφεράση της ουριδιλυλο-1-φωσφορογαλακτόζης (GALT) και την επιμεράση της UDP-γαλακτόζης απαιτούνται για την χρήση της γαλακτόζης (Frey, 1996). Ατέλειες στα ένζυμα αυτού του μονοπατιού έχουν ως αποτέλεσμα τη γαλακτοζαιμία, μια σοβαρή ασθένεια που προκαλείται από τη δυσλειτουργία μεταβολισμού της γαλακτόζης. Το πιθανόν γενετικά απομακρυσμένο συγγενές βακτηριακό ομόλογο της UGPάση, το GalU λαμβάνει μέρος στη σύνθεση πολυσακχαριδίων του κυτταρικού τοιχώματος του βακτηρίου που θεωρείται σημαντικό για τη μολυσματικότητα ορισμένων παθογόνων βακτηρίων (Chang *et al.*, 1996; Dean and Goldberg, 2002).

Η σειρά πρόσδεσης των υποστρωμάτων της αντίδρασης είναι καθορισμένη. Πρώτα προσδένεται στο ένζυμο το UTP, κατόπιν η 1-φωσφορο-γλυκόζη και στην αντίστροφη αντίδραση, η UDP-γλυκόζη προσδένεται νωρίτερα σε σχέση με τα ανόργανα φωσφορικά (Tsuboi *et al.*, 1969; Lamerz *et al.*, 2006). Η κατεύθυνση της αντίδρασης φαίνεται ότι ποικίλει ανάλογα με την ιστοειδίκευση, προς παραγωγή UDP-γλυκόζης σε νεαρά και ώριμα φύλλα και στην αντίθετη κατεύθυνση στις φυλλικές καταβολές (Kleczkowski *et al.*, 2004).

Η σακχαρόζη είναι η κυριότερη μορφή μεταφοράς σκελετών άνθρακα στα φυτά καθώς επίσης είναι η κύρια πηγή ενέργειας και σκελετών άνθρακα όλων των βιομορίων. Προσφέρει επίσης τις πρώτες ύλες από τις οποίες τα φυτά βιοσυνθέτουν τα κυτταρικά τους τοιχώματα. Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι οποιαδήποτε ρύθμιση της βιοσύνθεσης των σακχάρων, ειδικότερα της σακχαρόζης είναι πρωτεύοντος ενδιαφέροντος στη κατανόηση των στρατηγικών αύξησης και ανάπτυξης ενός φυτού. Επίσης, τα σάκχαρα θεωρούνται ισχυροί ρυθμιστές της έκφρασης των γονιδίων μέσω π.χ της εξοζοκινάσης (HXK), ενός μηχανισμού μετατροπής που αναγνωρίζει εξόζες, μέσω εξειδικευμένων σημάτων που εμπλέκουν τη σακχαρόζη ή οσμωτικών μονοπατιών μετατροπής που μας υπογραμμίζουν την περαιτέρω σημασία των σακχάρων στην ομοιοστάση των φυτών (Kleczkowski *et al.*, 2004).

Παρόλη τη σημαντική θέση της UGPάσης στο σταυροδρόμι σύνθεσης ή και διάσπασης της σακχαρόζης, δεν έχει λάβει την απαραίτητη προσοχή σε σχέση με άλλα ένζυμα του μεταβολισμού της σακχαρόζης. Ένας από τους λόγους είναι ότι

αυτό το ένζυμο έχει μεγάλη δραστικότητα (σε σχέση με άλλα) στο μονοπάτι της σακχαρόζης και οπότε πιθανώς να μην παίζει ρυθμιστικό ρόλο στη ροή άνθρακα από και προς την σακχαρόζη. Επιπλέον, μελέτη της UGPάσης της πατάτας με τη χρήση αντινοσηματικού RNA έδειξε ότι μια μείωση κατά 96% της δραστικότητας της UGPάσης στους κόνδυλους δεν επέφερε καμία αλλαγή στα επίπεδα των σακχάρων (Zrenner *et al.*, 1993). Όμως, υπάρχουν πολλές ενδείξεις που δείχνουν το ρυθμιστικό ρόλο της UGPάσης σε επίπεδο γονιδίων και πρωτεϊνών και έχουν δημιουργηθεί ερωτήματα εάν κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες το ένζυμο καθορίζει την ταχύτητα των αντιδράσεων.

### 1.3.1 Δομή του ενζύμου.

Οι ευκαρυωτικές UGPάσες έχουν περίπου 500 κατάλοιπα αμινοξέων και είναι πρωτεΐνες άφθονες στο κυτόπλασμα. Οι ευκαρυωτικές ακολουθίες είναι υψηλά συντηρημένες π.χ η UGPάση του ανθρώπου και του *Saccharomyces cerevisiae* είναι κατά 55% ταυτόσημες πράγμα που πιθανόν να σημαίνει και υψηλή ομοιότητα σε δομικό επίπεδο (Daran *et al.*, 1995; Peng and Chang, 1993). Ισότυποι με υψηλή ομολογία υπάρχουν σε πολλά είδη (Bishop *et al.*, 2002, Duggleby *et al.*, 1996, Kleczkowski *et al.*, 2004).

Για τα φυτικά ομόλογα της UGPάσης έχει προταθεί η ύπαρξη μονομερών και διμερών μορφών που μπορεί να συνυπάρχουν (Kleczkowski *et al.*, 2005; Martz *et al.*, 2002) σε αντίθεση με τα ζώα που φαίνεται πως σχηματίζουν οκταμερή σύμπλοκα (Turnquist and Hansen, 1974). Επίσης, έχει προταθεί ότι η δομή της UGPάσης του πρωτόζωου παράσιτου *Leishmania major* είναι και μονομερής (Lamerz *et al.*, 2006).

#### 1.3.1.1 Δομή της UGPάσης στο *Saccharomyces cerevisiae*.

Οι Roeben *et al.* (2006) μελέτησαν την Ugp1p, δηλ. τη δομή της UGPάσης στη ζύμη. Η Ugp1p στο *S. cerevisiae* θεωρείται απαραίτητη στη βιωσιμότητά της (Daran *et al.*, 1995). Η Ugp1p σχηματίζει ομοοκταμερή που αποτελούν την ενεργή μορφή του ενζύμου τόσο σε διαλύματα όσο και σε κρυσταλλική μορφή. Οι υπομονάδες της Ugp1p αποτελούνται από τρεις περιοχές με το ενεργό κέντρο να

εδράζεται στην κεντρική SpsA GnT I (SGC) περιοχή. Η σύνδεση στο οκταμερές υποβοηθάται μέσω επικοινωνίας μεταξύ των αριστερόστροφων β-ελίκων στις C-τελικές περιοχές που σχηματίζει μια δακτυλιοειδή σωληνοειδή δομή στον πυρήνα του συμπλόκου. Οι καταλυτικές περιοχές που συνδέονται με το πλαίσιο στήριξης του πυρήνα δεν επικοινωνούν άμεσα μεταξύ τους, πράγμα που συμφωνεί με απλές κινητικές Michaelis-Menten που βρέθηκαν για την Ugp1p. Η ύπαρξη συντηρημένων υδρόφοβων καταλοίπων στις επιφάνειες των υπομονάδων προτείνουν ότι όλα τα ομόλογα των μυκήτων και των ζώων σχηματίζουν αυτή την τεταρτοταγή δομή σε αντίθεση με την μονομερή δομή των φυτικών UGPασών, που έχουν θετικά φορτισμένα κατάλοιπα σε αυτές τις περιοχές (Roeben *et al.*, 2006).

Δομικά, η ευκαρυωτική UGPάση και πιθανόν το προκαρυωτικό της ομόλογο, GalU ανήκουν στην υπεροικογένεια των πρωτεϊνών που όπως αναφέρθηκε παραπάνω περιέχεται μια SpsA GnT I (SGC) περιοχή, που αποτελούν πολλές γλυκοζυλοτρανσφεράσες και πυροφωσφορυλάσες και περαιτέρω μοιράζονται ένα χαρακτηριστικό συντηρημένο μοτίβο, το (LxxGxGTxxxxxxPK) (Unligil and Rini, 2000; Wang-Gillam *et al.*, 2000; Mio *et al.*, 1998).

#### 1.3.1.2 Δομή των υπομονάδων της Ugp1p.

Οι Roeben *et al.* (2006) έδειξαν ότι η Ugp1p είναι μια πρωτεΐνη που αποτελείται από τρεις περιοχές. Αυτές οι περιοχές είναι διευθετημένες με γραμμικό τρόπο έτσι ώστε οι N και C-τελικές περιοχές να βρίσκονται στα άκρα και να μην συνδέονται άμεσα. Όλες οι περιοχές αποτελούνται από ένα μείγμα σύνθεσης α ή και β δευτερογενούς δομής. Η συγκριτικά μικρότερη N-περιοχή που κατά μεγάλο ποσοστό σε κρυσταλλική δομή δεν παρουσιάζει ιδιαίτερη οργάνωση, αποτελείται από ένα κολεό, από δύο ελικοειδείς περιοχές στο N-τελικό άκρο (κατάλοιπα 20-69) και δύο μεγάλους σε μέγεθος βρόγχους (κατάλοιπα 187-215 και 339-363) που προεξέχουν από τον κεντρικό τομέα και σχηματίζουν δομές β-hairpin. Ο κεντρικός τομέας ανήκει στην οικογένεια του SGC τομέα και αποτελείται από κεντρικό τμήμα οκτώ β-πτυχωτών επιφανειών που γειτονεύουν με α-έλικες. Εκτός των προαναφερθέντων προεκτάσεων των βρόγχων στις UGPάσες των ευκαρυωτικών οργανισμών, ο πυρήνας της περιοχής γειτονεύει με μια ακόμα δομή β-hairpin που σχηματίζεται από την έβδομη και την όγδοη β-πτυχωτή επιφάνεια. Η C-τελική



περιοχή αρχίζει στο κατάλοιπο 389 και ξεκινά με α-έλικα που ακολουθείται από μια μικρή δομή β-hairpin και οδηγεί σε αριστερόστροφη β-ελικοειδή δομή. Σε αυτό το δομικό στοιχείο, οι β-κλώνοι είναι γύρω από έναν τριγωνικό πυρήνα από παρεμβalόμενες υδρόφοβες πλευρικές αλυσίδες με τους δεσμούς υδρογόνου να ευθυγραμμίζονται κατά μήκος του ελικοειδή άξονα.

#### 1.3.1.3 Κατάσταση ολιγομερίωσης της Ugp1p.

Οι Roeben *et al.* (2006) έδειξαν ότι η ενδογενής Ugp1p στο *S. cerevisiae* απαντάται ως οκταμερές. Δεν παρατηρήθηκε αποδιοργάνωσή της σε μικρότερες μονάδες στις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις του πειράματος. Γι' αυτό φαίνεται απίθανο να λειτουργούν μηχανισμοί ρύθμισης της δραστηριότητας της UGPάσης της ζύμης για την οργάνωση και την αποδιοργάνωση του συμπλόκου. Αντίθετα, στην ομόλογη πρωτεΐνη του ανθρώπου UAP όπου οι C-τελικές περιοχές δεσμεύουν το ενεργό κέντρο των αντιτασσόμενων υπομονάδων στην διμερή κατάσταση, στη δομή της UGPάσης της ζύμης, οι καταλυτικοί τομείς της Ugp1p δεν συμμετέχουν στην ολιγομερίωση και γι' αυτό δεν αναμένεται καμιά σημαντική παρεμπόδιση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά τη διάρκεια της οργάνωσης της πρωτεΐνης. Όμως, η UGPάση του κριθαριού σχηματίζει διμερή και υψηλά ολιγομερή με μόνο τα μονομερή είναι δραστικά (Martz *et al.*, 2002). Οπότε στις φυτικές UGPάσες θα πρέπει να υπάρχει άλλος τρόπος οργάνωσης.

Στο οκταμερές σύμπλοκο της ζύμης, οι περιφερειακοί N-τελικοί τομείς φαίνεται να λειτουργούν ως ρυθμιστικές μονάδες της ενζυμικής δραστηριότητας (Roeben *et al.*, 2006). Παρόλα αυτά οι λεπτομέρειες της ρύθμισης δεν έχουν βρεθεί. Τέλος, είναι πιθανόν το N-τελικό άκρο της Ugp1p το οποίο είναι εκτεθειμένο στο οκταμερές σύμπλοκο του ενζύμου να παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητάς της.

#### 1.3.1.4 Η UDP-N-ακετυλογλυκοζαμίνη (AGX1) ως πρότυπο των UGPασών.

Μια μεγάλη πρόοδος στις μελέτες των πυροφωσφορολασών ήταν η κρυστάλλωση της ανθρώπινης AGX1 (Peneff *et al.*, 2001). Αυτή η πρωτεΐνη

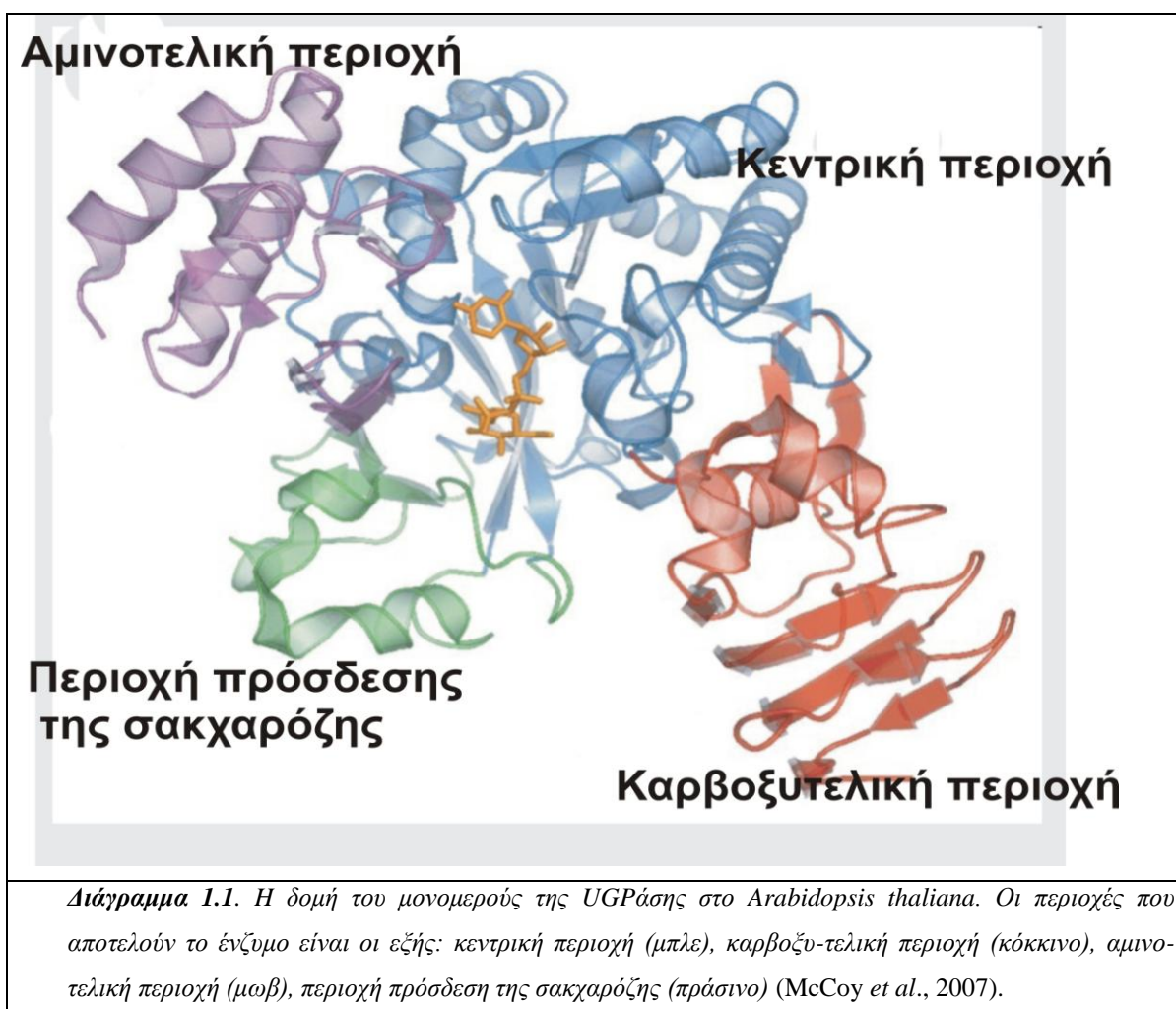
σχετίζεται λειτουργικά και έχει περίπου 40% ομοιότητα στη πρωτεϊνική της ακολουθία με τις UGRάσες. Σε παλιότερες έρευνες η δομή της AGX1 χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπο για την UGRάση του κριθαριού.

Η γενικά θεωρούμενη τρισδιάστατη δομή του μονομερούς της UGRάσης έχει μορφή μπολ (bowl-like) με το ενεργό κέντρο να βρίσκεται σε ένα κεντρικό αυλάκι. Αυτό το σχήμα είναι κοινό για την AGX και την UGRάση και ίσως για όλες τις πρωτεΐνες τύπου πυροφωσφορυλασών (Peneff *et al.*, 2001). Το ενεργό κέντρο της UGRάση περιέχει αρκετά αμινοξικά κατάλοιπα που είναι σημαντικά για την πρόσδεση του υποστρώματος και την κατάλυση του ενζύμου. Η Trp-191, η Trp-302, και η Lys-260 (βασισμένα σε αμινοξική ακολουθία της UGRάσης του κριθαριού) έχουν προταθεί ότι εμπλέκονται στη πρόσδεση της UDP-γλυκόζης στην UGRάση (Kazuta *et al.*, 1991; Chang *et al.*, 1996). Στη δομή της UGRάσης του κριθαριού το θετικό φορτίο της Lys-260 μπορεί να σταθεροποιήσει τα αρνητικά φορτία δύο φωσφορικών της UDP-γλυκόζης. Οι Gly-91 και Cys-99 βρίσκονται ανάμεσα σε αυτό που οι Peneff *et al.* (2001) αναφέρουν ως δακτύλιο NB, έναν τομέα κοινό για τις πυροφωσφορυλάσες. Η Cys-99 του κριθαριού βρίσκεται στο μέσο αυτής του δακτυλίου και πάνω από τα δύο φωσφορικά της UDP-γλυκόζης μια ιδανική δηλαδή θέση για πρόσδεση και σταθεροποίηση της γέφυρας των πυροφωσφορυλασών. Αντίθετα η Gly-91 βρίσκεται στο άκρο του δακτυλίου NB και αντιδρά με το κατάλοιπο της UDP-γλυκόζης.

#### 1.3.1.5 Δομή της UGRάσης στο *Arabidopsis thaliana*.

Οι McCoy *et al.* (2007) παρουσίασαν τρεις κρυσταλλικές δομές της UGRάσης που κωδικοποιούνται από το γονίδιο At3g03250 στο *Arabidopsis thaliana*. Η πρώτη δομή αναφέρεται στο ένζυμο και οι άλλες δύο παρουσιάζουν το ένζυμο προσδεμένο με τη UDP-γλυκόζη ή το UTP αντίστοιχα. Οι τρεις δομές αποκάλυψαν μια καταλυτική περιοχή παρόμοια με αυτή άλλων νουκλεοτιδυλογλυκοζυλο-πυροφωσφορυλασών με μια καρβοξυ-τελική περιοχή β-έλικας με μοναδικό προσανατολισμό. Παρατηρήθηκαν αλλαγές της διαμόρφωσης του πρωτεϊνικού μορίου μεταξύ του ενζύμου και του συμπλόκου δέσμευσης του υποστρώματος. Ο νουκλεοτιδικός δακτύλιος πρόσδεσης και η καρβοξυ-τελική περιοχή που

περιλαμβάνουν το καταλυτικά σημαντικό κατάλοιπο Lys360 κινούνται εντός και εκτός του ενεργού κέντρου με συντονισμένο τρόπο.



Η UGPάση σχηματίζει τέσσερις δομικές περιοχές που αποτελούνται από 469 κατάλοιπα. Η μεγαλύτερη περιοχή περιλαμβάνει τα κατάλοιπα 56- 160, 193- 249, 291- 317 και 334-359. Αυτή η κεντρική περιοχή αποτελείται από μια β-πτυχωτή επιφάνεια οκτώ κλώνων που σχηματίζει τον πυρήνα του ενζύμου. Η β-πτυχωτή επιφάνεια περιβάλλεται από έλικες και από τις δύο πλευρές και επεκτείνεται σε μια μικρή β-πτυχωτή επιφάνεια δύο κλώνων. Επίσης υπάρχουν τρεις μικρότερες περιοχές που προεξέχουν του κεντρικού και σχηματίζουν μια θετικά φορτισμένη κοιλότητα ενεργού κέντρου. Η μεγαλύτερη περιοχή από αυτές είναι η καρβοξυ-τελική περιοχή που περιέχει τα κατάλοιπα 360- 469. Αυτή η περιοχή αποτελείται κυρίως από μια β-έλικα που σχηματίζεται από δύο παράλληλες πτυχωτές επιφάνειες, λίγες έλικες και μια β-πτυχωτή επιφάνεια δύο κλώνων. Η αμινο-τελική περιοχή αποτελείται από τα

κατάλοιπα 6–40, 161–192, και 318–333 και η περιοχή όπου προσδέεται η σακχαρόζη αποτελείται από τα κατάλοιπα 41–55 και 250–290 που έχουν κυρίως δομή έλικας αλλά αποτελούνται και από δύο β-κλώνους και σχηματίζουν μια β-πτυχωτή επιφάνεια τεσσάρων αντιπαράλληλων κλώνων. Το ενεργό κέντρο βρίσκεται στη επιφάνεια των τεσσάρων περιοχών σε κοιότητα με ευδιάκριτη δυνατότητα θετικής ηλεκτροστατικής επιφάνειας (McCoy *et al.*, 2007).

#### 1.3.1.6 Κατάσταση ολιγομερίωσης της UGPάσης στο *Arabidopsis thaliana*.

Η κρυσταλλική δομή κατέδειξε την παρουσία διμερούς μορφής του ενζύμου παρά τις ενδείξεις που πρότειναν την ύπαρξη μόνο μονομερών. Ο προσανατολισμός των μονομερών στο διμερές είναι τέτοιος ώστε η αμινο- τελική περιοχή κάθε μονομερούς να σφηνώνεται στο ενεργό κέντρο του άλλου μονομερούς. Τα κατάλοιπα των αμινοξέων που συμμετέχουν σε αυτή την αλληλεπίδραση είναι τα 170–182, 256, 320–328, 395–402 και 446 και των δύο αλυσίδων όπως επίσης και τα κατάλοιπα 5 και 6 της A αλυσίδας και τα κατάλοιπα 91, 92, 280–284 και 423–426 της B αλυσίδας. Αναλύσεις των αποστάσεων μεταξύ των πολικών ατόμων προτείνουν ότι οι υδρόφοβοι δεσμοί δημιουργούνται μεταξύ των καταλοίπων Lys 401 και Asp325 των δύο αλυσίδων όπως επίσης μεταξύ της Thr5 της A αλυσίδας και της Lys284 της B αλυσίδας και της Asp171 της A αλυσίδας και της Lys 256 της B αλυσίδας (McCoy *et al.*, 2007).

### 1.3.2 Η ρύθμιση της ενεργότητας της UGPάσης.

#### 1.3.2.1 Η ολιγομερίωση ως γενικός ρυθμιστικός μηχανισμός των πυροφωσφορυλασών.

Η ολιγομερίωση είναι μία από τις ρυθμιστικές διαδικασίες που έχουν σχέση με τη λειτουργία ή και τη δραστηριότητα των πρωτεϊνών (Torshin, 1999; Peneff *et al.*, 2001; Wilczynska *et al.*, 2003; Perugini *et al.*, 2005). Σε πολλά ένζυμα η ενεργός μορφή είναι το μονομερές ενώ ανενεργή είναι το ολιγομερές (ή αντίστροφα) που

υπογραμμίζει την σημασία των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μονομερών. Παρόλο που το φαινόμενο της ολιγομερίωσης έχει μελετηθεί αρκετά *in vitro* ως μέρος των διαδικασιών αναδίπλωσης των πρωτεϊνών, οι φυσιολογικοί μηχανισμοί και βιολογικοί ρόλοι της ολιγομερίωσης δεν είναι πλήρως κατανοητοί.

Έχει βρεθεί ότι η UGRάση του κριθαριού υπάρχει σε μείγμα μονομερών, διμερών και υψηλότερης τάξης ολιγομερών, με το μονομερές να είναι πιο δραστικό (Martz *et al.*, 2002). Τα παραπάνω βρέθηκαν με τη χρήση χρωματογραφίας μοριακών ηθμών και native PAGE. Η ολιγομερίωση της UGRάσης είναι πιθανόν να παίζει ρυθμιστικό ρόλο και οπότε να είναι σημαντική για οποιαδήποτε διαδικασία που απαιτεί UDP-γλυκόζη ως υπόστρωμα.

Οι Kleczkowski *et al.* (2005) ερεύνησαν τους παράγοντες που επηρεάζουν την κατάσταση ολιγομερίωσης του ενζύμου με τη χρήση καθαρής ανασυνδυασμένης UGRάσης του κριθαριού. Τα αποτελέσματα των Kleczkowski *et al.* (2005) έδειξαν ότι μετά από επώαση της UGRάσης άγριου τύπου με φωσφορικά ή Tris επάγεται ολιγομερίωση ενώ τα ρυθμιστικά διαλύματα Mops και Hepes αποδιατάσσουν τελείως τα ολιγομερή σε μονομερή που είναι και η ενεργός μορφή του ενζύμου. Παρόμοια αποτελέσματα με τους παραπάνω χειρισμούς παρατηρήθηκαν και από τα μεταλλάγματα της UGRάσης KK127-128LL και C99S. Παρόλα αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα είχαν μικρή δράση στην κατάσταση ολιγομερίωσης του μεταλλάγματος LIV135-137NIN. Η σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος δεν έπαιξε ρόλο στη δραστικότητα της UGRάσης εφόσον η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν μικρότερη από περίπου 20 ng/ml. Όμως σε υψηλότερες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης το Tris αλλά όχι το Mops και το Hepes είχε ως αποτέλεσμα την υποεκτίμηση της δραστικότητας του ενζύμου. Τέλος προτείνεται (Kleczkowski *et al.*, 2005) ότι η κατάσταση ολιγομερίωσης της UGRάσης μπορεί να ελεγχθεί από λεπτές αλλαγές του ρυθμιστικού διαλύματος και από την αραίωση της πρωτεΐνης.

Οι Kleczkowski *et al.* (2005) έδειξαν (α) ότι η ολιγομερίωση της UGRάσης άγριου τύπου αλλά όχι του NIN μεταλλάγματος είναι αναστρέψιμη, (β) ότι κάποια ρυθμιστικά διαλύματα έχουν αντίθετα αποτελέσματα στη δομική συνάφεια των μονομερών της UGRάσης και τέλος (γ) η αραίωση του ενζύμου πιθανόν να επάγει την αποολιγομερίωση της πρωτεΐνης ανεξάρτητα του χρησιμοποιούμενου ρυθμιστικού διαλύματος και οδηγεί στο σχηματισμό δραστικών μονομερών. Η κατάσταση ολιγομερίωσης του ενζύμου έχει αναφερθεί ότι μπορεί να ελεγχθεί από λεπτές

αλλαγές του υδρόφοβου περιβάλλοντος καθώς και από συνθήκες μοριακού συνωστισμού.

### 1.3.2.2 Άλλοι μηχανισμοί ρύθμισης της ενεργότητας της UGRάσης.

Σε ζωικούς ιστούς και μύκητες, η UGRάση υπόκειται σε ρύθμιση σε αρκετά επίπεδα και αυτό επειδή λειτουργεί στο σταυροδρόμι κατανάλωσης υδατανθράκων μέσω της γλυκόλυσης και δημιουργίας του αποθηκευτικού γλυκογόνου. Στη ζύμη *S. cerevisiae*, η PAS κινάση (μία κινάση σερίνης/θρεονίνης) ενοχοποιείται για τη μείωση της έκφρασης της UGRάσης και της δραστηριότητας σύνθεσης του γλυκογόνου μέσω άμεσης φωσφορυλίωσης και φωσφορυλίωσης μεταφραστικών παραγόντων (Rutter *et al.*, 2002). Τέλος υπάρχουν ενδείξεις για τη ρύθμιση της φυτικής UGRάσης σε επίπεδο αντιγραφής (Ciereszko *et al.*, 2001a,b).

Εκτός της ολιγομερίωσης, στους πιθανούς μεταμεταφραστικούς τρόπους ρύθμισης της UGRάσης περιλαμβάνονται η φωσφορυλίωση (Rutter *et al.*, 2002) και η Ο-γλυκοζυλίωση (Wells *et al.*, 2003). Οι παράγοντες που σχετίζονται με τη δραστηριότητα της UGRάσης μέσω μετα-μεταφραστικής ρύθμισης περιλαμβάνουν καταπόνηση μέσω έλλειψης φωσφορικών, έκθεση στο ψύχος ή και στο φως, τροφοδοσία σακχαρόζης, αλατότητα και τοξικότητα καδμίου (Ciereszko *et al.*, 2001a,b, 2005; Goulard *et al.*, 2001; Repetto *et al.*, 2003; Kleczkowski *et al.*, 2004; Ciereszko and Kleczkowski, 2005).

Οι Ciereszko *et al.* (2005) μελέτησαν τις επιπτώσεις της έλλειψης ανόργανων φωσφορικών, της προσθήκης σακχαρόζης και της έκθεσης σε φως και σκοτάδι στην έκφραση του γονιδίου της UGRάσης στο *Arabidopsis*. Η έλλειψη των φωσφορικών αύξησε την έκφραση του *Ugr* γονιδίου, αύξησε τη δραστηριότητα της UGRάσης και τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης. Στα μεταλλάγματα *rho1* (που παρουσίαζαν έλλειψη φωσφορικών) το γονίδιο εκφράστηκε περισσότερο σε φύλλα που εκτέθηκαν στο σκοτάδι αλλά όχι στα φύλλα των φυτών αγρίου τύπου. Στα φυτά αγρίου τύπου όσο και στα μεταλλάγματα *rho* η καθημερινή έκθεση στο φως αύξησε την έκφραση του γονιδίου. Στα φύλλα των μεταλλαγμάτων *rho1* και *rho2* (που παρουσίαζαν συσσώρευση φωσφορικών) δεν παρουσιάστηκε καμία ή παρουσιάστηκε πολύ μικρή αλλαγή στο περιεχόμενο της γλυκόζης και της φρουκτόζης ανεξάρτητα των συνθηκών φωτισμού. Τα *rho1* φυτά όμως, είχαν πολύ μεγαλύτερα επίπεδα

σακχαρόζης και αμύλου στο σκοτάδι σε σύγκριση με τα rho2 φυτά και αυτά του άγριου τύπου. Η έκφραση του γονιδίου αυξήθηκε όταν φύλλα φυτών άγριου τύπου τροφοδοτήθηκαν με σακχαρόζη αλλά η έκφραση στο rho2 ήταν λιγότερο ευαίσθητη σε αυτό το χειρισμό σε σχέση με τα rho1 φυτά και αυτά του αγρίου τύπου. Η έκφραση του *Ugp* στα *rgm1* και *sex1* μεταλλάγματα (που παρουσίαζαν ανωμαλίες στη συσσώρευση αμύλου ή και σακχαρόζης) δεν εξαρτιώταν από τη συγκέντρωση του αμύλου καθώς επίσης δεν είχε στενή σχέση με τα επίπεδα διαλυτής σακχαρόζης. Το οκαδικό οξύ (OKA) μπλόκαρε αποτελεσματικά την έλλειψη ανόργανων φωσφορικών και την εξαρτώμενη της σακχαρόζης έκφραση του *Ugp* σε αποκομμένα φύλλα, ενώ η σταυροπροστατίνη (STA) είχε πολύ μικρή επίδραση σε αυτά τα δύο φαινόμενα (ειδικά στα φύλλα με τροφοπενία φωσφόρου). Τα παραπάνω προτείνουν ότι η έλλειψη ανόργανων φωσφορικών και η επίδραση της σακχαρόζης στο *Ugp* μεταφέρονται μέσω μονοπατιών που πιθανόν να μοιράζονται παρόμοια συστατικά λαμβάνοντας υπόψη την ευαισθησία του στο OKA και το STA. Οι Ciereszko *et al.* (2005) πρότειναν ότι η έκφραση του γονιδίου (*Ugp*) ρυθμίζεται από αλληλεπιδράσεις σημάτων που προέρχονται από την έλλειψη φωσφορικών, το περιεχόμενο της σακχαρόζης και τις συνθήκες έκθεσης σε φως ή και σκοτάδι. Τέλος, προτείνεται ότι το φως ή και η σακχαρόζη και η έλλειψη φωσφορικών μπορεί να έχουν προσθετικές επιδράσεις στην έκφραση του γονιδίου.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως το μετάλλαγμα της UGPάσης του κριθαριού LIV135-137NIN το οποίο παρουσίαζε αδυναμία απο-ολιγομερισμού, είχε επίσης πολύ μικρή ενζυμική δραστηριότητα (Martz *et al.*, 2002). Αυτό ίσως σημαίνει ότι η ικανότητα αποπολυμερισμού μπορεί να είναι σημαντική για την καταλυτική αποτελεσματικότητα του ενζύμου.

### 1.3.3 Η ρύθμιση της έκφρασης του γονιδίου.

Στο γονιδίωμα του ρυζιού έχουν βρεθεί δύο ομόλογα γονίδια UGPάσης, τα *Ugp1* και *Ugp2* (Chen *et al.*, 2007). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το γονίδιο *Ugp1* εκφραζόταν με μεγαλύτερη ένταση στα σταχίδια και πιο συγκεκριμένα στη γύρη κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του ανθήρα. Σίγηση του γονιδίου αυτού με RNAi ή μείωση της έκφρασής του, είχε ως αποτέλεσμα στείρα αρσενικά άνθη. Τα αποτελέσματα αυτά σημαίνουν ότι η UGPάση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της

γύρης. Η έκφραση του δίκλωνου RNAi στα Ugp1-RI φυτά είχε ως αποτέλεσμα την συνκαταστολή των *Ugp1* και *Ugp2*. Η συνκαταστολή αυτή είχε ως αποτέλεσμα διάφορες αναπτυξιακές ανωμαλίες που υποδηλώνουν τον κρίσιμο ρόλο της UGPάσης στην αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών. Βρέθηκε επιπλέον ότι τα φυτά που είχαν υποβληθεί σε καταστολή και των δύο γονιδίων ανιχνεύθηκαν μη ώριμα τμήματα RNA. Τα μεταγραφήματα αυτά υπόκεινταν σε ωρίμανση στα σταχίδια που εξαρτώνταν από την θερμοκρασία, πράγμα που οδηγεί σε ένα νέου τύπου αρρενοστεριότητας. Τα μητρικά κύτταρα των μικροσπορίων των Ugp1 σιγημένων φυτών εμφανίζονταν φυσιολογικά πριν τη μείωση, αλλά κατά τη διάρκεια αυτής, υπήρχε διακοπή της φυσιολογικής εναπόθεσης καλλόζης. Συνεπώς, τα μητρικά κύτταρα των μικροσπορίων εκφυλίζονταν στα αρχικά στάδια της μείωσης το οποίο επέφερε ολοκληρωτική καταστροφή της γύρης. Επιπρόσθετα, παρεμποδίστηκε ο εκφυλισμός του τάπητα και του ενδιάμεσου επιτοίχιου. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το γονίδιο *Ugp1* είναι απαραίτητο για τις διαδικασίες εναπόθεσης της καλλόζης κατά τη διάρκεια της μείωσης των μητρικών κυττάρων των γυρεοκόκκων (Chen *et al.*, 2007).

Γενετικά τροποποιημένα είδη του *Dictyostelium* απέτυχαν να ολοκληρώσουν τον αναπτυξιακό τους κύκλο λόγω των ανεπαρκών αποθεμάτων της UDP-γλυκόζης που χρησιμοποιείται στη βιοσύνθεση της κυτταρίνης (Dimond *et al.*, 1976). Όταν η έκφραση του γονιδίου *UgpB* του *Dictyostelium discoideum* παρεμποδίστηκε τα κύτταρα παρουσίασαν ανωμαλίες στη διαφοροποίηση και στην ανάπτυξη του με παράλληλη μείωση της ζωτικότητας των σπορίων και των επιπέδων του γλυκογόνου (Bishop *et al.*, 2002). Επίσης, υπάρχουν αναφορές ότι το γονίδιο *Ugp* εμπλέκεται στη βιοσύνθεση κυτταρίνης στο *Acetobacter xylinum* (Valla *et al.*, 1989). Μια μείωση κατά δέκα φορές της δραστηριότητας της UGPάσης σε κλώνους ζύμης επέφερε μείωση της συγκέντρωσης της β-γλυκάνης των κυτταρικών τοιχωμάτων (Daran *et al.*, 1995). Μεταλλάξεις θέσεων στο γονίδιο *UGP* οδήγησε σε ανεπάρκεια UDP-γλυκόζης και μείωση των επιπέδων γλυκογόνου (Flores-Diaz *et al.*, 1997).

Στα φυτά, τα *Ugp* γονίδια εκφράζονται σε όλους τους ιστούς συμπεριλαμβανομένων τις ρίζες, τους κόνδυλους, τα φύλλα, τα στελέχη και στα αναπτυσσόμενα σπέρματα (Zrenner *et al.*, 1993; Abe *et al.*, 2002). Η έκφραση μπορεί να αυξηθεί μέσω συνθηκών έλλειψης Pi, έκθεση σε φως και παροχής σακχαρόζης. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση της έκφρασης του γονιδίου *Ugp* μετά από παροχή σακχαρόζης γίνεται μέσω μονοπατιού που είναι ανεξάρτητο της εξοζοκινάσης και του αμψισικού οξέος. Ο μηχανισμός αυτός εμπλέκει μια ΟΚΑ-εξαρτώμενη πρωτεϊνική



φωσφατάση (Ciereszko *et al.*, 2001a,b; Kleczkowski *et al.*, 2004). Σε αντινοηματικά φυτά *Arabidopsis thaliana*, μείωση της δραστηριότητας της UGPάσης κατά 30% οδήγησε σε μεγάλη μείωση του επιπέδου των υδατανθράκων, αλλά χωρίς ανιχνεύσιμες αλλαγές σε παραμέτρους αύξησης (Johansson, 2003).

Επιπλέον, μελέτη της UGPάσης της πατάτας με τη χρήση αντινοηματικού RNA έδειξε ότι μια μείωση κατά 96% της δραστηριότητας της UGPάσης στους κόνδυλους δεν επέφερε καμία αλλαγή στα επίπεδα των σακχάρων (Zrenner *et al.*, 1993).

Δύο κλώνοι cDNA υψηλής ομοιότητας (*UGP1* και *UGP2*) της UGPάσης απομονώθηκαν από βιβλιοθήκες cDNA ενός υβριδίου λεύκας (*Populus tremula x tremuloides*). Μέσω της μεθόδου μικροσυστοιχιών DNA και της αφθονίας των μεταγραφημάτων EST, μελετήθηκε η έκφραση των δύο *UGPs* και συγκρίθηκαν με τρία γονίδια της συνθάσης της σακχαρόζης (*SUS1-3*) που εμπλέκονται επίσης στη σύνθεση της UDP-γλυκόζη. Η έκφραση των γονιδίων της *UGP* ήταν χαμηλότερη από ότι ήταν η έκφραση των γονιδίων *SUS1* και *SUS2* (ιδιαίτερα στο κάμβιο και το ξύλο τάσης tension) με αξιοσημείωτες εξαιρέσεις σε φύλλα, πρωτογενείς ρίζες και άνθη. Βάσει του ποσοτικού PCR εκτιμήθηκε πως τα μεταγραφήματά του *UGP1* στο ξύλο των ριζών, των φύλλων και των αρρένων ανθέων ήταν σημαντικά αφθονότερα από αυτά του *UGP2* ενώ σε άλλους ιστούς τα *UGP1* και *UGP2* είχαν παρόμοια έκφραση. Σε αποκομμένα φύλλα, τα μεταγραφήματα του γονιδίου *UGP1* αλλά όχι του *UGP2* εμφάνιζαν αυξημένη έκφραση μετά από έκθεση σε φως ή παροχή σακχαρόζης. Χειρισμοί με ψύχος οδήγησαν σε μεγάλες οργανοειδικευμένες αλλαγές στην έκφραση και των δύο γονιδίων με την *UGP2* να εκφράζεται περισσότερο είτε παροδικά (στα φύλλα), είτε για μεγάλο χρονικό διάστημα (στα στελέχη), είτε καθόλου (στις ρίζες) ενώ η *UGP1* εκφραζόταν σε όλα τα όργανα. Τα πρότυπα έκφρασης της UGPάσης συσχετίζονταν ξεχωριστά ή συνολικά σε μικρό βαθμό με τη δραστηριότητα και την ποσότητα της πρωτεΐνης.

Λαμβάνοντας υπόψιν πόσο σημαντικό είναι η UDP-γλυκόζη συνολικά στο μεταβολισμό, προκαλεί έκπληξη το γεγονός ότι λίγα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της φυτικής UGPάσης τόσο σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης όσο και σε επίπεδο ενζυμικής δραστηριότητας. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η δραστηριότητα της UGPάσης αυξάνεται σε συνθήκες έλλειψης φωσφορικών μέσω ρύθμισης της μεταγραφής (Ciereszko *et al.*, 2001a, 2005; Ciereszko and Kleczkowski, 2005, 2006), αλλά επίσης και σε συνθήκες τοξικότητας καδμίου (Repetto *et al.*, 2003) ή μετά από παροχή

σακχαρόζης στα φύλλα και έκθεση σε ψύχος (Boronkov *et al.*, 1996; Ciereszko *et al.*, 2001b, 2005). Η αύξηση των μεταγραφημάτων της UGRάσης λόγω παροχής των ιστών με σακχαρόζη μπορεί να ανακλά έναν πολύπλοκο μηχανισμό ανάδρομης αντίδρασης, αφού η σακχαρόζη είναι το βασικό προϊόν του μονοπατιού της UGRάσης στα φύλλα. Σε πρωτεϊνικό επίπεδο η UGRάση του κριθαριού βρέθηκε πως είχε την ιδιότητα να ολιγομερίζεται και να αποπολυμερίζεται. Τα αποπολυμερισμένα μόρια πιθανόν να είναι σημαντικά για την καταλυτική λειτουργία του ενζύμου (Martz *et al.*, 2002; Kleczkowski *et al.*, 2005). Η UGRάση του κριθαριού μπορεί επίσης να προσδεθεί σε μια 14:3:3 πρωτεΐνη (Alexander and Morris, 2006).

Περισσότερα είναι γνωστά για τη ρύθμιση της SuSy που μπορεί να αντιδρά με 14:3:3 πρωτεΐνες (Alexander and Morris, 2006) και υπόκειται σε αντιστρεπτή φωσφορυλίωση που επιδρά με μεμβράνες (Winter and Huber, 2000). Η έκφραση των γονιδίων της SuSy (*SUS*) ρυθμίζεται από το επίπεδο των υδατανθρακών και τις αβιοτικές καταπονήσεις με παράλληλες επιδράσεις στη δραστηριότητα ή και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της SuSy (Koch *et al.*, 1992; Déjardin *et al.*, 1999; Ciereszko and Kleczkowski, 2002, 2005; Baud *et al.*, 2004; Gonzali *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2006). Υπάρχουν συνήθως αρκετά γονίδια *SUS* σε κάθε είδος π.χ έξι στο *Arabidopsis* (Baud *et al.*, 2004), τουλάχιστον δέκα στο ρύζι και έντεκα στη λεύκα (Geisler-Lee *et al.*, 2006) πράγμα που δυσκολεύει τις μελέτες που σχετίζονται με συγκεκριμένες λειτουργίες κάθε ισότυπου της SuSy.

Το γονιδίωμα του ρυζιού περιέχει δύο ομόλογα γονίδια της UGRάσης, το *Ugp1* στο χρωμόσωμα 9 (Abe *et al.*, 2002) και *Ugp2* στο χρωμόσωμα 2 (Mu, 2002). Το γονίδιο *Ugp1* του ρυζιού κλωνοποιήθηκε πρώτα από άωρο ενδοσπέρμιο. Τα επίπεδα του mRNA ήταν υψηλά 10 με 15 ημέρες μετά την άνθηση και χαμηλότερα μέχρι και 35 ημέρες μετά την άνθηση (Abe *et al.*, 2002). Εντυπωσιακό θεωρήθηκε το γεγονός ότι το γονίδιο *Ugp2* στο χρωμόσωμα 2 εκφράζεται μόνο στη διπύρηνη γύρη (Mu, 2002) και όχι στα μονοκύτταρα μικροσπόρια.

#### 1.3.3.1 Η ρύθμιση της έκφρασης της UGRάσης από τη σακχαρόζη.

Η έκφραση της UGRάσης στα φύλλα του *Arabidopsis* ρυθμιζόταν έντονα θετικά από τη σακχαρόζη. Αντίθετα η έκφρασή της δεν επηρεαζόταν από τη γλυκόζη ή το οσμωτικό δυναμικό (Ciereszko *et al.*, 2001b). Και τα δύο γονίδια της UGP

υπερρυθμίζονταν στις κοτύλες των φυτών που αναπτύχθηκαν σε μέσο που περιείχε σακχαρόζη αλλά μόνο η έκφραση της UGP1 ήταν παρούσα σε μέσο που απουσίαζε σακχαρόζη (Meng *et al.*, 2008). Επίσης ο προαγωγέας του γονιδίου UGP2 αλλά όχι αυτός του UGP1 περιέχει ένα μικρό νουκλεοτιδικό μοτίβο, το CATGCATG, που ονομάζεται UGP<sub>e</sub>-2 και πιθανόν να είναι ειδικευμένο στο χειρισμό με σακχαρόζη (Geisler *et al.*, 2006).

Η θετική ρύθμιση της UGPάσης, από τη σακχαρόζη έχει παρατηρηθεί επίσης σε κονδύλους πατάτας (Sprychalla *et al.*, 1994).

Στο *Arabidopsis*, το φαινόμενο της αύξησης των μεταγραφημάτων της UGPάσης, από τη σακχαρόζη ήταν ανεξάρτητο από το επίπεδο της εξοζοκινάσης και παρεμποδιζόταν τελείως από το οκαδικό οξύ (OKA), έναν ισχυρό παρεμποδιστή των πρωτεϊνικών φωσφατασών (PP) 1 και 2A (Ciereszko *et al.*, 2001b). Το φαινόμενο αυτό συνοδευόταν από μια σημαντική αύξηση των μεταγραφημάτων της SuSy (*SUS1*) από το OKA το οποίο ήταν ευαίσθητο σε ρύθμιση μέσω HXK ή και οσμωτικών (Dejardin *et al.*, 1999; Ciereszko and Kleczkowski, 2002). Τα αποτελέσματα της δράσης του OKA δείχνουν ότι μια φωσφοροπρωτεΐνη (X-P) που δρα ως υπόστρωμα της PP1 ή και της PP2A, είναι αυτή που μεσολαβεί για την αύξηση των μεταγραφημάτων της *SUS1*. Αντίθετα, η υπερρύθμιση της UGPάσης απαιτεί διφωσφορλίωση της X-P ή κάποιων άλλων φωσφοροπρωτεϊνών που δρουν ως υπόστρωμα για της PP1 ή/και της PP2A. Τα παραπάνω δείχνουν ότι η εξόζη (ή/και τα οσμωτικά) και τα μονοπάτια που σηματοδοτούνται μέσω της σακχαρόζης μπορεί να δρουν ανταγωνιστικά τουλάχιστον για τη *SUS1* και την UGPάση. Η παρουσία των ευδιάκριτων σηματοδοτικών μονοπατιών των *UGP* και *SUS1* γονιδίων μπορεί να αντιπροσωπεύουν ένα μηχανισμό όπου σίγουρα παράγεται UDP-γλυκόζη ακόμα και αν ένα από τα μονοπάτια που λαμβάνουν μέρος η SuSy ή η UGPάση μπλοκάρονται ή είναι αδρανή.

### 1.3.3.2 Η ρύθμιση της έκφρασης της UGPάσης κάτω από συνθήκες καταπόνησης.

Στο *Arabidopsis*, η έκφραση της UGPάσης και η δραστηριότητα ή και το πρωτεϊνικό περιεχόμενο ρυθμίζονταν θετικά και σημαντικά από την ανεπάρκεια φωσφόρου. Σε ρίζες μπιζελιού (*Pisum sativum*) το πρωτεϊνικό περιεχόμενο της UGPάσης αυξήθηκε μετά από καταπόνηση καδμίου. Το παραπάνω πιθανώς να

αποδίδεται στην επαγόμενη μέσω του καδμίου έλλειψη φωσφόρου και συνεπώς αύξηση της έκφρασης της UGPάσης (Repetto *et al.*, 2003). Η εμπλοκή της UGPάσης μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό για την αύξηση του διαθέσιμου Pi κατά τη διάρκεια καταπόνησης με φωσφορικά τουλάχιστον στους ιστούς προέλευσης όπου η UGPάση εμπλέκεται στην σύνθεση της σακχαρόζης. Τα πυροφωσφορικά που απελευθερώνονται κατά τη σύνθεση UDP-γλυκόζης από τη UGPάση υδρολύονται σε ανόργανα φωσφορικά από πυροφωσφατάσες ως εκ τούτου αυξάνοντας τη διαθεσιμότητα των ανόργανων φωσφορικών στα φυτά που βρίσκονται υπό έλλειψη φωσφόρου.

Σε κόνδυλους πατάτας, η UGPάση εκφραζόταν περισσότερο σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών (Spsychalla *et al.*, 1994; Boronkov *et al.*, 1996) όπως και σε φύλλα *Arabidopsis* (Ciereszko *et al.*, 2001b). Στο *Arabidopsis*, όπως διαπιστώθηκε από μεταλλάγματα με αδυναμία σύνθεσης ABA, το σήμα του ψύχους μεταφέρθηκε μέσω ενός ανεξάρτητου από το ABA μονοπατιού. Ο χειρισμός με ψύχος συνήθως οδηγεί σε συσσώρευση των σακχάρων με την UGPάση να μετέχει σημαντικά στον μεταβολισμό της σακχαρόζης. Πιο συγκεκριμένα στην πατάτα, η UGPάση ήταν ο κύριος λόγος που οδηγούσε στο φαινόμενο που είναι γνωστό ως “cold sweetening”, δηλαδή στη συσσώρευση των σακχάρων όταν οι κόνδυλοι αποθηκεύονταν σε χαμηλές θερμοκρασίες (Sowokinos *et al.*, 1997). Τέλος η UGPάση στην πατάτα είχε μικρότερη έκφραση κάτω από συνθήκες ξηρασίας και κατάκλυσης του εδάφους με νερό (Ciereszko *et al.*, 2001b). Η ωσμωτική καταπόνηση όμως, επάγει ισχυρά το γονίδιο SUS2 στα φύλλα του *Arabidopsis* που επιφέρει και την συνακόλουθη αύξηση του πρωτεϊνικού περιεχομένου της SuSy (Dejardin *et al.*, 1999). Φαίνεται λοιπόν ότι σε συνθήκες κατάκλυσης των φυτών (στέρηση O<sub>2</sub>) ασκούνται διαφορετικές δράσεις στις UGPάσες και SuSy. Αυτό σημαίνει ότι τα δύο ένζυμα δεν είναι μεταβολικά συνδεδεμένα μέσω της UDP-γλυκόζης κάτω από τις συγκεκριμένες συνθήκες.

#### **1.4 Πόσα γονίδια κωδικοποιούν την UGPάση.**

Αρχικά υπήρχε η υπόθεση ότι η UGPάση αντιπροσωπεύεται από μόνο ένα γονίδιο *UGP* στα φυτά. Συστηματική εξέταση cDNAs κριθαριού για την εύρεση γονιδίων *UGP*, έδειξε μόνο έναν ισότυπο σε φύλλα, έμβρυο και ενδοσπέρμιο (Eimert *et al.*, 1996). Επίσης, μικρές διαφοροποιήσεις στην ακολουθία των κλώνων cDNA

της πατάτας είχε δικαιολογηθεί ως αποτέλεσμα αλληλικού πολυμορφισμού (Sowokinos et al., 1997). Παρόλα αυτά, από βάσεις δεδομένων του γονιδιώματος του *Arabidopsis* είναι πλέον φανερό ότι υπάρχουν δύο υψηλά σε ομολογία γονίδια *UGP* τα *At3g03250* και *At5g17310*, που βρίσκονται στα χρωμοσώματα 3 και 5 αντίστοιχα τα οποία και εκφράζονται (Kleczkowski et al., 2004). Επίσης, βρέθηκαν δύο ομόλογα γονίδια της UGPάσης σε βιβλιοθήκες cDNA της λεύκας (*Populus spp.*), του ρυζιού (*Oryza sativa*), και του μυξομύκητα *Dictyostelium discoideum*. Στο τελευταίο είχε προταθεί ότι τα γονίδια έχουν διαφορετικούς ρόλους στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του μυξομύκητα όπως προκύπτει από τις αναλύσεις βιώσιμων μεταλλαγμάτων (Bishop et al., 2002).

Τα γονίδια κωδικοποιούν για πρωτείνες που περιέχουν όλα τα αμινοξικά κατάλοιπα που αναφέρονται ως απαραίτητα για την κατάλυση του ενζύμου και την πρόσδεση του υποστρώματος (Katsube et al., 1991; Geisler et al., 2004; McCoy et al., 2007). Πράγματι, όταν υπερκφράστηκαν cDNAs που ανταποκρίνονταν για κάθε ισότυπο της UGPάσης στο *Escherichia coli*, οι πρωτείνες είχαν όλες τις τυπικές ιδιότητες των UGPασών. Τέτοια χαρακτηριστικά είναι η υψηλά ειδικευμένη δραστηριότητα, η υψηλή ομολογία για όλα τα υποστρώματα και προς τις δύο κατευθύνσεις της αντίδρασης και ειδικότερα προς την παραγωγή UDP- γλυκόζης (πυροφωσφορολυτική κατεύθυνση) και 1-φωσφορο-γλυκόζης (κατεύθυνση σύνθεσης) (Meng et al., 2008).

Σύγκριση των φυτικών UGPασών σε αμινοξικό επίπεδο κατέδειξε ταυτότητα αμινοξέων σε επίπεδο 59-96% (Katsube et al., 1990; Eimert et al., 1996; Pua et al., 2000; Abe et al., 2002) και περίπου 55% ταυτότητα με τις αντίστοιχες πρωτείνες από το μυξομύκητα (Bishop et al., 2002), το συκώτι θηλαστικών (Konishi et al., 1993; Chang et al., 1996), και τη ζύμη *S. cerevisiae* (Daran et al., 1995). Οι ευκαρυωτικές UGPάσες αποκλίνουν σημαντικά από τις βακτηριακές καθώς έχουν πολύ μικρή ως καμία ταυτότητα ως προς την αμινοξική τους ακολουθία (περίπου 8%). Οι φυτικές UGPάσες έχουν 13-15% ταυτότητα με τις AGXs φυτικής και ζωικής προελεύσεως αλλά έχουν μόνο 40% ομοιότητα όταν γίνει αντικατάσταση όμοιων λειτουργικά αμινοξέων. Ο καλύτερος τρόπος σύγκρισης μιας κοινής λειτουργίας είναι μέσω ομοιότητας ενώ όσον αφορά μέτρηση και συγγένεια εξέλιξης η % ταυτότητα θεωρείται χρήσιμο μέτρο (τυχαία ευθυγραμμισμένες πρωτείνες του *Arabidopsis* είχαν περίπου 5% ταυτότητα και 10% ομοιότητα).

Σύγκριση με πρωτεϊνικούς δείκτες μοριακών μαζών μέσω SDS- PAGE έδειξε πως οι UGRάσεις του *Arabidopsis* (Meng *et al.*, 2008 ) κυμαίνονταν μεταξύ 51- 53 kDa (51.6 και 51.7 kDa για την UGRάση1 και UGRάση2 αντίστοιχα) γεγονός που συμφωνεί με τα δεδομένα από πατάτα και κριθάρι (Katsube *et al.*, 1991; Eimert *et al.*, 1996; Martz *et al.*, 2002).

Το γονιδίωμα του ρυζιού περιέχει δύο ομόλογα γονίδια της UGRάσης, το Ugr1 στο χρωμόσωμα 9 (Abe *et al.*, 2002) και Ugr2 στο χρωμόσωμα 2 (Mu, 2002). Το γονίδιο Ugr1 του ρυζιού κλωνοποιήθηκε πρώτα από άωρο ενδοσπέρμιο.

Ακόμα, οι Meng *et al.* (2007) χαρακτήρισαν δύο γονίδια από λεύκα που κωδικοποιούν την UGRάση.

Παρά τα αποτελέσματα των Kleczkowski *et al.* (2004) όσον αφορά την ύπαρξη δύο γονιδίων στο *A. thaliana*, πρόσφατα, οι Okazaki *et al.* (2009) αναγνώρισαν ένα νέο γονίδιο, το UGP3 που απαιτείται για τη βιοσύνθεση των θειολιπιδίων. Το συγκεκριμένο γονίδιο μέσω της αμινοξικής του ακολουθίας, φαίνεται ότι είναι μια UGRάση που εμπλέκεται στην αναγέννηση της UDP- γλυκόζης και δρα ως πρόδρομο μόριο της πολικής κεφαλής των θειολιπιδίων.

## **1.5 Η βιοσύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων και η UGRάση.**

Κάθε μελέτη διερεύνησης του ρόλου της UGRάσης πρέπει να λάβει υπόψη ότι η UDP-γλυκόζη, το υπόστρωμα ή και παράγωγο του ενζύμου, είναι ένας μεταβολίτης κλειδί για το μεταβολισμό των υδατανθράκων σε φωτοσυνθετικούς και μη φωτοσυνθετικούς ιστούς. Εκτός του ότι η UDP-γλυκόζη χρησιμοποιείται στα μονοπάτια της σακχαρόζης, χρησιμοποιείται επίσης άμεσα ή έμμεσα στη βιοσύνθεση των πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος αντανακλώντας έτσι το σημαντικό ρόλο του ως πρόδρομο μόριο στη βιογένεση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Gibeaut, 2000). Ανάμεσα στους άλλους ρόλους του, είναι η εμπλοκή του στη σύνθεση τμημάτων υδατανθράκων των γλυκολιπιδίων και γλυκοπρωτεϊνών (Flores-Diaz *et al.*, 1997; Bishop *et al.*, 2002).

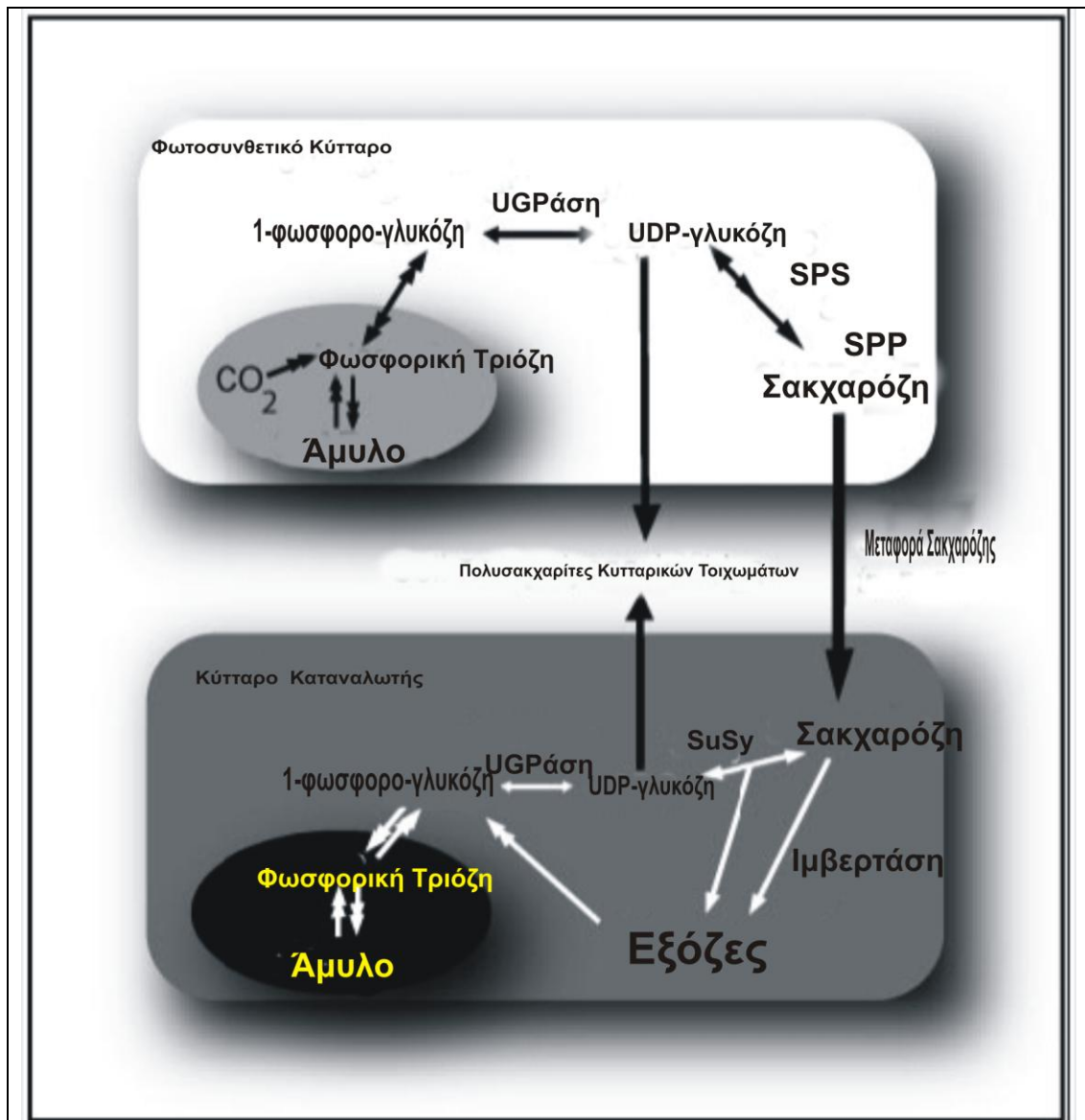
Η κυρίαρχη άποψη είναι ότι η UGRάση βρίσκεται κυρίως στο κυττόπλασμα (Kleczkowski 1994; Kleczkowski *et al.*, 2004). Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου με χρυσό στα κύτταρα του ρυζιού έδειξε ότι η πλειοψηφία των UGRασιών βρίσκεται στο

κυτόπλασμα αλλά και σε κάποιο βαθμό στους αμυλοπλάστες και τα σωμάτια Golgi (Kimura *et al.*, 1992; Mikami *et al.*, 2002). Μικρή δραστικότητα της UGRάσης αποδόθηκε στα μικροσώματα μέσω κλασμάτωσης υποκυτταρικών συστατικών κυττάρων ρυζιού και καπνού (*Nicotiana tabacum*) (Mikami *et al.*, 2001) ενώ στο κριθάρι μεγάλη δραστικότητα των UGRάσεων βρέθηκε στο μεμβρανικό κλάσμα (Becker *et al.*, 1995). Αυτή η μεμβρανική σχέση της UGRάσης θυμίζει τις ιδιότητες της SuSy η οποία είχε προταθεί πως προσδένεται στο πλασμάλλημα και παρέχει άμεσα UDP-γλυκόζη στη συνθάση της κυτταρίνης (Amor *et al.*, 1995). Γεγονότα φωσφορυλίωσης ή και αποφωσφορυλίωσης είναι απαραίτητα για πρόδεση της SuSy στο πλασμάλλημα (Winter and Huber, 2000), το φωσφορυλιωμένο ένζυμο είναι διαλυτό ενώ η αποφωσφορυλίωση επάγει την πρόσδεση της SuSy στη μεμβράνη. Ενώ δεν υπάρχει αμφιβολία στη συμμετοχή της SuSy στη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων (Amor *et al.*, 1995; Ruan *et al.*, 2003), ο πιθανός ρόλος της UGRάσης σε αυτή τη διαδικασία πρέπει ακόμα να μελετηθεί και ειδικότερα σε ιστούς πηγές. Γενικά, ώριμα φύλλα κάτω από φυσιολογικές συνθήκες περιέχουν χαμηλή συγκέντρωση πρωτεΐνης SuSy (Dejardin *et al.*, 1999) ενώ η δραστικότητα της UGRάσης στα εκχυλίσματα των φύλλων βρίσκονται σε υπερεπάρκεια (Igamberdiev and Kleczkowski, 2000). Στα φύλλα, ευνοείται η παραγωγή UDP-γλυκόζης από δεσμευμένο άνθρακα μέσω της αντίδρασης της UGRάσης (ap Rees, 1992; Kleczkowski, 1994b). Επίσης, για να είναι δραστική η UGRάση σε ιστούς καταβόθρες πρέπει να υπάρχει απόθεμα της 1-φωσφορογλυκόζης ώστε να παράγει UDP-γλυκόζη. Αυτό μπορεί να γίνει έμμεσα από τη φρουκτόζη, ένα προϊόν της αντίδρασης της SuSy όπου απελευθερώνει ένα μόριο φρουκτόζης για κάθε μόριο UDP-γλυκόζης που φτιάχνεται κατά τη διάρκεια υδρόλυσης της σακχαρόζης ή από την αντίδραση της ιμπερτάσης.

Μέσω της UDP-γλυκόζης είναι δυνατόν να βιοσυντίθεται κυτταρίνη και καλλόζη που σχηματίζονται κατ' ευθείαν στο πλασμάλλημα ενώ άλλοι πολυσακχαρίτες (π.χ ημικυτταρίνες και πηκτίνες) βιοσυντίθεται στα οργανίδια Golgi και μεταφέρονται στον περιπλασμικό χώρο με κυστίδια (Gibeaut, 2000). Δραστηριότητες που παρέχουν UDP-γλυκόζη για μετέπειτα διαδικασίες πρέπει να έχουν σχέση με τα Golgi ή πρέπει να υπάρχουν μεταφορείς που επιτρέπουν μεταφορά της UDP-γλυκόζης από το κυτόπλασμα μέσω της μεμβράνης Golgi. Σε βλαστούς μπιζελιού φάνηκε ότι η UDP-γλυκόζη μεταφέρεται στα κυστίδια Golgi σε ανταλλαγή με UMP και υπήρχε γρήγορη ενσωμάτωση του καταλοίπου της γλυκόζης της UDP-

γλυκόζη (Neckelmann and Orellana, 1998). Μέσω χρήσης μεταλλαγμάτων ζυμών φάνηκε ότι η UGPάση εμπλέκεται στη σύθεση κυτταρικών τοιχωμάτων. Σε μεταλλάγματα ζυμών, η δραστηριότητα της UGPάσης μειώθηκε κατά δέκα φορές και αυτό οδήγησε σε μείωση του περιεχομένου της β-γλυκάνης στα κυτταρικά τοιχώματα (Daran *et al.*, 1995). Επίσης μεταλλαγμένα βακτήρια *Acetobacter xylinum* που δεν είχαν την δυνατότητα παραγωγής κυτταρίνης παρουσίαζαν επίσης έλλειψη της UGPάσης (Valla *et al.*, 1989). Σε αυτούς τους οργανισμούς δεν υπάρχει δραστηριότητα της SuSy οπότε σε συνθήκες έλλειψης της UGPάσης τα φαινόμενα που αφορούν τα κυτταρικά τοιχώματα δεν προκαλούν έκπληξη. Παρόλα αυτά υπερέκφραση των γονιδίων UGPάσης και SuSy (μονοί και διπλοί μετασχηματισμοί) στον καπνό επέφερε σε αρκετές σειρές φυτών με μονό μετασχηματισμό αύξηση στο ύψος και αυξημένα ποσά κυτταρίνης όπως και σε όλες τις σειρές διπλού μετασχηματισμού (Coleman *et al.*, 2003). Σε μελέτες ξυλογέννεσης στη περιοχή του καμβίου σε στελέχη λεύκας με τη χρήση μικροσυστοιχιών DNA, βρέθηκε ότι εκφράζεται περισσότερο ένα γονίδιο της UGPάσης κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης των κυττάρων και κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των δευτερογενών κυτταρικών τοιχωμάτων (Hertzberg *et al.*, 2001). Επίσης σε ιστούς που βρισκόταν σε τη διαδικασία σχηματισμού του εγκάρδιου ξύλου στον κορμό της μαύρης καρδιάς (*Juglans nigra*), η δραστηριότητα UGPάσης συσχετίστηκε με αυξημένη αποσύνθεση σακχαρόζης από τα τέλη του καλοκαιριού μέχρι τις αρχές του χειμώνα (Magel *et al.*, 2001).





**Εικόνα 1.2.** Πιθανή εμπλοκή της UGPάσης στη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων σε φωτοσυνθετικούς ιστούς και ιστούς πηγές. Σε φωτοσυνθετικούς ιστούς, η UGPάση συνθέτει UDPG και συνεργάζεται με τη συνθάση της φωσφοροσακχαρόζης (SPS) και τη φωσφατάση της φωσφοροσακχαρόζης (SPP) για να παραχθεί σακχαρόζη. Σε ιστούς πηγές (π.χ ρίζες), η UGPάση δρα σε συνδυασμό με τη SuSy ή και τις ιμβερτάσες για την αποδόμηση της σακχαρόζης αλλά μπορεί επίσης να χρησιμοποιήσει την 1-φωσφορογλυκόζη προς παραγωγή UDPG. Τέλος, η UDPG χρησιμοποιείται για τη σύνθεση πολυσακχαριτών του κυτταρικού τοιχώματος και στους φωτοσυνθετικούς ιστούς και στους ιστούς κατανάλωσης. Σχήμα τροποποιημένο από τους (Kleczkowski et al., 2004).

## 1.6 Ο ρόλος της UGRάσης στη ροή των μεταβολιτών

Στην βιβλιογραφία, υπάρχει σύγχυση όσον αφορά αν οι μεταβολές της δραστηριότητας ή και το περιεχόμενο της UGRάσης σε αναπτυσσόμενους κονδύλους πατάτας μπορούσαν να επιφέρουν αλλαγές στη ροή των μεταβολιτών. Οι Zrenner *et al.* (1993) έδειξαν ότι η δραστηριότητα της UGRάσης σε αναπτυσσόμενους κονδύλους πατάτας μπορούσε να μειωθεί μέχρι και 96% χωρίς να επιφέρει αλλαγές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων. Εξάλλου, οι Szychalla *et al.* (1994) και Boronkov *et al.* (1996) απέτυχαν να παράγουν κονδύλους πατάτας με παρεμπόδιση της δραστηριότητας του ενζύμου μεγαλύτερη από 30% αλλά αυτός ο βαθμός παρεμπόδισης ήταν αρκετός για να επιφέρει μείωση της περιεκτικότητας σακχάρων στους αποθηκευμένους κόνδυλους. Στο *Arabidopsis*, μια μικρή σχετικά παρεμπόδιση (30%) της δραστηριότητας της UGRάσης στα φύλλα φυτών μετασχηματισμένων με RNAi οδήγησε σε μείωση του περιεχομένου των σακχάρων και σε κάποιο βαθμό μείωση του επιπέδου του αμύλου (Johansson, 2003) το οποίο σημαίνει ότι το ένζυμο μπορεί να παίζει ρόλο στον έλεγχο της ταχύτητας της σύνθεσης των υδατανθράκων. Με την παρουσία δύο γονιδίων UGRάσης στο *Arabidopsis* δεν μπορεί να εξαιρεθεί η πιθανότητα ότι τα φαινομενικά συγκρουόμενα αποτελέσματα των αντινοσηματικών μελετών στην πατάτα μπορεί να ανακλούν στην διαφορετική παρεμπόδιση των γονιδίων.

Η εκχυλίσμη δραστηριότητα της UGRάσης ιδιαίτερα στους ιστούς καταβόθρες (αλλά και στα φύλλα) υπερβαίνει κατά πολύ τις ανάγκες του ρυθμού του μεταβολισμού του άνθρακα στα φυτά (Igamberdiev and Kleczkowski, 2000). Το γεγονός αυτό πιθανόν να σχετίζεται με το ενδεχόμενο της δυνατότητας να διατηρεί η UGRάση σταθερούς ρυθμούς μεταβολισμού των υδατανθράκων ακόμα και αν η έκφρασή του ρυθμίζεται *in vivo*. Παρόλα αυτά είναι πολύ πιθανό σε *in vivo* συνθήκες η δραστηριότητα της UGRάσης να είναι πολύ χαμηλότερη και στην πραγματικότητα να περιορίζεται στα μεταβολικά μονοπάτια που είναι συνδεδεμένα με την σύνθεση ή και την αποδόμηση των σακχάρων.

## 1.7 Εντοπισμός της δραστηριότητας του ενζύμου.

Οι μελέτες που αφορούν τον εντοπισμό της δραστηριότητας του ενζύμου είναι σχετικά λίγες. Οι Sergeeva and Vreugdenhil (2002) εντόπισαν μεγάλη δραστηριότητα της UGPάσης στα αναπτυσσόμενα σπέρματα τομάτας, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στο εξωτερικό παρέγχυμα του περικαρπίου και μικρότερη στο εσωτερικό παρέγχυμα του περικαρπίου.

Σε στελέχη πετούνιας η δραστηριότητα της UGPάσης παρατηρήθηκε στους περισσότερους ιστούς. Η υψηλότερη όμως δραστηριότητα εντοπίστηκε στον εσωτερικό και εξωτερικό ηθμό καθώς και στο φωτοσυνθετικό παρέγχυμα του φλοιώδους παρεγγύματος.

Σε σαρκώδη φύλλα του *Gasteria verrucosa* η δραστηριότητα της UGPάσης παρατηρήθηκε στο πασσαλώδες στο σπογγώδες παρέγχυμα, ενώ η δραστηριότητα του ενζύμου ήταν πάρα πολύ χαμηλή στα επιδερμικά κύτταρα και στο κεντρικό μη φωτοσυνθετικό παρέγχυμα.

Τέλος, έρευνες των Okazaki *et al.* (2009) στο *A. thaliana* όσον αφορά το γονίδιο UGP3 με χρήση φθορίζουσας πρωτεΐνης κατέδειξαν την ύπαρξη της δραστηριότητας του ενζύμου σε απομονωμένους χλωροπλάστες. Τα φυτά συνθέτουν ένα λιπίδιο που περιέχει θείο, την θειοκινοβοσυλο διακυλογλυκερόλη (sulfoquinovosyldiacylglycerol) το οποίο είναι το ένα εκ των τριών μη φωσφορογλυκερολιπιδίων και αποτελεί τον κύριο όγκο των δομικών λιπιδίων των φωτοσυνθετικών μεμβρανών. Σύγκριση ομόλογων γονιδίων UGP3 σε άλλα φυτά υπέδειξε την ύπαρξη του γονιδίου και τον πιθανό ρόλο του στη σύνθεση των θειολιπιδίων. Η UDP- γλυκόζη συντίθεται στους χλωροπλάστες από την δράση του γονιδίου UGP3.

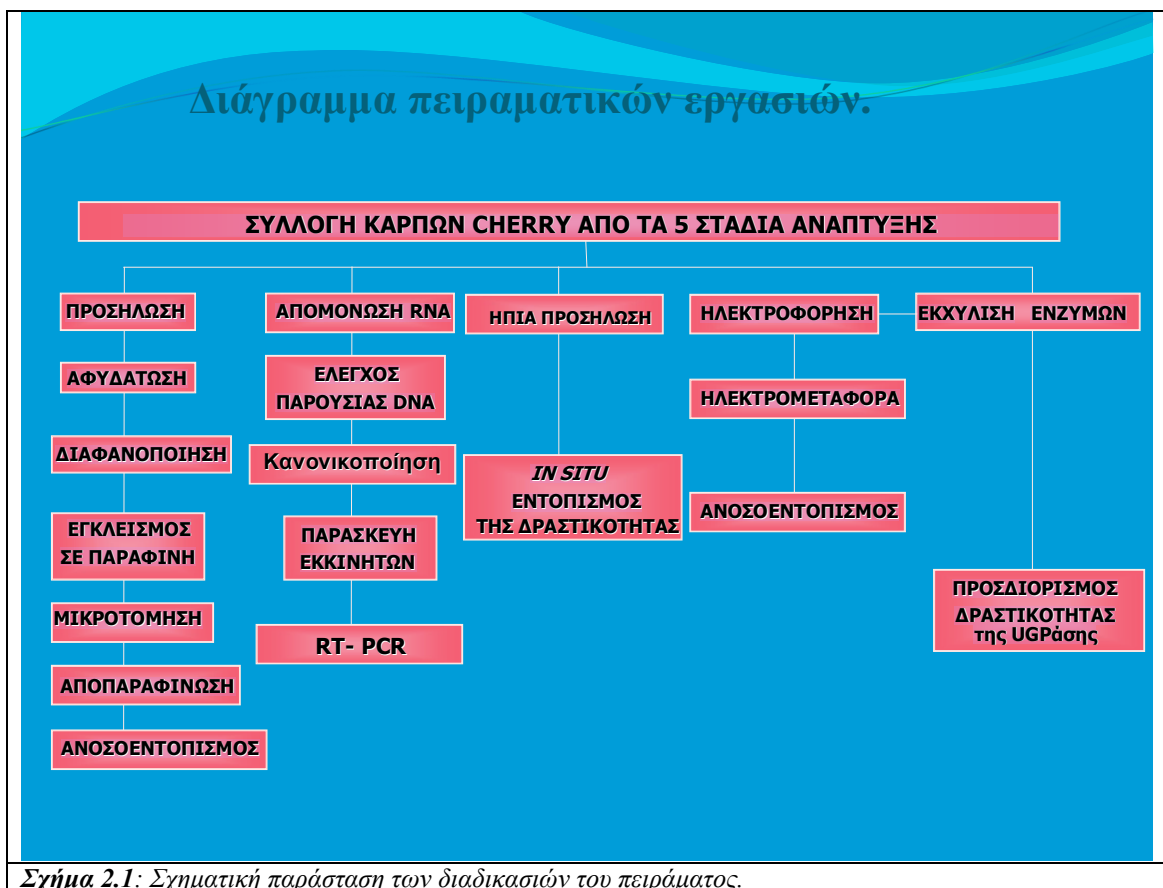
## 1.8 Σκοπός της μελέτης

Η UGPάση εμπλέκεται στο μεταβολισμό της σακχαρόζης, τη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων και τη σύνθεση θειολιπιδίων. Παρόλο που ο μεταβολισμός της σακχαρόζης και η σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων συμβαίνει κατά κανόνα στους ίδιους (αναπτυσσόμενους) ιστούς, ο ανοσοεντοπισμός της UGPάσης καθώς

επίσης και ο *in situ* εντοπισμός της ενεργότητας του ενζύμου, είναι δυνατόν να παράξουν επί πλέον ενδείξεις για τη δράση του ενζύμου στους ιστούς των φυτών. Γι' αυτό το λόγο επιλέχθηκαν παρθενοκαρπικοί και μη καρποί τομάτας σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια (στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm και 15mm , στάδιο ώριμου πράσινου καρπού, στάδιο αλλαγής χρώματος και ώριμου κόκκινου καρπού) ώστε να μελετηθεί η δράση του ενζύμου στο γενικό μεταβολισμό του καρπού κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής του. Τέλος, η μελέτη του ενζύμου αποσκοπεί στον εντοπισμό πιθανών διαφορών μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών όσον αφορά τη δραστηριότητα και τον εντοπισμό του.

## **2. Υλικά & Μέθοδοι.**

## 2.1. Οι διαδικασίες του πειράματος.



Σχήμα 2.1: Σχηματική παράσταση των διαδικασιών του πειράματος.

## 2.2 Το φυτικό υλικό

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκαν ένσπερμοι και άσπερμοι καρποί τομάτας τύπου cherry της ποικιλίας Conchita. Πρόκειται για πρώιμη ποικιλία που συγκομίζεται με ταξικαρπία. Κάθε ταξικαρπία μπορεί να φέρει 12 με 16 καρπούς (Εικόνα 2.1). Οι καρποί της Conchita είναι λαμπεροί κόκκινοι με μέσο βάρος 16- 18gr. Η ανάπτυξη και η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε στο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών του

Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Εικόνα 2.2). Η μεταφύτευση των νεαρών φυταρίων στο θερμοκήπιο πραγματοποιήθηκε το μήνα Νοέμβριο.



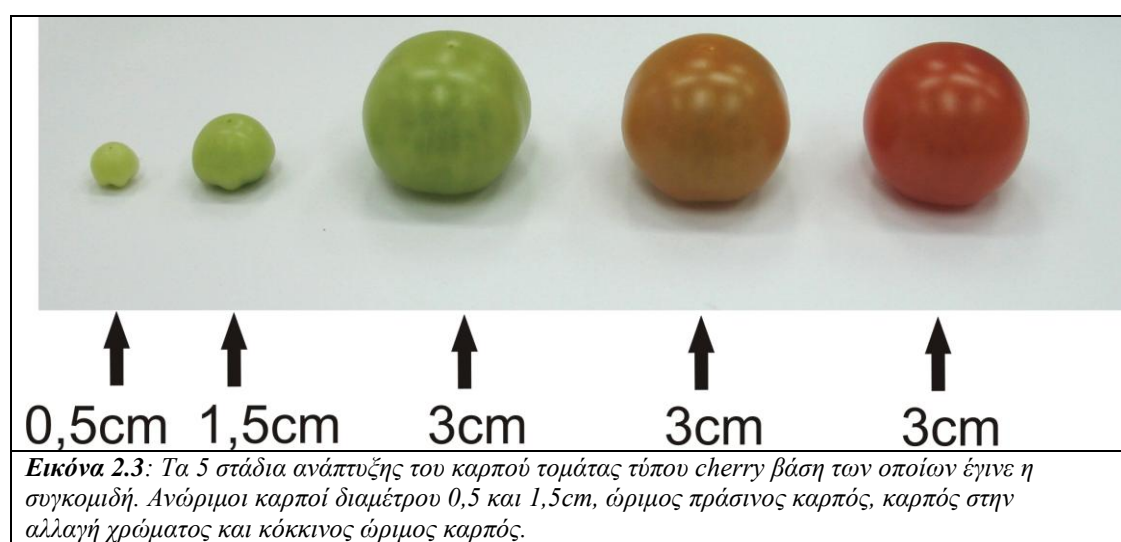
**Εικόνα 2.1** : Ταξικαρπία τομάτας cherry ποικιλίας Conchita

**Εικόνα 2.2**: Η καλλιέργεια στο θερμοκήπιο του Γ.Π.Α.

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 πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες ενέργειες. Όταν ακόμη τα άνθη ήταν κλειστά και πριν αυτά καταστούν επιδεικτικά επικονίασης, με μία λαβίδα ανοίχτηκαν τα πέταλα και αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι ανθήρες παραμένοντας μόνο ο στύλος με το στίγμα (ευνουχισμός). Ακολούθησε ψεκάσμος του άνθους με κατάλληλη ορμόνη και το άνθος σημάνθηκε με ταμπελάκι όπου αναγραφότανε η ημερομηνία επέμβασης. Όταν οι καρποί έφτασαν στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης συγκομίστηκαν. Η ορμόνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Ortomone με δραστική ουσία το β-ναφθοξυοξικό οξύ σε συγκέντρωση 50ppm. Οι ένσπερμοι καρποί προήλθαν από φυσιολογική καρπόδεση χωρίς καμία επέμβαση υποβοήθησης της καρπόδεσης.

Οι άσπερμοι και ένσπερμοι καρποί συγκομίστηκαν σε 5 διαφορετικά στάδια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη τους: ανώριμοι καρποί διαμέτρου 0,5cm και

1,5cm, ώριμοι πράσινοι, καρποί στην αλλαγή του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι (Εικόνα 2.3). 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 να σταματήσουν οι μεταβολικές διαδικασίες έως τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Αμέσως μετά τη συγκομιδή τους, ένα μέρος των καρπών χρησιμοποιήθηκε για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου και τον εντοπισμό της δραστηριότητας *in situ*, οι δε υπόλοιποι αποθηκεύτηκαν σε κατάλληλο ψυκτικό χώρο στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα για την εκχύλιση των πρωτεϊνών και τη μέτρηση της δραστηριότητας της UGRάσης καθώς και για την μέτρηση της συσσώρευσης των μεταγραφημάτων του γονιδίου της UGRάσης (RT-PCR) (Σχήμα 2.1).



### 2.3 Ιστοχημική μελέτη.

Για την ιστοχημική έγιναν τομές στα δείγματα, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Επειδή το υπό μελέτη ένζυμο δεν είναι δεσμευμένο εντός των κυττάρων ακολουθήθηκε η διαδικασία ήπιας προσήλωσής τους. Κατά τη διαδικασία αυτή, ένα μεγάλο μέρος της ενεργότητας των ενζύμων καταστρέφεται, το ένζυμο όμως προσηλώνεται και έτσι είναι δυνατός ο εντοπισμός του στους διάφορους ιστούς.

Οι τομές έγιναν μέσα σε τρυβλία που περιείχαν προσηλωτικό διάλυμα. Το διάλυμα αυτό αποτελείτο από 2% PVP (για δέσμευση των ταννινών οι οποίες απενεργοποιούν τα ένζυμα), 2% παραφορμαλδεΰδη (προσηλώνει τα ένζυμα) και 1mM DTT. Οι τομείς αφήνονται στο προσηλωτικό για περίπου 15-20min. Στη



συνέχεια το προσηλωτικό αφαιρείται, προστίθεται 1ml Triton και αποστειρωμένο νερό και τέλος οι τομές καταψύχονται. Ακολουθεί απόψυξη των τομών και ξέπλυμα τους για την απομάκρυνση των μεταβολιτών που πιθανόν παρεμβαίνουν στις αντιδράσεις εντοπισμού του ενζύμου.

Για τον εντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε η αναγωγή του μπλε του τετραζολίου προς αδιάλυτες φορμαζάνες.

Για τον *in situ* εντοπισμό του ενζύμου ακολουθήθηκε η μέθοδος των Sergeeva και Vreugdenhil (2002).

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε δίνεται παρακάτω.

100mM Tris HCl pH 7,5

1mM EDTA

5mM Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O

0.1%BSA

1mM NAD

1U /ml φωσφορογλυκομουτάση (PGM)

1U /ml αφυδογονάση της 6-φωσφορο-γλυκόζης (G6PDH)

20μM 1,6-διφωσφορο-γλυκόζης

0.9mM πυροφωσφορικών (PPi)

0.03% κυανούν του νιτροτετραζολίου (NBT)

5mM ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UDP-Glucose)

Ως μάρτυρες χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα χωρίς την προσθήκη της UDP-γλυκόζης.

Οι τομές των δειγμάτων έγιναν σε στερεοσκόπιο Leica Wild M3Z. Τα δείγματα φωτογραφήθηκαν στο παραπάνω στερεοσκόπιο καθώς και σε μικροσκόπιο Zeiss Axiolab με ψηφιακή φωτογραφική μηχανή Canon, Powershot A620.

## 2.4 Η εκχύλιση του ενζύμου

Μετά την παραλαβή των δειγμάτων για τα 4 (εκτός του σταδίου των 5mm) στάδια των ένσπερμων και τα αντίστοιχα 4 των άσπερμων καρπών ακολούθησε η εκχύλιση των ενζύμων 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. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα χωρίστηκαν σε δύο μέρη. Το ένα μέρος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της UGPάσης ενώ στο άλλο προστέθηκε ακετόνη θερμοκρασίας -20°C ώστε η τελική της συγκέντρωση να είναι 80% και εν συνεχεία τοποθετήθηκε στους -20°C για 12h. Στη συνέχεια μετά από την απομάκρυνση της ακετόνης οι καταβυθισμένες πρωτεΐνες επαναδιαλύθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα διάλυσης δείγματος και χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της καταλληλότητας του αντισώματος, μετά από ηλεκτροφόρηση και ηλεκτρομεταφορά του ενζύμου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιάλυσης των πρωτεϊνών (Hames and Rickwood, 1981)**

0.0625M Tris HCl pH 6.8  
5% μερκαπτοαιθανόλη  
10% γλυκερόλη  
0.002% κυανούν της βρωμοφαινόλης

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

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών**

150mM Tris- HCl pH 7.5  
30% γλυκερόλη  
0.04% BSA  
4mM Ανοιγμένη γλουταθειόνη  
8% PVP  
0.2% Triton X  
40mM Διθειοθρεϊτόλη

## **2.5 Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων.**

Για τη μέτρηση της δραστηριότητας της UGPάσης κρίθηκε απαραίτητος ο προσδιορισμός των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων. Ο προσδιορισμός αυτός έγινε με τη μέθοδο Bearden (1978).

#### **Διάλυμα Bearden**

1. Ζύγιση 10mg Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva 17524).
2. Το παραπάνω αραιώνεται σε 40ml 85% φωσφορικού οξέος.
3. Προσθήκη 200ml αποσταγμένο νερό (dH<sub>2</sub>O).
4. Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών γίνεται την επόμενη ημέρα.

Η πρότυπη καμπύλη εξάρτησης της απορρόφησης του δείγματος από τη συγκέντρωση των πρωτεϊνών (BSA) σχεδιάστηκε για ποσότητες BSA μεταξύ 5 και 50μg. Μετά την εκχύλιση των πρωτεϊνών και τη φυγοκέντρωση ετοιμάστηκαν 10 σωλήνες για κάθε δείγμα (15mm ανώριμου, ώριμου πράσινου, αλλαγή χρώματος, ώριμου κόκκινου για ένσπερμους και άσπερμους καρπούς) που περιείχαν 1.5ml dH<sub>2</sub>O, 100μl εκχυλίσματος και 1.5ml διαλύματος Bearden. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένας σωλήνας που περιείχε 1.5ml dH<sub>2</sub>O και 1.5ml διαλύματος Bearden. Ακολούθως έγινε φωτομέτρηση στα 595nm. Μετά τις επαναληπτικές μετρήσεις για κάθε δείγμα υπολογίζεται η συγκέντρωση της συνολικής πρωτεΐνης βάσει της πρότυπης καμπύλης.

## **2.6 Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της UGPάσης.**

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου βασίστηκε στη μέθοδο που προτείνεται για τον εντοπισμό της δραστηριότητας του ενζύμου Sergeeva και Vreugdenhil (2002) με τις εξής τροποποιήσεις.

1. Απαλλοίφθηκε το NBT, επειδή παράγει αδιάλυτο προϊόν.
2. Η συνολική αντίδραση χωρίστηκε σε δύο φάσεις. Στην πρώτη φάση το ένζυμο παράγει 1-φωσφορογλυκόζη σύμφωνα με την αντίδραση. Ακολούθως το μίγμα θερμάνθηκε για την καταστροφή των ενζύμων που πιθανόν παρέμβαιναν στην αναγωγή του NAD και εν συνεχεία το μίγμα αφέθηκε να κρυώσει και συμπληρώθηκαν τα ένζυμα και τα αντιδραστήρια για την αναγωγή του NAD.

Σε προκαταρκτικά πειράματα μελετήθηκε η πορεία της αντίδρασης κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας (25°C) και συγκέντρωσης υποστρώματος και ενζύμου. Επειδή η ταχύτητα της αντίδρασης της πρώτης φάσης παρέμενε σταθερή για 1h επιλέχθηκε η μέτρηση της ενεργότητας του ενζύμου στα 30min.

Για καθένα από τα οκτώ δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 300μl εκχυλίσματος του ιστού και 700μl διαλύματος που περιείχε τα εξής:

100mM Tris HCl pH 7,5

1mM EDTA

5mM Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O

0.1% BSA

20μM 1,6-διφωσφορο-γλυκόζης

0.9mM πυροφωσφορικών (PPi)

5mM ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UDP-Glucose)

Ο μάρτυρας περιείχε τα παραπάνω χωρίς την προσθήκη ουριδινοδιφωσφορογλυκόζης (UDP-Glucose). Το διάλυμα που προκύπτει αφήνεται για 30min. Μετά την επώαση ακολούθησε βρασμός στους 60 °C για 10min σε υδατόλουτρο ώστε να σταματήσει η διαδικασία. Στη συνέχεια προστίθονται τα παρακάτω:

1mM NAD

1U /ml φωσφορογλυκομουτάση (PGM)

1U /ml αφυδογονάση της 6-φωσφορο-γλυκόζης (G6PDH)

Ακολουθεί ανακίνηση των δειγμάτων (vortex). Τα δείγματα αφήνονται να επωασθούν για 15min, χρόνος που ελέγχθηκε ως επαρκής για την παραγωγή του NADH. Τέλος τα δείγματα φωτομετρούνται στα 340nm. Όλες οι φωτομετρήσεις έγιναν με σπεκτροφωτόμετρο UV-160A (Shimadzu).

## **2.7 Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών**

Το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό της ενεργότητας του ενζύμου στις πηκτές έχει δοθεί παραπάνω.

Η ηλεκτροφόρηση των πρωτεϊνών έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% 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.

Μετά το τέλος της παραπάνω διαδικασίας η πηκτή τοποθετήθηκε στα αντίστοιχα διαλύματα επώασης. Στη συνέχεια αφέθηκε για λίγες ώρες μέχρι την εμφάνιση σήματος.

#### **A. Πηκτή ανάλυσης 8%T, 2.7%C**

Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμίδιου, Bis- Ακρυλαμίδιου (30%, 2.7%) 2.87ml

Ρυθμιστικό Διάλυμα Ανάπτυξης 2.50ml

Αποσταγμένο Νερό 4.45ml

10% Υπερθειικό Αμμώνιο 50μl

TEMED 10μl

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης**

378mM Tris-HCl pH 8.9

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

Μητρικό Διάλυμα Ακρυλαμίδιου, Bis- Ακρυλαμίδιου (30%, 2.7%) 1.0ml

Ρυθμιστικό Διάλυμα συσσώρευσης 5.0ml

Αποσταγμένο Νερό 3.76ml

10% Υπερθειικό Αμμώνιο 100μl

TEMED 10μl

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης**

63mM Tris-HCl pH 6.8

#### **Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών**

25mM Tris

192mM γλυκίνη

## **2.8 Η ανοσοβιοχημική μελέτη.**

Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν τομές από ένσπερους και άσπερους καρπούς τομάτας τύπου cherry στα εξής στάδια ανάπτυξης: ανώριμος καρπός διαμέτρου 0,5cm και 1,5cm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή

του χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός. 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% παραφορμαλδεϋδη 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 εμβάπτισεις 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 τουλάχιστον τρεις φορές. Για τον εγκλεισμό των δειγμάτων σε παραφίνη χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικά εκμαγεία, τα οποία τοποθετήθηκαν σε δοχείο με πάγο. Η τοποθέτηση των δειγμάτων

έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε αυτά να έχουν τον επιθυμητό προσανατολισμό. Επίσης μεταφέρθηκε μικρή ποσότητα λιωμένης παραφίνης. Καθώς η παραφίνη έπηξε, και για να αποφευχθεί ο εγκλεισμός φυσαλίδων αέρα, μια πυρακτωμένη ανατομική βελόνα, θέρμαινε την περιοχή γύρω από τους ιστούς.

#### **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.

## **2.9 Ο ανοσοεντοπισμός της UGPάσης.**

Μετά την αποπαραφίνωση ακολουθούνται τα εξής βήματα:

- Οι τομές καλύπτονται με διάλυμα δεσμεύσεως μη ειδικών θέσεων και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 1h.
- Ακολουθεί επώαση των τομών σε 1:500 αραιώση του αντισώματος, 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 αραίωση (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.

#### **Ηλεκτρομεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης**

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

#### **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 UGPάσης (rabbit anti-UGPase) με αραίωση 1:1000. Οι αραιώσεις γίνονται σε TBST 1% ζελατίνης. Επώαση όλη τη νύχτα σε 25°C.
- Ξέπλυμα των ταινιών με TBST 1% ζελατίνης.
- Απομάκρυνση της περίσσειας του πρωτογενούς αντισώματος με 3 φορές επί 5min TBST 1% ζελατίνης.
- Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος mouse anti-rabbit IgG (Fc) AP conjugated σε αραίωση 1:5000 για 1h και 30min.



- Απομάκρυνση της περίσσειας του δευτερογενούς αντισώματος με 3 φορές επί 5min TBST 1% ζελατίνης.
- Ανίχνευση δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης με την επώαση των ταινιών σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης για 3min παρουσία χρωμοφόρου.
- Αφυδάτωση και φύλαξη της νιτροκυτταρίνης μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.
- Φωτογράφιση της νιτροκυτταρίνης μέσω σάρωσής τους με επίπεδο σαρωτή.

#### **Ανοσοεντοπισμός του ενζύμου στις μεμβράνες της νιτροκυτταρίνης**

- Δέσμευση των μη ενεργών θέσεων των τομών για 1h σε 1% ζελατίνη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.
- Επώαση των τομών με διάλυμα αντισώματος rabbit anti-barley UGRάσης σε αραιώση 1:1000 σε TBST 1% BSA στους 4°C για 16h.
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBST 3 φορές επί 5min για την απομάκρυνση του αδέσμευτου πρωτογενούς αντισώματος.
- Εφαρμογή του δευτερογενούς αντισώματος mouse anti-rabbit IgG (Fc) AP conjugated σε αραιώση 1:5000 για 1h και 30min.
- Ξέπλυμα των τομών με διάλυμα TBST 3 φορές επί 5min για την απομάκρυνση του αδέσμευτου δευτερογενούς αντισώματος.
- Εντοπισμός της UGRάσης με NBT/BCIP (66 μl/33μl BCIP σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος ανίχνευσής της).

#### **Έλεγχος αποτελεσματικότητας της ηλεκτρομεταφοράς των πρωτεϊνών:**

- Πριν από τη χρήση της νιτροκυτταρίνης για τον έλεγχο της καταλληλότητας των αντισωμάτων ελέγχθηκε η αποτελεσματικότητα της μεταφοράς της UGRάσης στη νιτροκυτταρίνη. Για το σκοπό αυτό ταινίες νιτροκυτταρίνης επωάστηκαν με το διάλυμα ανίχνευσης ενεργότητας της UGRάσης.
- Παράλληλα, μετά τη μεταφορά των πρωτεϊνών στη νιτροκυτταρίνη ελέγχθηκε η ύπαρξη του ενζύμου στην πηκτή και βρέθηκε ελάχιστη ως μηδαμινή.

#### **Διαλύματα**

##### **Ρυθμιστικό διάλυμα TBST**

20mM Tris HCl pH 7.5

150mM NaCl

0.05% Tween 20

##### **Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης-Ρυθμιστικό διάλυμα3**

10mM Tris-HCl pH 9.5

100mM NaCl

50 mM MgCl<sub>2</sub>

### **Διάλυμα χρωματικής αντίδρασης**

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

### **Διάλυμα ηλεκτρομεταφοράς πρωτεϊνών**

24mM Tris  
192mM γλυκίνη  
20% μεθανόλη

## **2.10 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.

### **Σημαντικά σημεία πριν την αρχή της διαδικασίας.**

1. Σε αυτή τη διαδικασία, μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε νωποί είτε κατεψυγμένοι στους  $-80^{\circ}\text{C}$  ιστοί. Οι ιστοί μπορούν να αποθηκευθούν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για αρκετούς μήνες. Το στάδιο αυτό προϋποθέτει τη χρήση υγρού αζώτου για την άμεση ψύξη του ιστού πριν τη μεταφορά του στους  $-80^{\circ}\text{C}$ . Η απόψυξη των ιστών πρέπει να αποφεύγεται κατά τη διάρκεια της ζύγισης ή του χειρισμού τους πριν τη λειοτριβήση με το ρυθμιστικό διάλυμα RLT. Ομογενοποιημένα λειοτριβήματα των ιστών που έχουν προκύψει από το τέταρτο βήμα που θα περιγραφεί παρακάτω, μπορούν να αποθηκευθούν στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για αρκετούς μήνες. Οι λειοτριβημένοι ιστοί πρέπει να επωασθούν σε θερμόλουτρο στους  $37^{\circ}\text{C}$  μέχρι να ξεπαγώσουν ομοιόμορφα

- και να έχουν διαλυθεί τα άλατα πριν συνεχίσουμε στο πέμπτο βήμα. Η επιμακρόν επώαση πρέπει να αποφεύγεται καθώς μπορεί να διακινδυνεύεται η ακεραιότητα του RNA.
2. Το RNeasy Plant Mini Kit παρέχει δύο επιλογές λυτικών αντιδραστηρίων. Το ρυθμιστικό διάλυμα RLT και το ρυθμιστικό διάλυμα RLC που περιέχουν θειοκυανιδικής γουανιδίνης και υδροχλωρικής γουανιδίνης αντίστοιχα. Στις περισσότερες περιπτώσεις επιλέγεται το ρυθμιστικό διάλυμα RLT εξαιτίας της καλύτερης διάρρηξης των κυττάρων και των ιδιοτήτων μετουσίωσης που του προσδίδει η θειοκυανιδική γουανιδίνη. Παρόλα αυτά, σε μερικές περιπτώσεις που εξαρτώνται από το ποσοστό και το είδος των δευτερογενών μεταβολιτών (όπως η ύπαρξη γαλακτώδους ενδοσπερμίου στον αραβόσιτο), η θειοκυανιδική γουανιδίνη μπορεί να προκαλέσει συμπαγή δομή του δείγματος η οποία καθιστά αδύνατη την εξαγωγή του RNA. Σε αυτές τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα RLC.
  3. Το ρυθμιστικό διάλυμα RLT όταν αποθηκευθεί, μπορεί να σχηματίσει ίζημα. Εάν κρίνεται απαραίτητο επαναδιαλυτοποιούμε με θέρμανση και το τοποθετούμε σε θερμοκρασία δωματίου (15- 25 °C).
  4. Τα ρυθμιστικά διαλύματα RLT, RLC και το RW1 περιέχουν άλατα γουανιδίνης και γι' αυτό δεν είναι συμβατά με απολυμαντικό που περιέχει λευκαντικό.
  5. Όλα τα βήματα της διαδικασίας γίνονται σε συνθήκες θερμοκρασίας δωματίου. Η διαδικασία εκτελείται άμεσα.
  6. Όλα τα στάδια φυγοκέντρησης γίνονται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται μεταξύ 20 και 25°C σε μικροφυγόκεντρο. Η θερμοκρασία της φυγόκεντρου δεν πρέπει να πέσει κάτω από τους 20 °C.
  7. Η β- μερκαπτοαιθανόλη (β- ME) προστίθεται πριν την χρήση στο ρυθμιστικό διάλυμα RLT ή RLC. Πιο συγκεκριμένα, προσθέτουμε 100 μl β- ME ανά 1ml ρυθμιστικού διαλύματος RLT ή RLC. Τα αντιδραστήρια με την β- ME μπορούν να αποθηκευθούν σε θερμοκρασία δωματίου για ένα μήνα.
  8. Το ρυθμιστικό διάλυμα RPE παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν την πρώτη χρήση του προσθέτουμε 4 όγκους αιθανόλης (96- 100%) για να πάρουμε το τελικό διάλυμα που θα χρησιμοποιήσουμε.
  9. Εάν εκτελούμε προαιρετική πέψη DNάσης στην στήλη, οφείλουμε να προετοιμάσουμε το διάλυμα DNάση I stock.

### **Διαδικασία.**

1. Η ζύγιση καθορίζει την ποσότητα του φυτικού υλικού που όμως δεν πρέπει να ξεπερνά τα 200 mg.
2. Ο ζυγισμένος ιστός τοποθετείται άμεσα σε υγρό άζωτο όπου και λειοτριβείται. Η σκόνη που προκύπτει αποθηκεύεται σε σωλήνα μικροφυγοκέντρησης 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 έως ότου επιτευχθεί άμεση ψύξη του ιστού σε υγρό άζωτο).
3. Προστίθενται 450 μl ρυθμιστικό διάλυμα RLT ή RLC μέχρι το μέγιστο των 200mg λειοτριβημένου 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 λειοτριβημένοι ιστοί μεταφέρονται σε μια στήλη QIAshredder spin (μωβ) που είναι τοποθετημένη σε ένα σωλήνα συλλογής των 2ml και φυγοκεντρείται για 2min σε μεγάλη ταχύτητα. Το υπερκείμενο της στήλης μεταφέρεται προσεκτικά σε ένα μικρό σωλήνα 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 650μl), μεταφέρεται μαζί με το ίζημα που έχει σχηματιστεί σε μια στήλη RNeasy spin (ροζ) που είναι τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής των 2ml. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 15s σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 8000\*g (10000rpm). Αφαιρείται το διήθημα.
7. Προστίθενται 700μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1 στη στήλη RNeasy spin. Φυγοκεντρούμε για 15s σε ταχύτητα μεγαλύτερη ή ίση των 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 μετά την ηλεκτροφόρηση (ηλεκτροφόρηση του μετουσιωμένου δείγματος, TAE βλέπε παρακάτω) παρατηρήθηκε 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 MgSO<sub>4</sub> και 10mM CaCl<sub>2</sub>.

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 H<sub>2</sub>O 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 100μl 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 erpendorf για 5min, για να εξατμιστεί η αιθανόλη.

Επαναδιαλύουμε σε 20μl dd αποστειρωμένο H<sub>2</sub>O

Μετά την αντίδραση PCR και την ηλεκτροφόρηση TAE, η παρουσία μόνο των εκκινητών της ουμπικουτίνης δείχνει 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 Tank ρυθμιστικό διάλυμα**

2M Tris-Οξικό

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 H<sub>2</sub>O

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

## 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 τμήματα του RNA που περιέχουν ουρά πολυ-A (mRNA). Σε σωλήνα PCR (200μl), τοποθετούμε:

- 1) 10μl δείγματος καθαρού RNA
- 2) 5,7μl dd H<sub>2</sub>O
- 3) 1μl εκκινητή ολιγο- (dT)
- 4) Επωάζουμε το μείγμα σε 65°C για 5min
- 5) Αφήνουμε το μείγμα για 10min ώστε να έρθει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και μετά προσθέτω τα εξής:  
2μl 10X Ρυθμιστικό Διάλυμα AffinityScript RT  
0,8μl μείγμα dNTPs  
0,5μl παρεμποδιστή RNάσης  
1μl 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.

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

Οι αντιδράσεις Real time PCR, πραγματοποιήθηκαν στην Stratagene MX 3005P, χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια της Kapa Biosystems. Κάθε σωλήνας περιείχε 2μl cDNA, ποσοτικοποιημένο και αραιωμένο (περίπου 100ng), ενώ προστίθενται και τα αντιδραστήρια με τις αναλογίες που προτείνονται από την εταιρία Kapa Biosystems. Κάθε σωλήνας περιείχε:

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

Τα βήματα της αντίδρασης ήταν:

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

Τα βήματα 2 και 4 επαναλαμβάνονται 45 φορές.

5. 1min 95°C Το στάδιο αυτό και τα επόμενα πραγματοποιούνται για την απομάκρυνση μη εξειδικευμένα διμερή που σχηματίζουν οι εκκινητές.
6. 30sec 55°C
7. 30sec 95°C
8. Τελική φάση αντίδρασης 3min 25°C



Ως ένζυμο αναφοράς τόσο για την ημιποσοτική όσο και για την πραγματικού χρόνου αντίδραση πολυμεράσης ήταν η Ουμπικουτίνη.

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν τόσο για την ημιποσοτική όσο και για την πραγματικού χρόνου αντίδραση πολυμεράσης ήταν:

Ένζυμο	Ανοδικός εκκινητής	Καθοδικός Εκκινητής
<b>UGPase</b>	AGC GGC CAG ATT TAG TTT AG	CCT CCA TTG AGC TTC AGG AC
<b>Ubicuitine</b>	AGG ATG GAA GGA CTC TGG CG	TCA CAA CAC ATC ACA AGG TG

Η σχετική έκφραση του γονιδίου υπολλογίστηκε με τον τύπο

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

όπου  $\text{eff}$  = αποτελεσματικότητα της αντίδρασης, που υπολογίζεται από τα αποτελέσματα της αντίδρασης και μέσω του προγράμματος LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003).

### **3. Αποτελέσματα.**

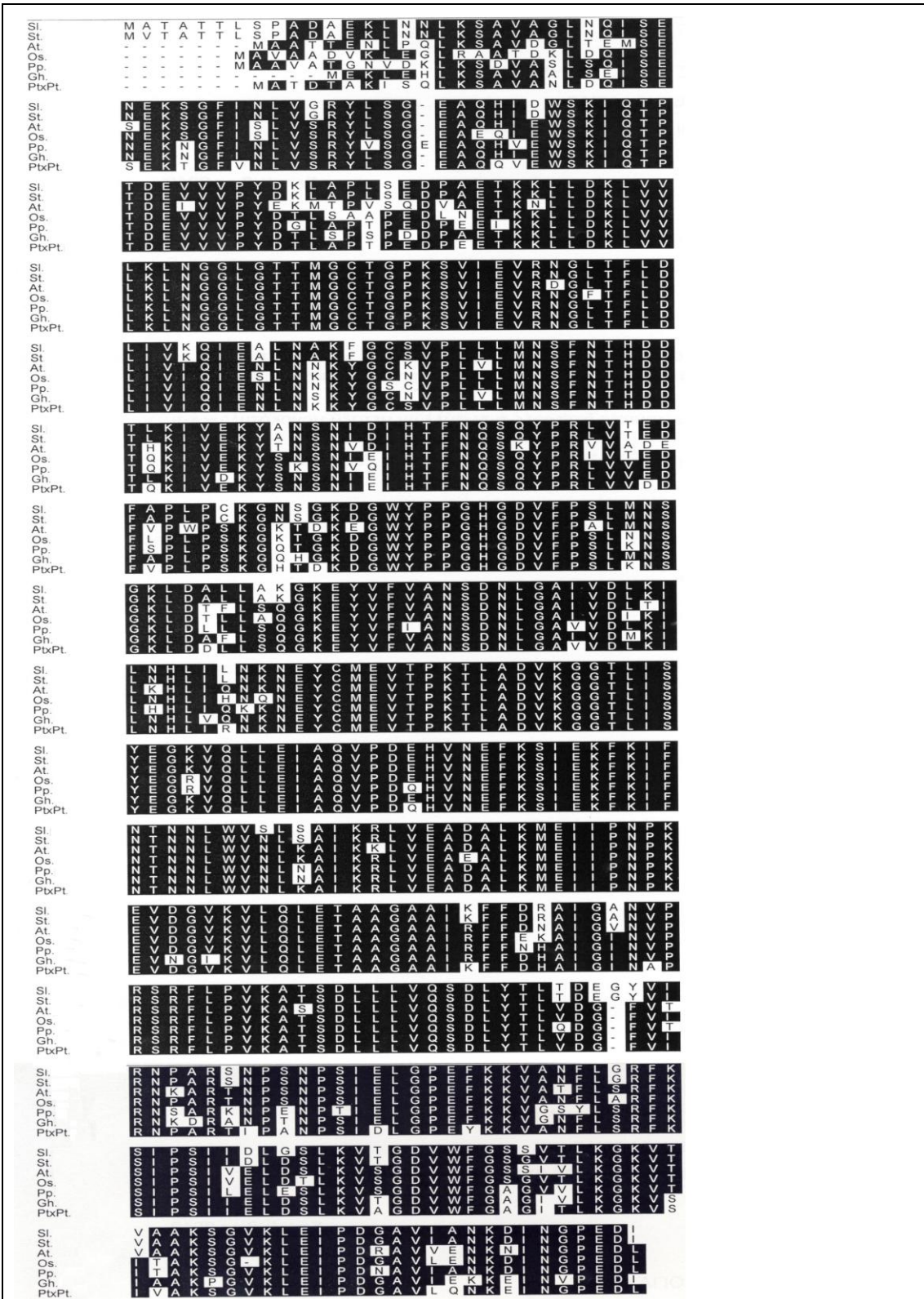
### 3.1 Χαρακτηρισμός cDNA κλώνων που κωδικοποιούν την UGRάση στην τομάτα.

Η έρευνα με τον αλγόριθμο BLAST (Altschul *et al.*, 1997) 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 UGRάση.

Η σύγκριση των αμινοξικών ακολουθιών της UGRάσης στην τομάτα (*Solanum lycopersicon*), με άλλες ήδη χαρακτηρισμένες αμινοξικές ακολουθίες φυτικών UGRασών (Πίνακας 3.1) έδειξε 99,2%, 83,2%, 85,1%, 83,0%, 86,7% και 85,3% ομολογία με τις αμινοξικές ακολουθίες των *Solanum tuberosum*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Pyrus pyrifolia*, *Gossypium hirsutum* και ενός υβριδίου λεύκας (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*) αντίστοιχα (Εικόνα 3.1).

		Ποσοστό Ομοιότητας %							
		1	2	3	4	5	6	7	
Sl	1	■	99.2	83.2	85.1	83.0	86.7	85.3	1
St	2	0.8	■	83.4	85.7	83.4	87.3	85.9	2
At	3	19.1	18.9	■	83.3	82.1	84.5	83.8	3
Os	4	16.7	15.9	18.9	■	84.4	86.0	86.8	4
Pp	5	19.4	18.8	20.5	17.5	■	86.2	87.0	5
Gh	6	14.7	13.9	17.4	15.5	15.2	■	87.7	6
PtxPt	7	16.4	15.6	18.3	14.6	14.3	13.4	■	7
		1	2	3	4	5	6	7	

**Πίνακας 3.1.** Το ποσοστό ομοιότητας των αμινοξικών ακολουθιών που προκύπτουν από τη σύγκριση της UGRάσης μεταξύ των φυτών της τομάτας (Sl) και της πατάτας (St), του *Arabidopsis thaliana* (At), του ρυζιού (Os), της αχλαδιάς (Pp), του βαμβακιού (Gh) και ενός υβριδίου λεύκας (PtxPt).



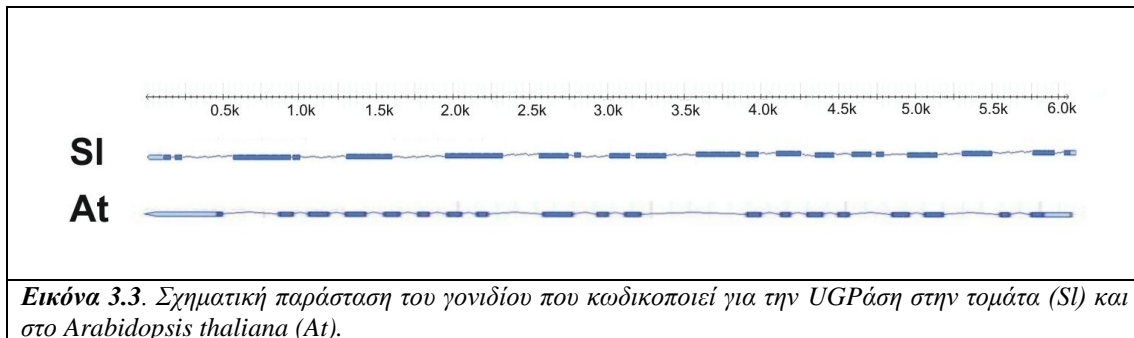
**Εικόνα 3.1.** Η προσδιορισμένη αμινοξική ακολουθία της UGPάσης στην τομάτα (SI) εθυγραμμίστηκε με τις ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες της UGPάσης στην πατάτα (St), του *Arabidopsis thaliana* (At), του ρυζιού (Os), του *Pyrus pyrifolia* (Pp), του βαμβακιού (Gh) και ενός υβριδίου λέκας (PtxPt). Τα μαύρα πλαίσια υποδηλώνουν συντηρημένα αμινοξέα στην πλειοψηφία των αμινοξικών αλληλουχιών.

Η πλήρης νουκλεοτιδική αλυσίδα (TC201548) του γονιδίου μετά τη μετάφρασή της, χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό UGRασών της τομάτας όπου και εντοπίστηκαν τρεις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (ak327004, ak322946, ak321564). Σε αμινοξικό επίπεδο οι αλληλουχίες ak327004 και ak322946 παρουσιάζουν 100% ομοιότητα ενώ η ak321564 κατέδειξε την παρουσία κενού μεταξύ των αμινοξέων στις θέσεις 153-168 (Εικόνα 3.2).

ak327004 ak322946 ak 321564	M A T A T T L S P A D A E K L N N L K S A V A G L N Q I S E M A T A T T L S P A D A E K L N N L K S A V A G L N Q I S E M A T A T T L S P A D A E K L N N L K S A V A G L N Q I S E
ak327004 ak322946 ak 321564	N E K S G F I N L V G R Y L S G E A Q H I D W S K I Q T P T N E K S G F I N L V G R Y L S G E A Q H I D W S K I Q T P T N E K S G F I N L V G R Y L S G E A Q H I D W S K I Q T P T
ak327004 ak322946 ak 321564	D E V V V P Y D K L A P L S E D P A E T K K L L D K L V V L D E V V V P Y D K L A P L S E D P A E T K K L L D K L V V L D E V V V P Y D K L A P L S E D P A E T K K L L D K L V V L
ak327004 ak322946 ak 321564	K L N G G L G T T M G C T G P K S V I E V R N G L T F L D L K L N G G L G T T M G C T G P K S V I E V R N G L T F L D L K L N G G L G T T M G C T G P K S V I E V R N G L T F L D L
ak327004 ak322946 ak 321564	I V K Q I E A L N A K F G C S V P L L L M N S F N T H D D T I V K Q I E A L N A K F G C S V P L L L M N S F N T H D D T I V K Q I E A L N A K F G C S V P L L L M N S F N T H D D T
ak327004 ak322946 ak 321564	L K I V E K Y A N S N I D I H T F N Q S Q Y P R L V T E D F L K I V E K Y A N S N I D I H T F N Q S Q Y P R L V T E D F L K - - - - - - - - - - - - - - - - - - S Q Y P R L V T E D F
ak327004 ak322946 ak 321564	A P L P C K G N S G K D G W Y P P G H G D V F P S L M N S G A P L P C K G N S G K D G W Y P P G H G D V F P S L M N S G A P L P C K G N S G K D G W Y P P G H G D V F P S L M N S G
ak327004 ak322946 ak 321564	K L D A L L A K G K E Y V F V A N S D N L G A I V D L K I L K L D A L L A K G K E Y V F V A N S D N L G A I V D L K I L K L D A L L A K G K E Y V F V A N S D N L G A I V D L K I L
ak327004 ak322946 ak 321564	N H L I L N K N E Y C M E V T P K T L A D V K G G T L I S Y N H L I L N K N E Y C M E V T P K T L A D V K G G T L I S Y N H L I L N K N E Y C M E V T P K T L A D V K G G T L I S Y
ak327004 ak322946 ak 321564	E G K V Q L L E I A Q V P D E H V N E F K S I E K F K I F N E G K V Q L L E I A Q V P D E H V N E F K S I E K F K I F N E G K V Q L L E I A Q V P D E H V N E F K S I E K F K I F N
ak327004 ak322946 ak 321564	T N N L W V S L S A I K R L V E A D A L K M E I I P N P K E T N N L W V S L S A I K R L V E A D A L K M E I I P N P K E T N N L W V S L S A I K R L V E A D A L K M E I I P N P K E
ak327004 ak322946 ak 321564	V D G V K V L Q L E T A A G A A I K F F D R A I G A N V P R V D G V K V L Q L E T A A G A A I K F F D R A I G A N V P R V D G V K V L Q L E T A A G A A I K F F D R A I G A N V P R
ak327004 ak322946 ak 321564	S R F L P V K A T S D L L L V Q S D L Y T L T D E G Y V I R S R F L P V K A T S D L L L V Q S D L Y T L T D E G Y V I R S R F L P V K A T S D L L L V Q S D L Y T L T D E G Y V I R
ak327004 ak322946 ak 321564	N P A R S N P S N P S I E L G P E F K K V A N F L G R F K S N P A R S N P S N P S I E L G P E F K K V A N F L G R F K S N P A R S N P S N P S I E L G P E F K K V A N F L G R F K S
ak327004 ak322946 ak 321564	I P S I I D L G S L K V T G D V W F G S S V T L K G K V T V I P S I I D L G S L K V T G D V W F G S S V T L K G K V T V I P S I I D L G S L K V T G D V W F G S S V T L K G K V T V
ak327004 ak322946 ak 321564	A A K S G V K L E I P D G A V I A N K D I N G P E D I A A K S G V K L E I P D G A V I A N K D I N G P E D I A A K S G V K L E I P D G A V I A N K D I N G P E D I

**Εικόνα 3.2** Παρουσιάζονται οι αλληλουχίες ak327004, ak322946 και ak321564 που κωδικοποιούν για το γονίδιο της UGRάσης στην τομάτα (*Solanum lycopersicum*). Τα μαύρα πλαίσια υποδηλώνουν συντηρημένα αμινοξέα στην πλειοψηφία των αμινοξικών αλληλουχιών. Από τη μελέτη της εικόνας φαίνεται η 100% αμινοξική ταυτοποίηση των ak327004 και ak322946 ενώ στην ak321564 παρατηρείται ένα κενό μεταξύ των αμινοξέων στις θέσεις 153- 168.

Ακολουθως, έρευνα στη βάση δεδομένων SOL Genomics αποκάλυψε την ύπαρξη bac κλώνου (SL2.30sc3748) ο οποίος κωδικοποιεί το γονίδιο της UGRάσης. Από την εξέταση του γονιδίου προέκυψε ότι το γονίδιο που κωδικοποιεί την UGRάση περιλαμβάνει 20 εξόνια και αποτελείται από 6.151 νουκλεοτίδια. Επίσης, έρευνα στη βάση δεδομένων TAIR για τη δομή του AT3G03250 του γονιδίου της UGRάσης στο *Arabidopsis thaliana*, έδειξε πως σε αυτό το φυτό αποτελείται από 19 εξόνια και 4.254 νουκλεοτίδια (**Εικόνα 3.3**).



Μετά την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας προσπαθήσαμε να σχεδιάσουμε διαφορετικούς εκκινήτες για την ak327004 και την ak321564 που παρουσίαζε το κενό. Αυτό αποδείχτηκε μή εφικτό δεδομένου ότι όλοι οι αξιόπιστοι εκκινήτες υβρίδιζαν και με τις δύο αλληλουχίες και έτσι σχεδιάσαμε εκκινήτες σε κοινή περιοχή των αλληλουχιών, ώστε να καταγράψουμε μετά από PCR την έκφραση όλων των αλληλουχιών (**Εικόνα 3.4**).



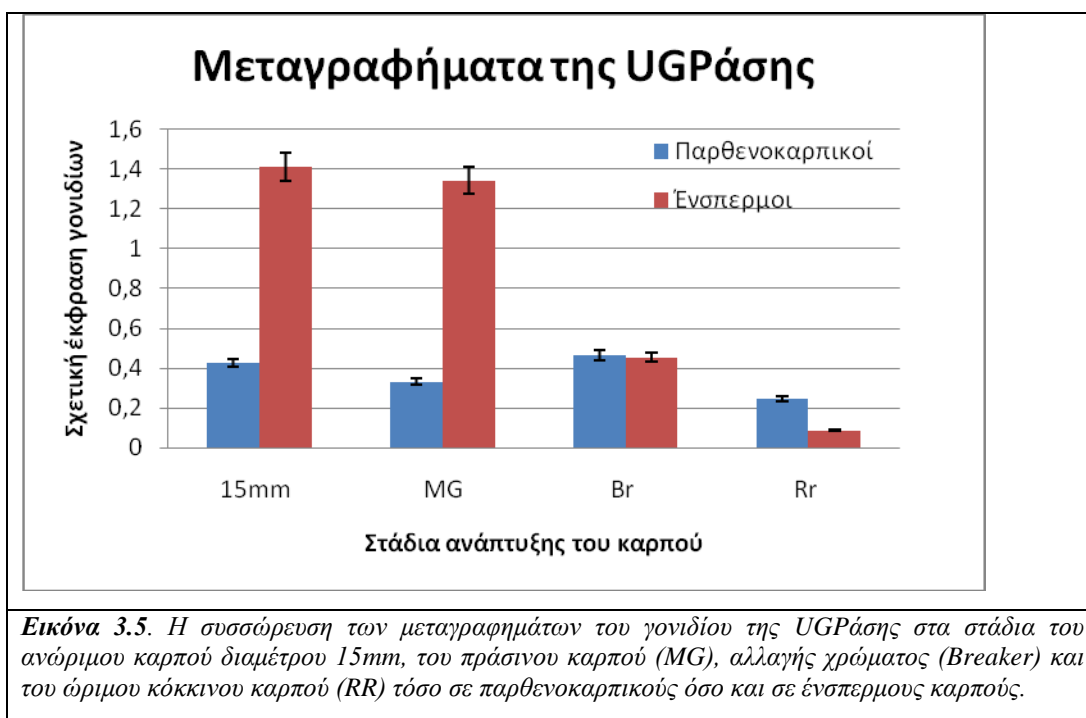
10 20 30 40 50  
 ATGGCTACTGCTACTACTCTCTCTCCTGCTGATGCTGAAAAGCTCAACAA  
 CCTCAAATCTGCCGTCGCCGGTCTAAATCAAATCAGTGAAAATGAGAAAT  
 CTGGATTTATTAACCTTGTCCGGTCGCTATCTAAGTGGTGAAGCACAACAC  
 ATTGACTGGAGTAAGATCCAGACGCCAACTGATGAAGTTGTGGTGCCTTA  
 TGACAAGTTAGCACCTCTTTCTGAAGATCCCGCGGAACTAAGAAGCTTT  
 260 270 280 290 300  
 TGGACAAACTTGTGTCTGAAAGCTCAATGGAGGCTTGGGAACAACAATG  
 GGATGCACGGTCCCAAATCAGTTATTGAAGTTCGTAATGGTTTGACATT  
 CCTTGACTTGATTGTCAAGCAAATTGAGGCACTCAATGCCAAGTTCGGAT  
 GCAGTGTCCCCTGCTTTTGATGAATTCGTTCAACACCCACGATGATACA  
 CTGAAGATTGTTGAAAAATATGCAAACCTCAAACATTGATATTTCATACATT  
 510 520 530 540 550  
 CAATCAGAGCCAGTACCCTCGCCTGGTACTGAAGACTTTGCCCCACTTC  
 CATGCAAAGCAATTCCGGAAAAGATGGATGGTACCCTCCAGGTCATGGT  
 GATGTTTTCCCTTCTTTGATGAATAGTGGAAAGCTTGTGCACTACTAGC  
 AAAGGGCAAGGAATATGTCTTTGTTGCAAACCTCTGATAATTTGGGCGCCA  
 TTGTTGATTTGAAAATCTTAAATCATTGATCCTAAACAAAAATGAGTAC  
 760 770 780 790 800  
 TGCATGGAGGTTACTCCCAAACCTTAGCTGATGTCAAAGGTGGCACCTT  
 AATCTCATATGAAGGAAAAGTACAGCTATTGGAAATAGCACAAGTCCCTG  
 ATGAACATGTCAATGAATTCAGTCAATTGAAAAATTCAAAATTTTCAAC  
 ACCAACAACCTTGTGGGTGAGTCTTAGTGCTATTAAAAGACTTGTAGAAGC  
 AGATGCACTCAAGATGGAGATTATTCCCAACCCAAAGGAAGTAGACGGAG  
 1010 1020 1030 1040 1050  
 TTAAAGTCTTCAACTTGAAACTGCTGCCGGTGTGCGATTAAAGTTTTTC  
 GACCGGGCAATTGGTGCTAATGTTCCCTCGATCTCGTTTCCTTCCCGTGAA  
 AGCAACTTCAGATTTGCTCCTTGTTCAGTCTGATCTTACACCTTGACTG  
 ATGAGGGCTATGTCATCCGAAACCCGGCCAGGTCTAATCCGTCCAACCCA  
 TCCATCGAGTTAGGACCTGAATTCAAGAAGGTGGCCAACTTCTTAGGCCG  
 1260 1270 1280 1290 1300  
 TTTCAAGTCCATTCACGATCATTTGATCTAGGTAGCTTGAAGGTGACCG  
 GTGATGTATGGTTTGGATCTAGCGTTACCCTAAAGGGGAAAGTACTGTT  
 GCAGCCAAATCCGGAGTGAAGCTAGAAATTCAGATGGTGTGTGATTGC  
 AAACAAGGACATCAATGGACCTGAGGATATATAG 1434

**Εικόνα 3.4.** Σχεδιασμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ορθόδρομου εκκινήτη (5'-AGCGGCCAGATTTAGT TTAG-3') και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας οπισθόδρομου εκκινήτη (5'-CCTCCATTGAGCTTCA GGAC-3')

### 3.2 Η έκφραση του γονιδίου της UGRάσης στα διάφορα στάδια ανάπτυξης παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας.

Προκειμένου να μελετηθεί η εμπλοκή της UGRάσης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια της τομάτας τόσο σε ένσπερμους όσο και σε παρθενοκαρπικούς καρπούς, προσδιορίστηκε η συσσώρευση των μεταγραφημάτων του γονιδίου της UGRάσης μέσω RT-PCR. Απομονώθηκε ολικό RNA (βλ. Υλικά και Μέθοδοι κεφ. 2.10) και χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της Real time PCR. Οι ποσότητες του ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση, κανονικοποιήθηκαν με βάση την ενίσχυση τμήματος ενός σταθερής έκφρασης γονιδίου (house keeping) της ουβικουΐνης (Ubiquitin), το οποίο εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της τομάτας.

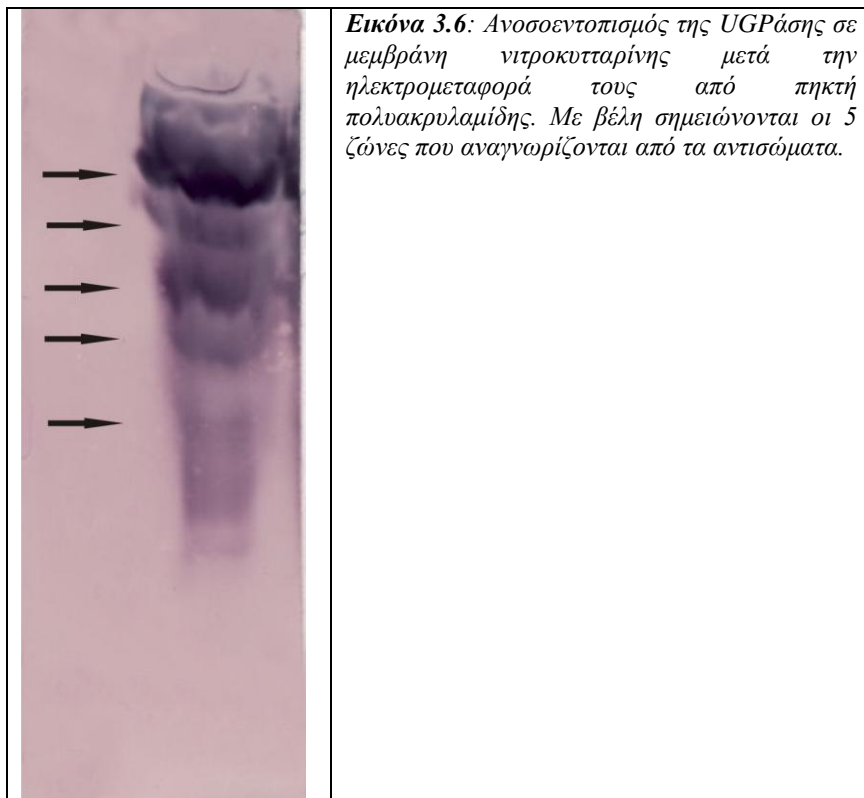
Από τα αποτελέσματα της RT-PCR (Εικόνα 3.5), φαίνεται το πλήθος των μεταγραφημάτων της UGRάσης. Στους καρπούς 15mm και MG το πλήθος των μεταγραφημάτων ήταν μεγαλύτερο στους ένσπερμους σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Στη συνέχεια, στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος παρατηρείται ότι το πλήθος των μεταγραφημάτων των ένσπερμων και μη καρπών βρέθηκε συγκρίσιμο. Τέλος, στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού (RR) τα μεταγραφήματα ήταν αφθονότερα στους παρθενοκαρπικούς καρπούς.





### 3.3 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων.

Τα αποτελέσματα της ανοσοανίχνευσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καρπού τομάτας cherry στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού μετά την ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης φαίνονται στην **Εικόνα 3.6**. Τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα κατά της UGRάσης αναγνώρισαν πέντε πεπτίδια (βέλη).

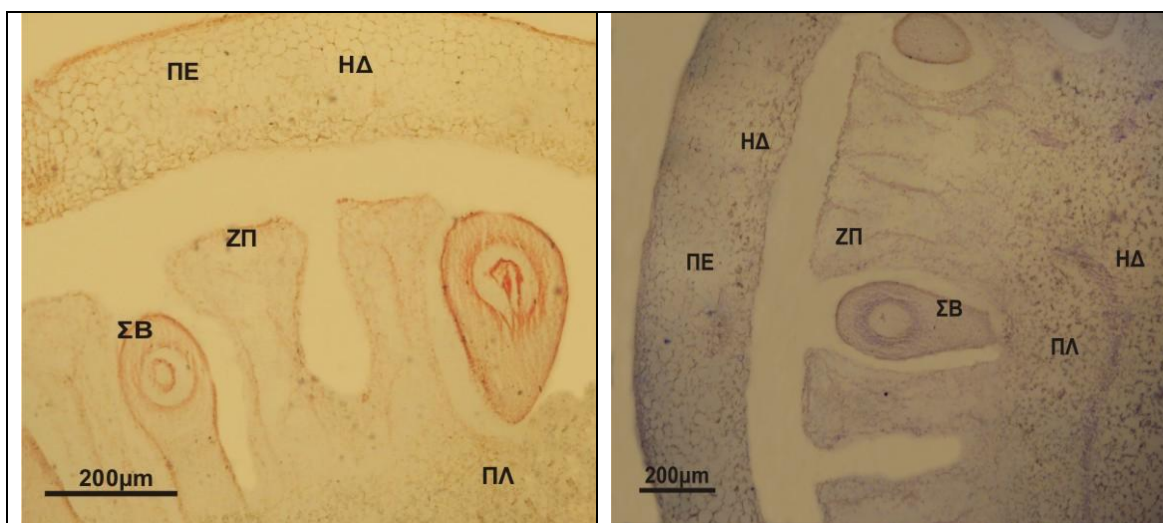


### 3.4 Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης.

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

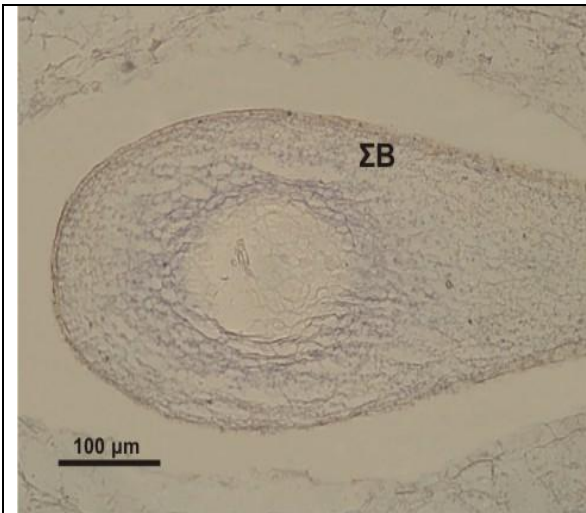
#### 3.4.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm.

Σε εγκάρσιες τομές στο στάδιο των 5mm του ένσπερμου (**Εικόνες 3.7- 3.10**) και παρθενοκαρπικού (**Εικόνες 3.11- 3.14**) ανώριμου καρπού βρέθηκε πως το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες, στον πλακούντα καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Λιγότερο έντονο είναι το σήμα στην περιοχή του ζελατινώδους παρεγχύματος και στα κύτταρα του περικαρπίου.



**Εικόνα 3.7:** Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη.

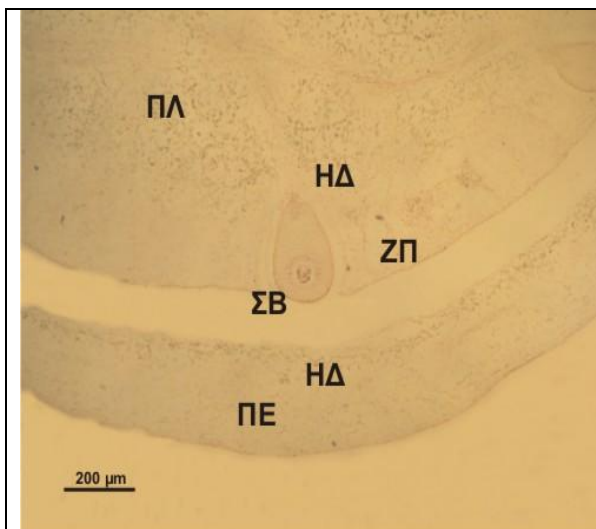
**Εικόνα 3.8:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στις σπερματικές βλάστες (ΣΒ) καθώς, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και τον πλακούντα (ΠΛ) και λιγότερο στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος (ΖΠ) και στα κύτταρα του περικαρπίου (ΠΕ)..



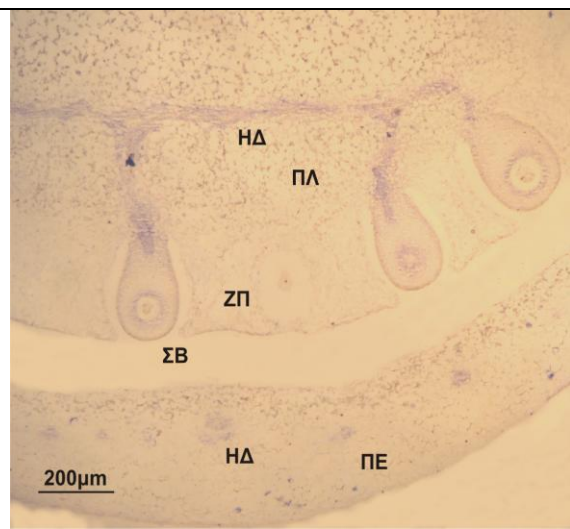
**Εικόνα 3.9:** Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της UGRάσης σε σπερματική βλάστη ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΣΒ, σπερματικές βλάστες.



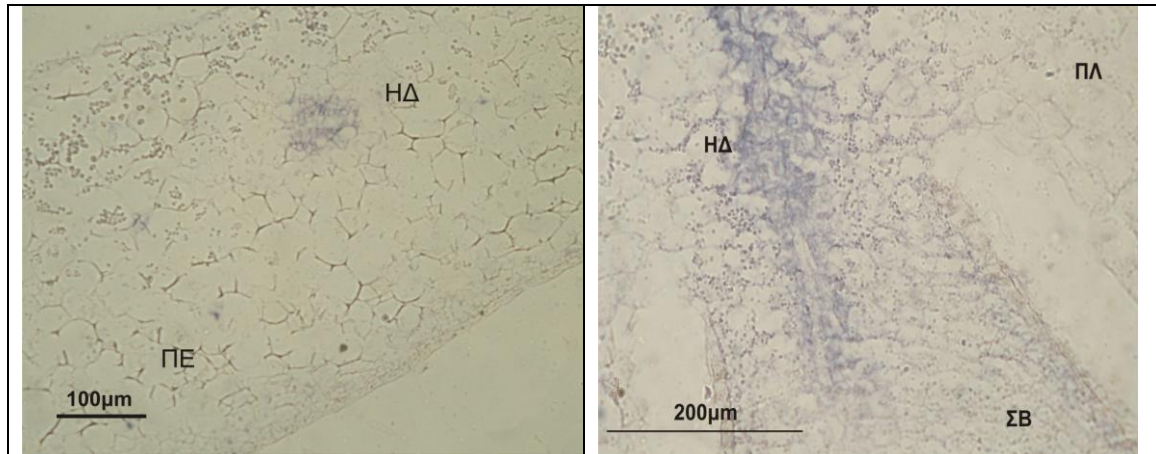
**Εικόνα 3.10:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΠΕ, περικάρπιο, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδες.



**Εικόνα 3.11:** Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 5mm. Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΣΒ, σπερματικές βλάστες, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΛ, πλακούντα, ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΠΕ, περικάρπιο.



**Εικόνα 3.12:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε παρθενοκαρπικό ανώριμο καρπό διαμέτρου 5mm. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στις σπερματικές βλάστες (ΣΒ) στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και τον πλακούντα (ΠΛ). Λιγότερο εντονο είναι το σήμα στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος (ΖΠ) και του περικαρπίου (ΠΕ).

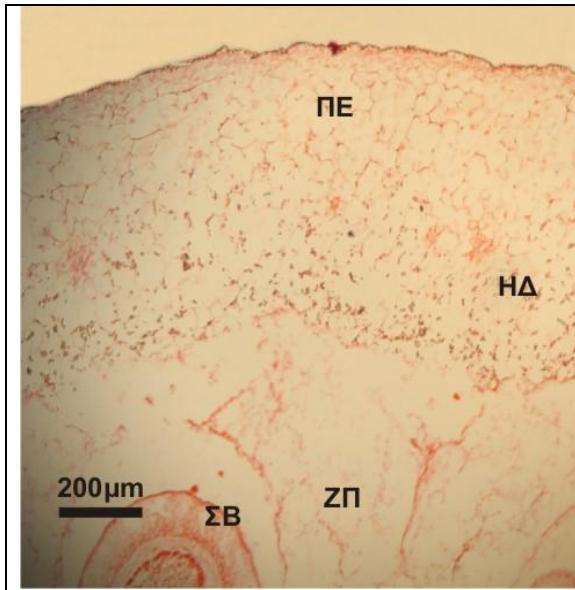


**Εικόνα 3.13:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε παρθενοκαρπικό ανώριμο καρπό διαμέτρου 5mm σε μεγέθυνση. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ). Στα κύτταρα του περικαρπίου (ΠΕ) η παρουσία του ενζύμου ήταν μικρότερη.

**Εικόνα 3.14:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε παρθενοκαρπικό ανώριμο καρπό διαμέτρου 5mm σε μεγέθυνση. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ).

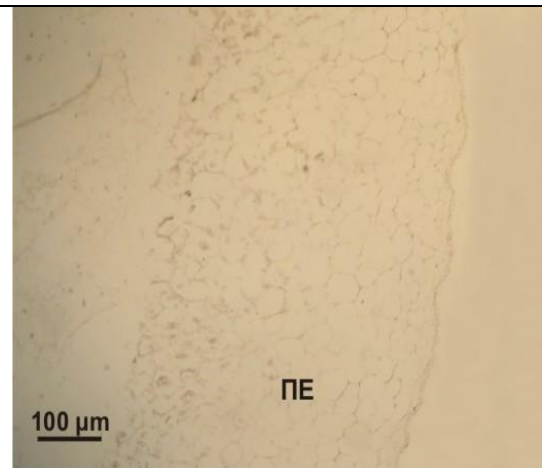
### 3.4.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm

Στο στάδιο του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Ασθενέστερο ήταν το σήμα στα κύτταρα του περικαρπίου, του πλακούντα και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (Εικόνες 3.15- 3.22).



**Εικόνα 3.15:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη.

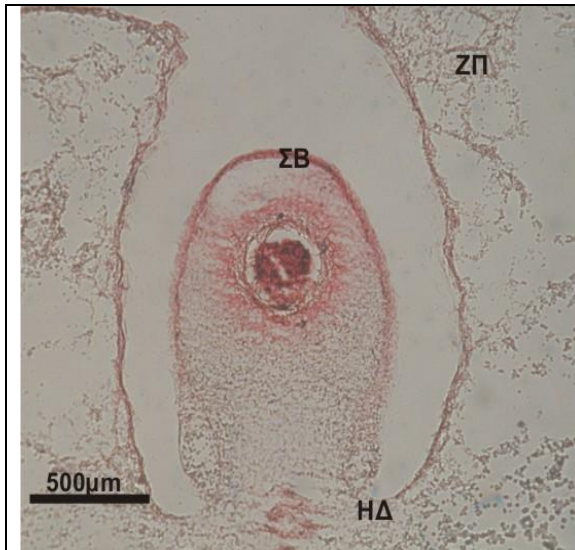
**Εικόνα 3.16:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη.



**Εικόνα 3.17:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 15mm. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΣΒ, σπερματικές βλάστες, ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα.

**Εικόνα 3.18:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΠΕ, περικάρπιο.

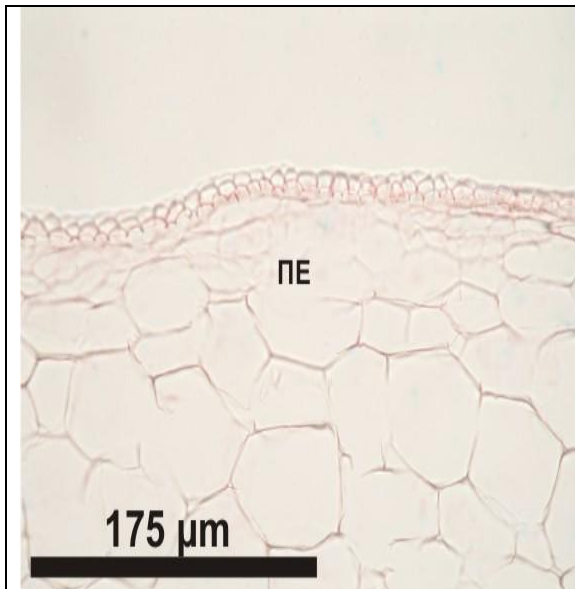




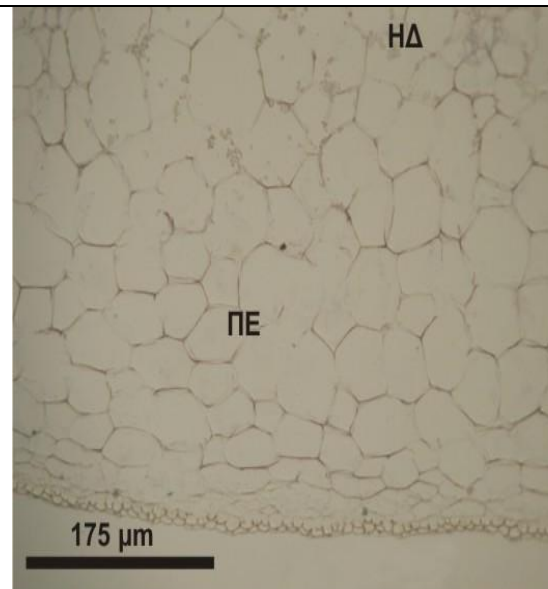
**Εικόνα 3.19:** Μάρτυρας που επώαστηκε με ορμόνη κορνελίου προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΖΠ, ζελατινώδεις παρεγγύματα, ΣΒ, σπερματικές βλάστες, ΗΔ, ηθμαγγειώδεις δεσμίδες.



**Εικόνα 3.20:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης 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) και λιγότερο στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγγύματος (ΖΠ)



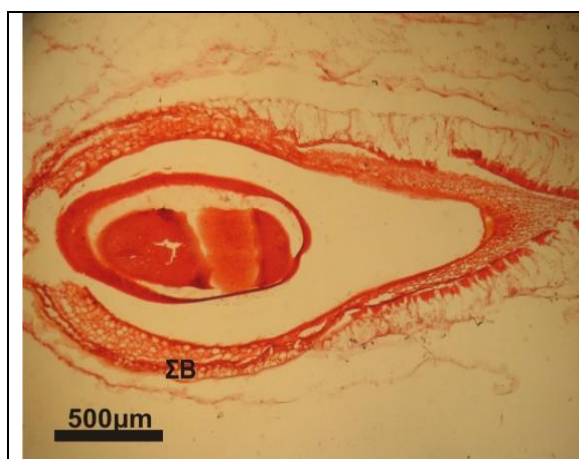
**Εικόνα 3.21:** Μάρτυρας που επώαστηκε με ορμόνη κορνελίου προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΠΕ, περικάρπιο



**Εικόνα 3.22:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε παρθενοκαρπικό καρπό διαμέτρου 15mm σε μεγέθυνση. Το σήμα είναι ελάχιστο.

### 3.4.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού

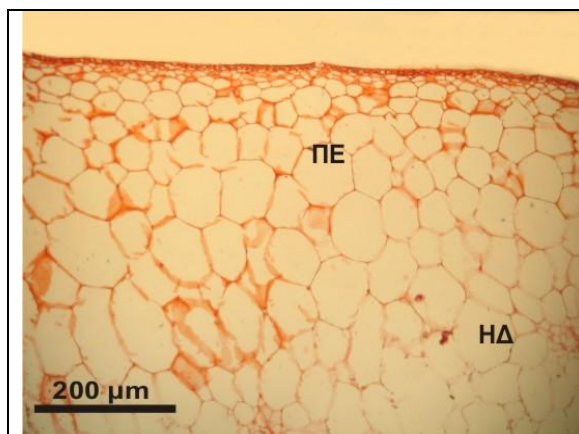
Κατά το στάδιο του ώριμου ένσπερμου πράσινου καρπού η UGRάση εντοπίστηκε κυρίως στους ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου (**Εικόνες 3.23- 3.26**) καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Στον παρθενοκαρπικό πράσινο ώριμο καρπό η παρουσία του ενζύμου εντοπίστηκε στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στα κύτταρα της σπερματικής βλάστης (**Εικόνες 3.27- 3.30**). Και στις δύο περιπτώσεις η UGRάση εντοπίστηκε στο περικάρπιο και ιδιαίτερα στο εσωτερικό τμήμα αυτού.



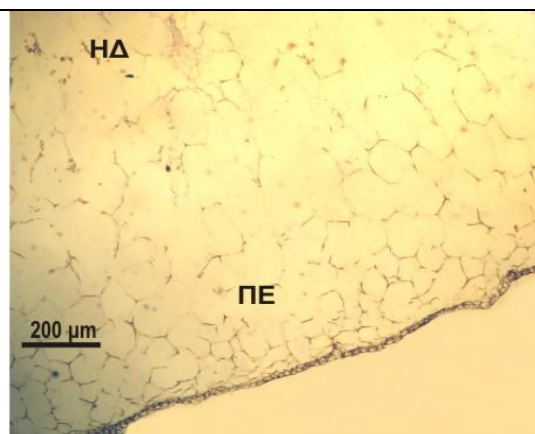
**Εικόνα 3.23:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΣΒ, σπερματική βλάστη.



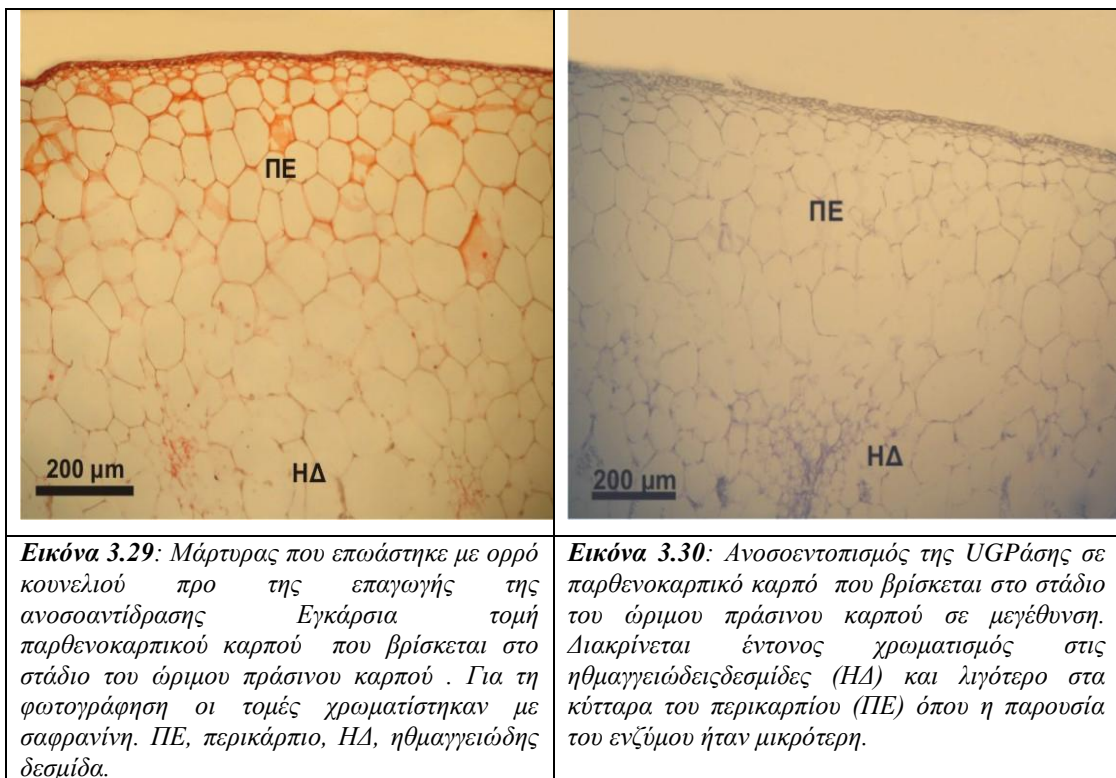
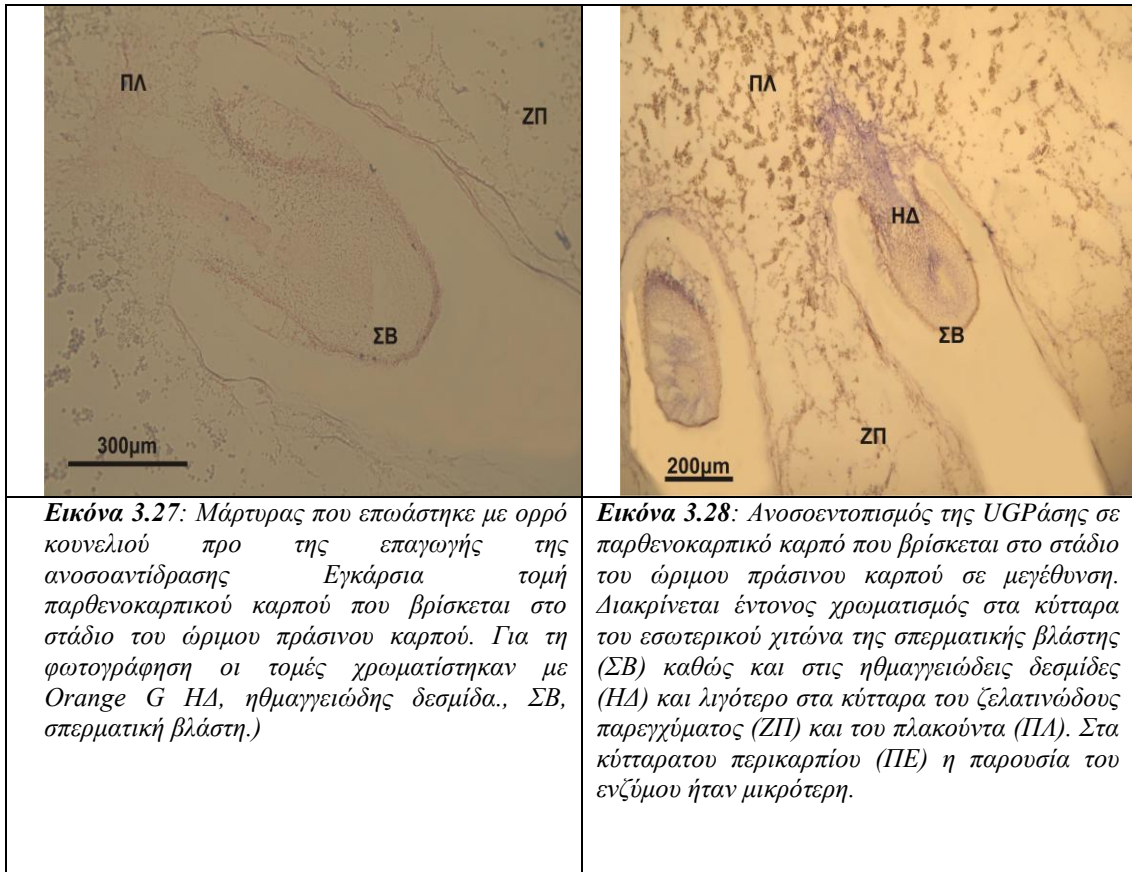
**Εικόνα 3.24:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΣΒ, σπερματικές βλάστη, ΕΝ, ενδοσπέρμιο, Ρ, εμβρυακή ρίζα.



**Εικόνα 3.25:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΠΕ, περικάρπιο, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα.



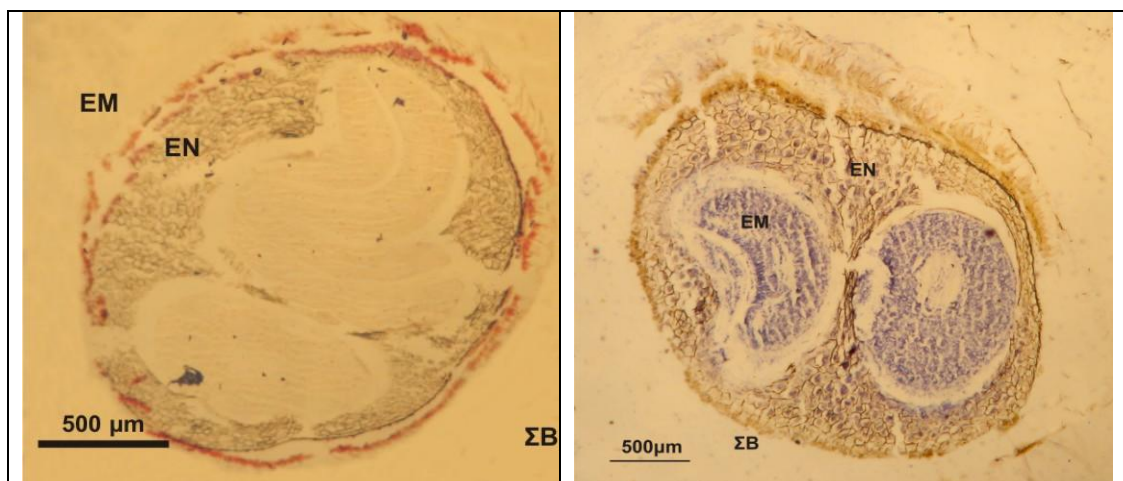
**Εικόνα 3.26:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού. Το σήμα εντοπισμού είναι ελάχιστο. ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα., ΠΕ, περικάρπιο.





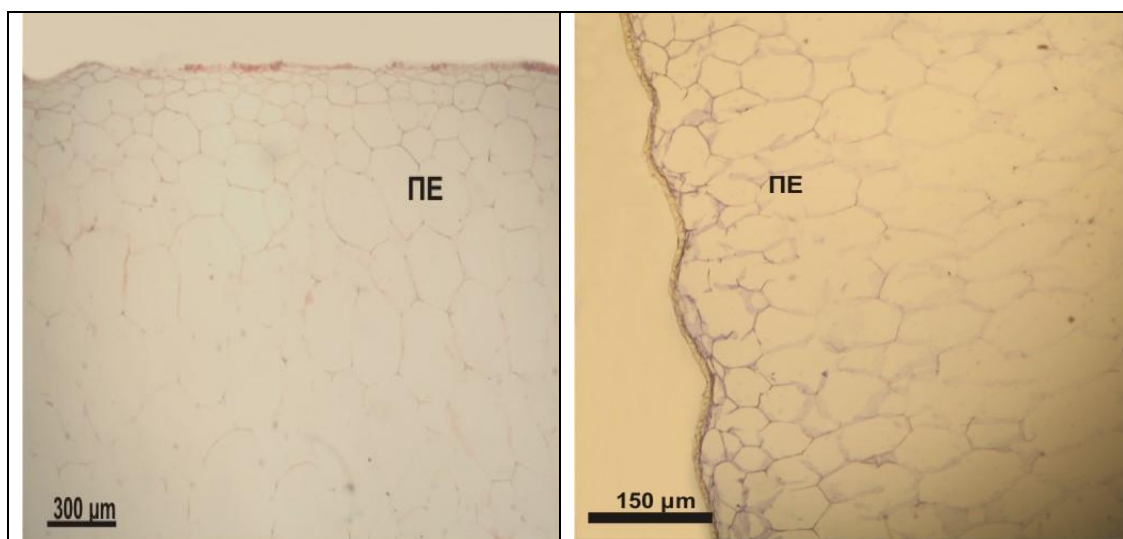
### 3.4.4 Στάδιο αλλαγής χρώματος

Στον κανονικό καρπό κατά το στάδιο της αλλαγής χρώματος η UGRάση εντοπίστηκε κυρίως στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου σπέρματος (**Εικόνες 3.31- 3.34**). Αντίθετα, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η πρωτεΐνη εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (**Εικόνες 3.35- 3.38**).



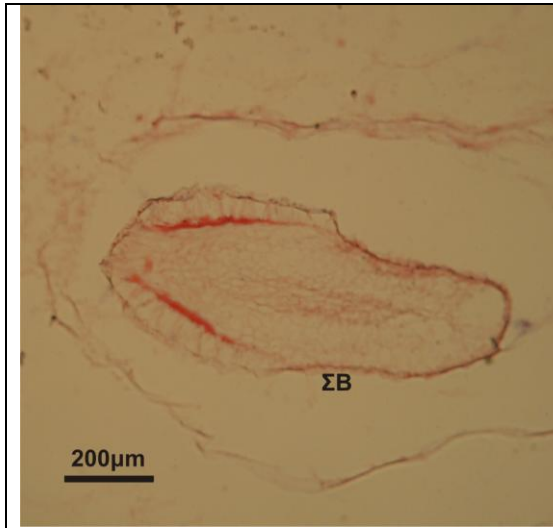
**Εικόνα 3.31:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΣΒ, σπερματικές βλάστες, EM, έμβρυο, EN, ενδοσπέρμιο.

**Εικόνα 3.32:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΣΒ, σπερματικές βλάστες, EM, έμβρυο, EN, ενδοσπέρμιο.

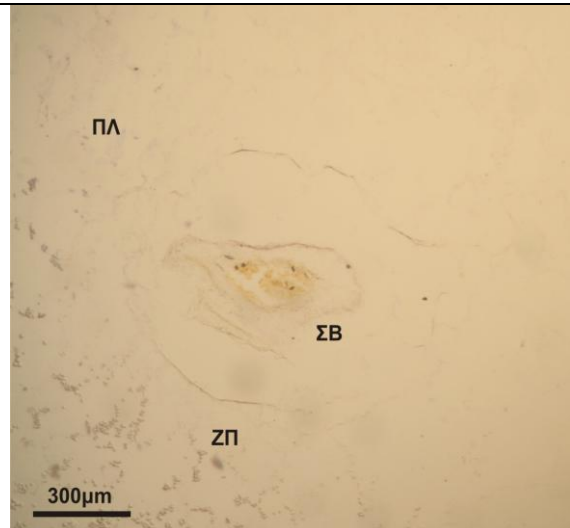


**Εικόνα 3.33:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης. Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΠΕ, περικάρπιο.

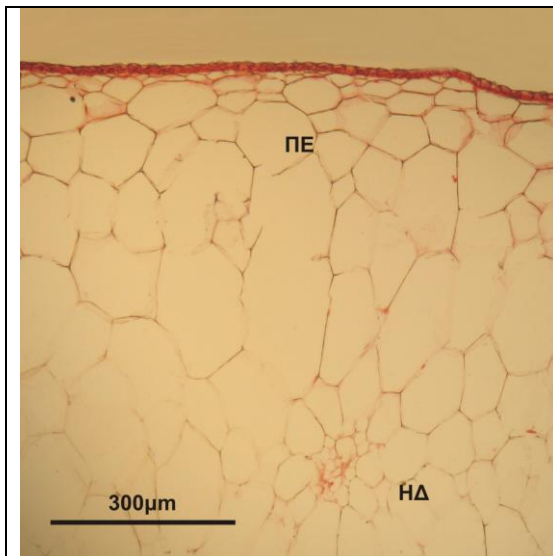
**Εικόνα 3.34:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΠΕ, περικάρπιο.



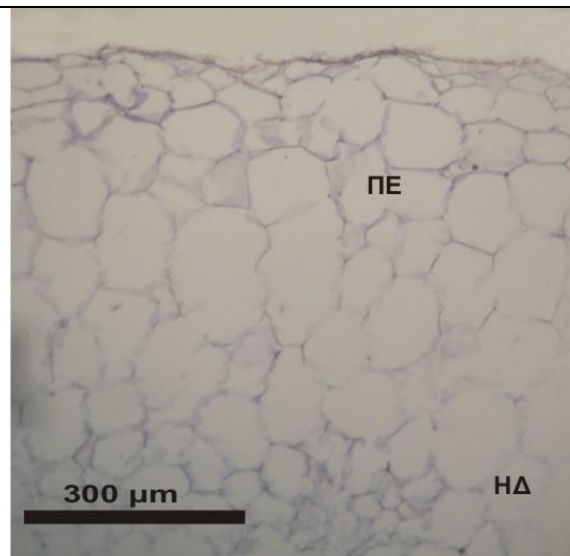
**Εικόνα 3.35:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορμόνη κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΣΒ, σπερματικές βλάστες, ΖΠ, ζελατινώδες παρέγχυμα, ΗΔ, ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, ΠΛ, πλακούντας.



**Εικόνα 3.36:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε παρθενοκαρπικό καρπό που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος σε μεγέθυνση. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στα κύτταρα στο χιτώνα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ).



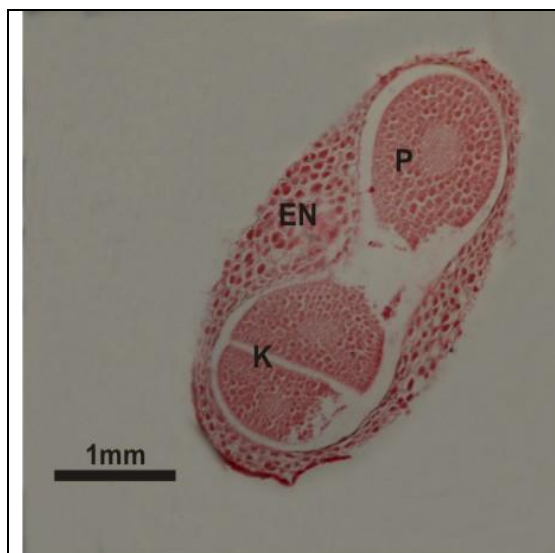
**Εικόνα 3.37:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορμόνη κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G. ΗΔ, ηθμαγγειώδεις δεσμίδα, ΠΕ, περικάρπιο



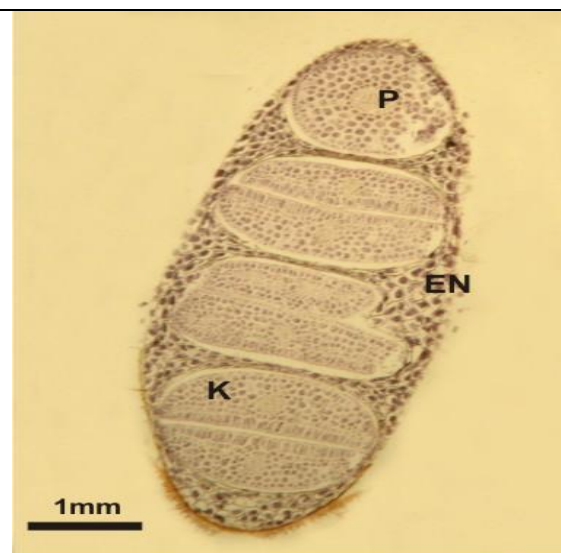
**Εικόνα 3.38:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε παρθενοκαρπικό καρπό που βρίσκεται στο στάδιο αλλαγής χρώματος σε μεγέθυνση. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και λιγότερο στα κύτταρα του περικαρπίου (ΠΕ) όπου η παρουσία του ενζύμου ήταν μικρότερη.

### 3.4.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού

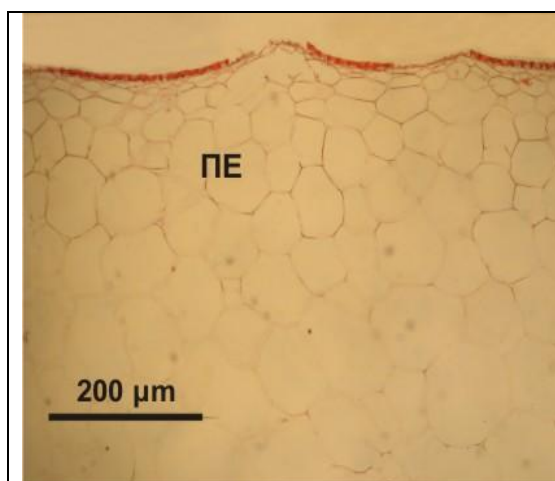
Στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού η παρουσία του ενζύμου ήταν έντονη στο εσωτερικό των αναπτυσσόμενων σπερμάτων (**Εικόνες 3.39- 3.42**). Στον παρθενοκαρπικό καρπό το σήμα ήταν ασθενέστερο και εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (**Εικόνες 3.43- 3.46**).



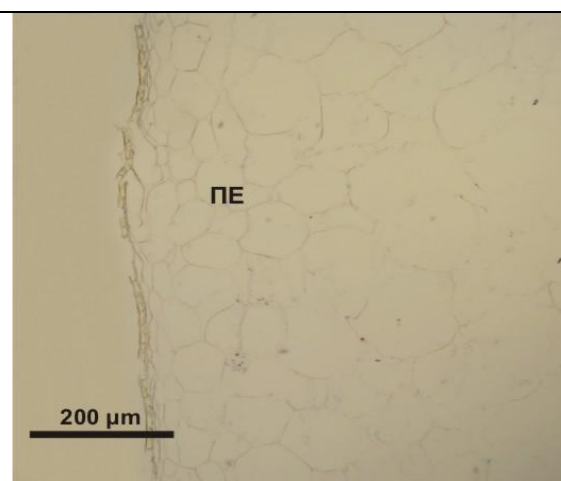
**Εικόνα 3.39:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. EN, ενδοσπέρμιο, K, κοτύλες, P, ρίζα.



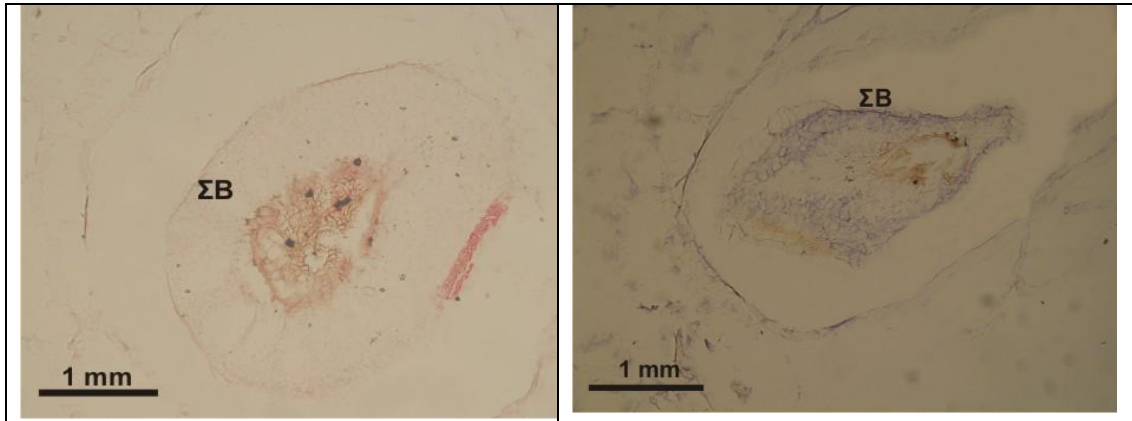
**Εικόνα 3.40:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. EN, ενδοσπέρμιο, K, κοτύλες, P, ρίζα.



**Εικόνα 3.41:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΠΕ, περικάρπιο.

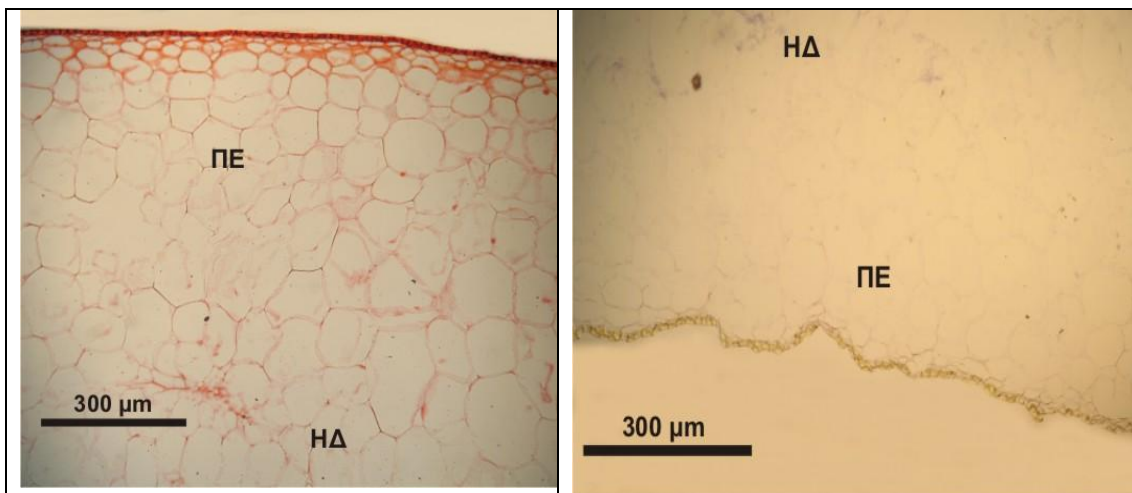


**Εικόνα 3.42:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης σε εγκάρσια τομή στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΠΕ, περικάρπιο.



**Εικόνα 3.43:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορμόνη προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή στο στάδιο του παρθενοκαρπικού ώριμου κόκκινου καρπού. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΣΒ, σπερματική βλάστηση.

**Εικόνα 3.44:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στο στάδιο του παρθενοκαρπικού ώριμου κόκκινου καρπού σε μεγέθυνση. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ).



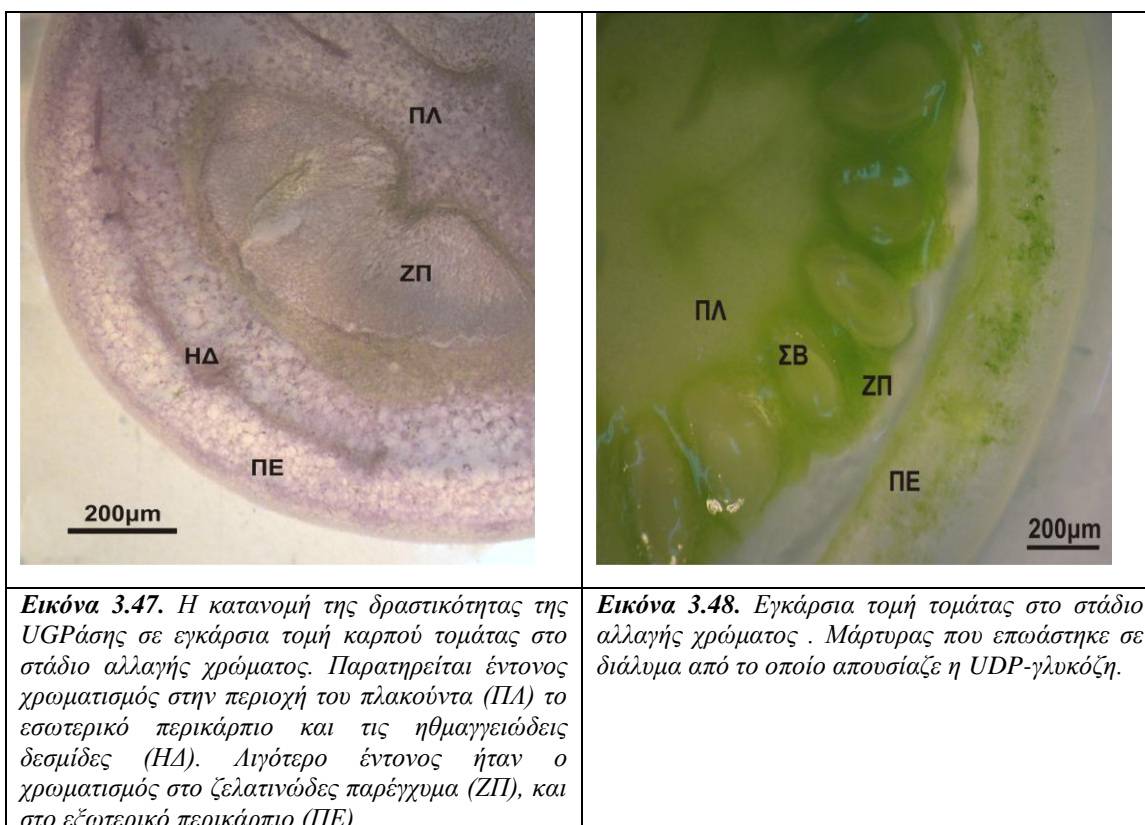
**Εικόνα 3.45:** Μάρτυρας που επωάστηκε με ορμόνη προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή στο στάδιο του παρθενοκαρπικού ώριμου κόκκινου καρπού. Για τη φωτογράφιση οι τομές χρωματίστηκαν με σαφρανίνη. ΠΕ, περικάρπιο. ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα.

**Εικόνα 3.46:** Ανοσοεντοπισμός της UGRάσης στο στάδιο του παρθενοκαρπικού ώριμου κόκκινου καρπού σε μεγέθυνση. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στις ηθμαγγειώδειςδεσμίδες (ΗΔ) και λιγότερο στα κύτταρα του περικάρπιου (ΠΕ).



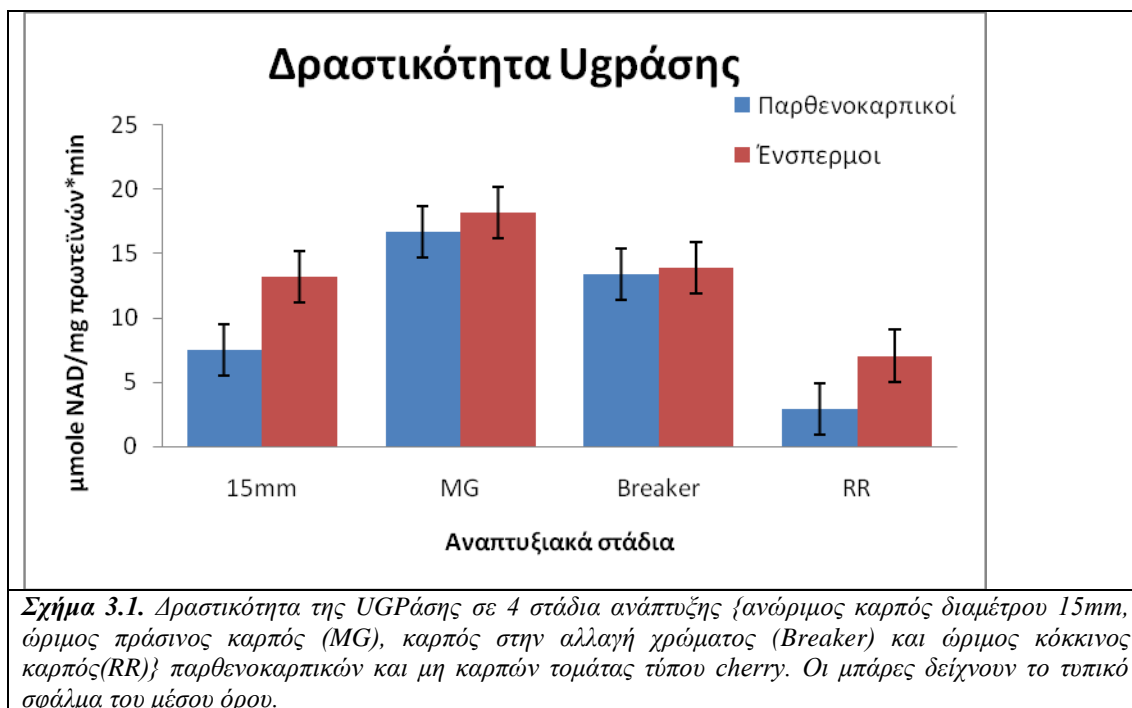
### 3.5 Εντοπισμός της δραστηριότητας της UGRάσης.

Ο εντοπισμός της δραστηριότητας της UGRάσης στα δείγματα δείχνει τους ιστούς στους οποίους κατά τη στιγμή της προσήλωσης είναι ενεργό το ένζυμο. Το ένζυμο εντοπίστηκε σε εγκάρσιες τομές τομάτας στο στάδιο αλλαγής χρώματος (**Εικόνα 3.47**). Συγχρόνως παρατίθενται για αντιπαραβολή τομές τομάτας στο στάδιο αλλαγής χρώματος ένσπερμου καρπού που επωάστηκε σε διάλυμα απουσία της UDP-γλυκόζης (**Εικόνα 3.48**). Ο εντοπισμός της δραστηριότητας του ενζύμου στους καρπούς τομάτας έδειξε ότι υπό τις συνθήκες του πειράματος το ένζυμο εντοπίζεται εντονότερα στον πλακούντα, στο εσωτερικό περικάρπιο και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες, λιγότερο στο ζελατινώδες παρέγχυμα και στο εξωτερικό περικάρπιο (**Εικόνα 3.47**).



### 3.6 Ο προσδιορισμός της *in vitro* δραστηριότητας της UGRάσης.

Η δραστηριότητα της UGRάσης προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα τέσσερα υπό εξέταση στάδια ανάπτυξης {ανώριμος καρπός διαμέτρου 15mm, ώριμος πράσινος καρπός (MG), καρπός στην αλλαγή χρώματος (Breaker) και ώριμος κόκκινος καρπός(RR)} τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς (Σχήμα 3.1). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φανερώνουν ότι η δραστηριότητα του ενζύμου ανά mg ολικών πρωτεϊνών αυξάνεται και στους ένσπερμους και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, μέχρι του σταδίου του ώριμου πράσινου καρπού και κατόπιν μειώνεται στα επόμενα στάδια. Επιπλέον, στους ένσπερμους καρπούς η δραστηριότητα του ενζύμου εμφανίζεται υψηλότερη σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του καρπού φαίνεται όμως ότι διαφέρει σημαντικά στο στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm και στο στάδιο του κόκκινου ώριμου. Παρόλα αυτά θα μπορούσε να λεχθεί ότι και στα δύο εναπομείναντα στάδια η δραστηριότητα του ενζύμου διαφέρει ουσιαστικά δεδομένης της υποεκτίμησής της λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης των πρωτεϊνών εξαιτίας της παρουσίας του εμβρύου.



**Σχήμα 3.1.** Δραστηριότητα της UGRάσης 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.

## **4. Συζήτηση.**

#### **4.1 Ο ανοσοεντοπισμός, η *in situ* και *in vitro* δραστηριότητα του ενζύμου.**

Όσον αφορά τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης της UGRάσης, στο στάδιο του ανώριμου καρπού (διαμέτρου 5mm) (**Εικ. 3.8, 3.9, 3.10, 3.12, 3.13, 3.14**), και στους καρπούς διαμέτρου 15mm, (**Εικ. 3.17, 3.18, 3.20, 3.22**). τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στον εσωτερικό χιτώνα των σπερματικών βλαστών. Αντίθετα, το σήμα εντοπισμού της πρωτεΐνης ήταν ασθενέστερο στην περιοχή του πλακούντα, και του περικαρπίου. Η μόνη διαφορά που εντοπίστηκε ήταν στην περιοχή του ζελατινώδους παρεγχύματος όπου ήταν εντονότερο στους καρπούς διαμέτρου 15mm. (**Εικ. 3.12 και 3.20**)

Η αυξημένη ροή των μεταβολιτών στη γλυκονεογέννεση απαιτεί τη δράση της UGRάσης (Hammond *et al.*, 1990) γεγονός που ερμηνεύει την παρουσία της πρωτεΐνης της UGRάσης στο ζελατινώδες παρέγχυμα. Η δραστηριότητα της UGRάσης στο ζελατινώδες παρέγχυμα έχει δειχθεί και από τους Schaffer and Petreikov (1997a). Όμως, στο πείραμα των Kortstee *et al.* (2007), η δραστηριότητα της UGRάσης βρέθηκε υποπενταπλάσια των αποτελεσμάτων των Schaffer and Petreikov (1997a), με τη μεγαλύτερη δραστηριότητα να παρατηρείται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στον ιστό που περιβάλλει το σπέρμα.

Στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού ο εντοπισμός της πρωτεΐνης του ενζύμου ήταν έντονος στο εσωτερικό της σπερματικής βλάστης (περιοχή ενδοσπερμίου, και εμβρυακής ρίζας). Στην περιοχή του περικαρπίου το ένζυμο της UGRάσης εντοπίστηκε στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και λιγότερο στα κύτταρα του εσωτερικού περικαρπίου (**Εικόνες 3.24, 3.26, 3.28, 3.30**).

Στο στάδιο αλλαγής χρώματος το ένζυμο εντοπίστηκε στην σπερματική βλάστη (έμβρυο και ενδοσπέρμιο), καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στην περιοχή του περικαρπίου (**Εικόνες 3.32, 3.34, 3.36, 3.38**).

Τέλος, στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού, στους έσπερμους καρπούς η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στο έμβρυο στην περιοχή του ενδοσπερμίου, της ρίζας και των κοτυλών (**Εικ. 3.40**), και ελάχιστη στην περιοχή του περικαρπίου (**Εικ. 3.42**). Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, η πρωτεΐνη εντοπίστηκε στον εσωτερικό χιτώνα των



σπερματικών βλαστών (**Εικ. 3.44**) καθώς επίσης και στην περιοχή των ηθμαγγειωδών δεσμίδων, ενώ ελάχιστη φαίνεται να είναι στην περιοχή του περικαρπίου (**Εικ. 3.46**).

Πολύ λίγες αναφορές υπάρχουν σχετικά με τον ανοσοεντοπισμό ή και τον εντοπισμό της δραστηριότητας της UGPάσης στους ιστούς ή και τα όργανα των φυτών. Η κυρίαρχη άποψη είναι ότι η UGPάση εντοπίζεται κυρίως στο κυτόπλασμα (Kleczkowski *et al.*, 2004). Ανοσοεντοπισμός με κολλοειδή χρυσό έδειξε ότι περισσότερο από το 90% της UGPάσης εντοπίζεται στο κυτόπλασμα αλλά σε ένα μικρό ποσοστό εντοπίζεται επίσης στους αμυλοπλάστες, στο σύμπλεγμα Golgi και τα μικροσώματα (Kimura *et al.*, 1992; Mikami *et al.*, 2001). Τέλος, μια UGPάση προσδεδεμένη σε κυτοπλασματική μεμβράνη έχει αναφερθεί στο κριθάρι (Becker *et al.*, 1995). Παρά το γεγονός ότι η UDP-γλυκόζη θεωρείται ότι συντίθεται αποκλειστικά στο κυτόπλασμα, έχει αναφερθεί δραστηριότητα της UGPάσης στους χλωροπλάστες φύλλων καπνού (Bird *et al.*, 1965), ρυζιού και φασολιού (Nomura *et al.*, 1967) . Πρόσφατα οι Okazaki *et al.* (2009) εντόπισαν στο *A. thaliana* ένα νέο γονίδιο, το UGP3 που περαιτέρω έρευνα με χρήση φθορίζουσας πρωτεΐνης και έλεγχο της δραστηριότητας του ενζύμου σε απομονωμένους χλωροπλάστες κατέδειξε τον εντοπισμό του γονιδίου αυτού στους χλωροπλάστες.

Οι Meng *et al.* (2007) αναφέρουν, ότι υψηλή δραστηριότητα του ενζύμου εντοπίζεται στα αναπτυσσόμενα αγγεία του ξύλου πράγμα που επιβεβαιώνει τις μελέτες (π.χ Gibeaut, 2000) που αναφέρουν τον πρωτεύοντα ρόλο της UGPάσης στη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων. Οι ίδιοι συγγραφείς αναφέρουν μικρή συσχέτιση του πλήθους των μεταγραφημάτων και της δραστηριότητας της πρωτεΐνης αλλά μεγάλη συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας της πρωτεΐνης και της δραστηριότητας του ενζύμου.

Η Roberts (1990) ανίχνευσε δραστηριότητα του ενζύμου σε ακρορρίζια καλαμποκιού μήκους 2mm. Επίσης, η *in situ* δραστηριότητα της UGPάσης σε αναπτυσσόμενους κονδύλους πατάτας (Appeldoorn *et al.*, 2002) έδειξε ότι, εκτός του γενικευμένου σήματος το ένζυμο εντοπίστηκε και στην περιοχή των ηθμαγγειωδών δεσμίδων.

Επίσης, οι Sergeeva and Vreugdenhil (2002) εντόπισαν σε στελέχη πετούνιας γενικευμένη δραστηριότητα της UGPάσης στους περισσότερους ιστούς Η υψηλότερη όμως δραστηριότητα εντοπίστηκε στον εσωτερικό και εξωτερικό ηθμό καθώς και στο φωτοσυνθετικό παρέγχυμα του φλοιώδους παρεγχύματος. Ακόμα, σε σαρκώδη φύλλα του *Gasteria verrucosa* η δραστηριότητα της UGPάσης παρατηρήθηκε στο

πασσαλώδες και στο σπογγώδες παρέγχυμα, ενώ η δραστικότητα του ενζύμου ήταν πάρα πολύ χαμηλή στα επιδερμικά κύτταρα και στο κεντρικό μη φωτοσυνθετικό παρέγχυμα (Sergeeva and Vreugdenhil, 2002).

Τα αποτελέσματα των ερευνών αυτών δείχνουν να συμφωνούν με την παρούσα εργασία όσον αφορά το γενικευμένο ανοσοεντοπισμό που παρατηρείται σε ένσπερμους και μη καρπούς τομάτας. Ο εντοπισμός της πρωτεΐνης και της δραστικότητας του ενζύμου στο εσωτερικό περικάρπιο συμφωνεί με τις μελέτες των Bird *et al.* (1965), Nomura *et al.*, (1967) και των Sergeeva and Vreugdenhil (2002) οι οποίοι εντόπισαν την πρωτεΐνη ή τη δραστικότητα του ενζύμου σε φωτοσυνθετικούς ιστούς, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

Οι Chen *et al.* (2007) εντόπισαν με τη χρήση αντισωμάτων την πρωτεΐνη στους ανθήρες του ρυζιού. Εντονότερο σήμα παρατηρήθηκε στα μητρικά κύτταρα της γύρης και στα μικροσπόρια. Παράλληλα, σε φυτά ρυζιού (Chen *et al.*, 2007) που είχαν υποστεί συνκαταστολή των δύο γονιδίων (Ugp1 και Ugp2), δεν εντοπίστηκε πρωτεΐνη και παρατηρήθηκε διακοπή της φυσιολογικής εναπόθεσης καλλόζης και παραγωγή μη βιώσιμης γύρης πράγμα που δείχνει τον πρωτεύοντα ρόλο της UGPάσης στη βιοσύνθεση των γλυκανών των κυτταρικών τοιχωμάτων. Όπως είναι γνωστό, η καλλόζη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο σχηματισμό του τοιχώματος της γύρης (Nishikawa *et al.*, 2005). Η μείωση παραγωγής σπερμάτων που παρατηρείται σε μεταλλάγματα *Arabidopsis* που δεν εκφράζονται τα γονίδια της UGPάσης (Meng *et al.*, 2009), είναι δυνατόν εκτός των άλλων να αποδοθεί στη διατάραξη της έκφρασης της UGP (Chen *et al.*, 2007b; Woo *et al.*, 2008; Mu *et al.*, 2009). Στο *Pinus strobus*, η πρωτεΐνη της UGPάσης εντοπίζεται σε γυρεοσωλήνες αλλά όχι στους γυρεόκοκκους (Fernando, 2005), πράγμα που δείχνει περαιτέρω το πόσο σημαντική είναι η UGPάση στην ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα.

Τα γονίδια της UGPάσης και της SuSy μαζί με αυτό της SPS, παρουσιάζουν ενδιαφέρον όσον αφορά την αλλαγή της κατανομής των υδατανθράκων στα φυτά. Σε μια προσπάθεια του Coleman (2008) να μελετήσει τον τρόπο βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος, υπερεκφράστηκαν τα τρία αυτά γονίδια σε φυτά καπνού. Όλες οι σειρές παρουσίασαν αυξημένη βλάστηση και παραγωγή βιομάζας και στις περιπτώσεις διπλών και τριπλών μεταλλάξεων παρουσιάστηκαν προσθετικά αποτελέσματα. Παρά τον αυξημένο ρυθμό βλάστησης, δεν παρουσιάστηκε αλλαγή στην κατανομή των διαλυτών υδατανθράκων. Επιπλέον, μόνο στην τριπλή μετάλλαξη παρουσιάστηκαν αλλαγές στους δομικούς υδατάθρακες και πιο συγκεκριμένα

αυξημένο περιεχόμενο ημικυτταρινών και μικρές αυξήσεις στην κυτταρίνη. Αντίθετα, μεταλλάγματα λεύκας που υπερέκφραζαν την UGPάση (Coleman *et al.*, 2009), παρήγαγαν περισσότερη κυτταρίνη σε σχέση με τον άγριο τύπο. Όμως, το τελευταίο είχε ως επακόλουθο τη μείωση της βλάστησης και την παραγωγή γλυκοζιδίων σαλικυλικού οξέος (SAG) σε μεγάλες ποσότητες. Η UDP-γλυκόζη που παράχθηκε από την υπερέκφραση της UGPάσης, φάνηκε ότι συμμετέχει τόσο στη σύνθεση κυτταρίνης όσο και στη παραγωγή SAG, γεγονός που προτείνει ότι η παραγωγή κυτταρίνης πιθανώς ελέγχεται από το σύμπλοκο συνθάσης της κυτταρίνης. Λεύκες που μετασηματίστηκαν με SuSy και SuSy/ UGPάση παρουσίαζαν αυξημένη παραγωγή κυτταρίνης.

Μελέτη της έκφρασης της UGPάσης στη λεύκα, έδειξαν συντονισμένη υπερύθμισή της αφενός με την αύξηση των κυττάρων και το σχηματισμό του δευτερογενούς κυτταρικού τοιχώματος (Hertzberg *et al.*, 2001) καθώς και με τη δημιουργία ξύλου τάσης (Andersson-Gunneras *et al.*, 2006) που συνδέεται στενά με την παραγωγή κυτταρίνης. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν ότι η UDP- γλυκόζη που παράγεται είτε από την UGPάση είτε από την SuSy, διευκολύνουν την εναπόθεση των σκελετών άνθρακα στην κυτταρίνη καθώς η UDP- γλυκόζη αποτελεί το πρόδρομο μόριο βιοσύνθεσης των πολυμερών της κυτταρίνης (Coleman *et al.*, 2007). Σε μελέτη των Andersson-Gunneras *et al.* (2006) στη λεύκα, αξιολογήθηκε το πρότυπο έκφρασης των γονιδίων που συνδεόταν με το σχηματισμό ξύλου τάσης, και μεταξύ των γονιδίων που αναγνωρίστηκαν ήταν η UGPάση και η SuSy, γεγονός που συνδέθηκε με το σχηματισμό και το υψηλό βαθμό παραγωγής κυτταρίνης. Η SuSy αναγνωρίστηκε ως ένα από τα εκφρασμένα γονίδια στο ξύλο τάσης με αναλογίες 1.57 (PttSuS1) και 1.39 (PttSuS2) σε σχέση με το κανονικό ξύλο. Αντίστοιχα στο ίδιο φυτό, η UGPάση (PHUGP2) ήταν ίση με 2.31 σε σχέση με το κανονικό ξύλο (Andersson-Gunneras *et al.*, 2006).

Οι Park *et al.* (2010) χρησιμοποίησαν στο *Arabidopsis* μεταλλάγματα στα οποία είχε ανασταλεί η έκφραση των γονιδίων *UGP1* και *UGP2* (*ugp1* και *ugp2* αντίστοιχα). Παρατηρήθηκε ότι παρόλο που η δραστηριότητα της UGPάσης είχε μειωθεί σε μεγάλο βαθμό τα μονά μετάλλαγμα των *ugp1* και *ugp2* παρουσίασαν φυσιολογική ανάπτυξη χωρίς να έχουν υπάρξει και αλλαγές στο αναπαραγωγικό σύστημα. Αντίθετα τα διπλά μεταλλάγματα *ugp1/ ugp2* παρουσίασαν δραστική μείωση ανάπτυξης και αρρενοστεριότητα. Στη φάση αναπαραγωγής στους ανθίρες των *ugp1/ ugp2* η γύρη των μητρικών κυττάρων αναπτύχθηκε κανονικά, αλλά

απουσίαζε η εναπόθεση καλλόζης γύρω από τα μικροσπόρια. Επίσης, βρέθηκε ότι τα γονίδια που κωδικοποιούν για τα ένζυμα στα βήματα του μονοπατιού σύνθεσης της κυτταρίνης και της καλλόζης υπορρυθμίζονται στα διπλά μεταλλάγματα (Park *et al.*, 2010).

Άλλες μελέτες που συνηγορούν στην αναγκαιότητα ύπαρξης του υπό μελέτη ενζύμου στη βιοσύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων αναφέρουν ότι μεταλλαγμένα βακτήρια του *Acetobacter xylinum* που δεν είχαν την ικανότητα παραγωγής της κυτταρίνης παρουσίασαν επίσης και έλλειψη της UGPάσης (Valla *et al.*, 1989). Ομοίως, σε μεταλλάγματα ζυμών στα οποία μειώθηκε κατά δέκα φορές η δραστηριότητα της UGPάσης μειώθηκε επίσης η συγέντρωση β-γλυκάνης στα κυτταρικά τοιχώματα (Daran *et al.*, 1995). Ακόμα, κατά τη διάρκεια της επιμήκυνσης των κυττάρων και το σχηματισμό των δευτερογενών κυτταρικών τοιχωμάτων στα στελέχη της λεύκας βρέθηκε αυξημένη έκφραση ενός γονιδίου UGPάσης (Hertzberg *et al.*, 2001). Εξάλλου, υπερέκφραση των γονιδίων UGPάσης και *SuSy* είχε ως αποτέλεσμα αυξημένα ποσά κυτταρίνης στα κυτταρικά τοιχώματα και αύξηση του ύψους των φυτών (Coleman *et al.*, 2003). Η εμπλοκή της UGPάσης στη βιοσύνθεση γλυκανών, φαίνεται και από την παρεμπόδιση της εξέλιξης των μικροσπορίων και δημιουργία γύρης σε μεταλλάγματα ρυζιού στα οποία είχε επιβληθεί συγκαταστολή και των δύο ισοτύπων του ενζύμου (Chen *et al.*, 2007)

Ο ανοσοεντοπισμός του ενζύμου σε όλους τους ιστούς του καρπού κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του (5 και 15mm) πιθανόν σχετίζεται εν μέρει με τη συνεισφορά του ενζύμου στη παραγωγή UDP-γλυκόζης η οποία χρησιμοποιείται για τη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων του αυξανόμενου καρπού. Επίσης, το γεγονός ότι το ένζυμο εντοπίζεται έντονα στη περιοχή των ηθμαγγειώδων δεσμίδων παραπέμπει στη σύνθεση των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά τη διάρκεια των σταδίων αυτών. Παράλληλα, η έντονη συσχέτιση του ενζύμου με τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξής του (5 και 15mm) παραπέμπει επίσης και στην πιθανή εμπλοκή του στο μεταβολισμό της σακχαρόζης (βλέπε παρακάτω).

Εκτός από τον ανοσοεντοπισμό της πρωτεΐνης, ελέγχθηκε το πρότυπο εντοπισμού της *in situ* δραστηριότητας του ενζύμου σε ένσπερμους καρπούς στο στάδιο αλλαγής χρώματος (Εικ. 3.47) όπου το ένζυμο εντοπίζεται στην περιοχή του πλακούντα (ΠΛ), το εσωτερικό περικάρπιο και τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ). Λιγότερο έντονος ήταν ο χρωματισμός στο ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ), και στο

εξωτερικό περικάρπιο (ΠΕ). Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με μελέτη των Sergeeva and Vreugdenhil (2002) οι οποίοι χρησιμοποίησαν τη μέθοδο του *in situ* εντοπισμού για την εκτίμηση της δραστικότητας της UGRάσης σε καρπούς τομάτας και εντόπισαν μεγάλη δραστικότητά στα αναπτυσσόμενα σπέρματα, στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στο περικάρπιο.

Φαίνεται ότι το πρότυπο εντοπισμού της *in situ* δραστικότητας του ενζύμου, συμπίπτει με το πρότυπο του ανοσοεντοπισμού της πρωτεΐνης. Κατά αυτό τον τρόπο, μπορεί με σχετική βεβαιότητα να υποθεθεί ότι στα σημεία που εντοπίζεται το ένζυμο είναι τα ίδια με τα σημεία που είναι ενεργό. Υπάρχει έντονη συσχέτιση μεταξύ της δραστικότητας της UGRάσης και του αντίστοιχου πρωτεϊνικού της περιεχομένου σε όλους τους ιστούς/ όργανα. Το παραπάνω δεν παρατηρήθηκε μεταξύ της έκφρασης των γονιδίων της UGP και του αντίστοιχου πρωτεϊνικού περιεχομένου/ δραστικότητας (Meng *et al.*, 2009). Στενή συσχέτιση μεταξύ δραστικότητας της UGRάσης και της πρωτεΐνης της έχει παρατηρηθεί παλιότερα στο *Arabidopsis* και στη λεύκα (Ciereszko *et al.*, 2001a; Ciereszko *et al.*, 2001b; Ciereszko *et al.*, 2005; Meng *et al.*, 2007).

Η *in vitro* δραστικότητα της UGRάσης μελετήθηκε στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας στα τέσσερα στάδια ανάπτυξης. Από το **Σχήμα 3.1** παρατηρείται ότι το πρότυπο δραστικότητας μεταξύ έσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών είναι ίδιο. Πιο συγκεκριμένα, η δραστικότητα της UGRάσης στους έσπερμους καρπούς, κυμάνθηκε από 7 έως 18  $\mu\text{mole NAD/mg πρωτεϊνών} \cdot \text{min}$  με την αντίστοιχη στους παρθενοκαρπικούς να κυμαίνεται μεταξύ 8 και 17  $\mu\text{mole NAD /mg πρωτεϊνών} \cdot \text{min}$ . Επίσης, η μέγιστη δραστικότητα και στα δύο είδη καρπών παρατηρείται στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού και το ελάχιστο στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού. Επιπλέον, στους ένσπερμους καρπούς η δραστικότητα του ενζύμου εμφανίζεται υψηλότερη σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του καρπού φαίνεται όμως ότι διαφέρει σημαντικά στο στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm και στο στάδιο του κόκκινου ώριμου. Γενικά παρατηρείται διαφορά στη δραστικότητα του ενζύμου σε όλα τα στάδια με αυτή των έσπερμων καρπών να είναι μεγαλύτερη δεδομένης και της υποεκτίμησης στα αποτελέσματα λόγω της παρουσίας του εμβρύου.

Το πρότυπο που παρατηρήθηκε σε αυτή τη μελέτη συμφωνεί με την έρευνα των Obiadalla- Ali *et al.* (2004) στην τομάτα, όπου η UGRάση παρουσίασε αύξηση στις 30 ημέρες μετά την άνθηση η οποία συνεχίστηκε μέχρι και την 45<sup>η</sup> ημέρα μετά

την άνθηση. Το μέγιστο της δραστηριότητας της UGRάσης στην ποικιλία Micro- Tom παρατηρείται την 45<sup>η</sup> ημέρα φάση στην οποία σύμφωνα με τους ερευνητές η τομάτα βρίσκεται στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού. Η μέγιστη δραστηριότητα στην έρευνα των Obiadalla- Ali *et al.* (2004) συμπίπτει με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας (**Σχήμα 3.1**). Στη συνέχεια, μετά την 45<sup>η</sup> ημέρα παρατηρείται μείωση του ενζύμου με το ελάχιστο να παρατηρείται στα τελικά στάδια ωρίμανσης. Η δραστηριότητα της UGRάσης ήταν υψηλότερη στο περικάρπιο σε σχέση με τον πλακούντα με το πρότυπό τους όμως να παραμένει ίδιο. Κατά την 55<sup>η</sup> ημέρα και μετά η δραστηριότητα της UGRάσης μεταξύ των δύο υπό μελέτη ιστών ήταν ακριβώς η ίδια και συνεχώς φθίνουσα. Πέραν του παρόμοιου προτύπου της δραστηριότητας του ενζύμου με τη μελέτη των Obiadalla- Ali *et al.* (2004) θεωρείται σκόπιμο να αναφερθεί ότι και το αναπτυξιακό στάδιο των υπο μελέτη καρπών συμπίπτει, καθώς οι Obiadalla- Ali *et al.* (2004) χρησιμοποίησαν μικρόκαρπη ποικιλία τομάτας (Micro-Tom).

#### **4.2 Η UGRάση και ο μεταβολισμός της σακχαρόζης.**

Οι καρποί της τομάτας αρχικά περιέχουν χλωροπλάστες που είναι φωτοσυνθετικά ενεργοί και διαφοροποιούνται σε μη φωτοσυνθετικούς χρωμοπλάστες κατά την ωρίμανση (Obiadalla- Ali *et al.*, 2004). Τουλάχιστον αρχικά μπορούν να παράξουν μέρος του δικού τους άνθρακα, αλλά επίσης εισάγουν σακχαρόζη μέσω του ηθμού. Αυτό σημαίνει ότι η παροχή άνθρακα αλλάζει κατά την ωρίμανση με τελικό αποτέλεσμα ο καρπός να εξαρτάται αποκλειστικά για την τροφοδοσία σακχαρόζης από τον ηθμό. Το γεγονός αυτό κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των καρπών, έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της δραστηριότητας των ενζύμων που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της σακχαρόζης (Schaffer and Petreikov 1997a). Η αυξομείωση της δραστηριότητας της UGRάσης που παρατηρήθηκε στο **Σχήμα 3.1** στα δείγματα παρθενοκαρπικών και μη καρπών φαίνεται πως είναι αποτέλεσμα και της παραπάνω παρατήρησης.

Έχει παρατηρηθεί ότι διάφορα προγονικά είδη της τομάτας συγκεντρώνουν (Kortstee *et al.*, 2007) μεγαλύτερες ποσότητες σακχαρόζης σε σχέση με τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη που συσσωρεύονται σε μεγαλύτερο βαθμό στις καλλιεργούμενες ποικιλίες. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελεί, το είδος *L. chmielewskii* που συσσωρεύει υψηλότερες συγκεντρώσεις σακχαρόζης από τα άλλα διαλυτά σάκχαρα (Yelle *et al.*, 1988). Ο λόγος της συσσώρευσης της σακχαρόζης στο είδος αυτό, θεωρείται ότι

οφείλεται στη μείωση της δραστικότητας της όξινης ιμπερτάσης (Klann *et al.*, 1996, Fridman *et al.*, 2000). Τα επίπεδα της γλυκόζης και της φρουκτόζης αυξάνονται σε καρπούς του *S. lycopersicum* κατά τη διάρκεια της καρπόδεσης και της ωρίμανσης του καρπού (Kortstee *et al.*, 2007). Επίσης, παλαιότερες μελέτες σε καλλιεργούμενες ποικιλίες, αναφέρουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις σακχαρόζης σε σχέση με τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη (Damon *et al.*, 1988; Klann *et al.*, 1996; Schaffer and Petreikov 1997a; Obiadalla- Ali *et al.*, 2004).

Τα ένζυμα που εμπλέκονται στη συσσώρευση γλυκόζης και φρουκτόζης στις καλλιεργούμενες ποικιλίες είναι η συνθάση της σακχαρόζης (SuSy) και η διαλυτή ιμπερτάση (SI). Στην καλλιεργούμενη τομάτα, καθώς παρουσιάζεται αυξημένη δραστικότητα των ενζύμων SuSy και SI τα οποία κατανέμονται σε ολόκληρο τον καρπό, οι Kortstee *et al.* (2007) υπόθεσαν ότι τα παραπάνω ένζυμα είναι τουλάχιστον μερικώς υπεύθυνα για τις διαφορές που παρατηρούνται στην κατανομή των διαφόρων ειδών υδατάνθρακα (Yelle *et al.*, 1988; Miron and Schaffer 1991; Stommel 1992; Sun *et al.*, 1992). Το περικόρπιο παρουσίαζε αυξημένη δραστικότητα αρκετών ενζύμων σε σύγκριση με τον πλακούντα. Αυτά τα ένζυμα είναι η SuSy, η PGM, η ενολάση, η κινάση του φωσφορογλυκερινικού και η UGPάση. Οι SuSy, PGM, ενολάση και UGPάση εμπλέκονται στην αποδόμηση της σακχαρόζης. Παρουσιάζει ενδιαφέρον ότι το περικόρπιο έχει μικρότερη συγκέντρωση σακχαρόζης σε σχέση με τον πλακούντα, ενώ τα επίπεδα γλυκόζης όσο και αυτά της φρουκτόζης ήταν χαμηλότερα στον πλακούντα από ότι το περικόρπιο (Obiadalla- Ali *et al.*, 2004). Πιθανόν η μικρότερη συγκέντρωση σακχαρόζης στο περικόρπιο να σχετίζεται με την αυξημένη δραστικότητα των παραπάνω ενζύμων τα οποία και την μεταβολίζουν (Obiadalla- Ali *et al.*, 2004). Το γεγονός ότι στη παρούσα εργασία κατά τον ανοσοεντοπισμό η πρωτεΐνη της UGPάσης εντοπίστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στο περικόρπιο σε σχέση με τον πλακούντα δείχνει να συμφωνεί με τα δεδομένα των Obiadalla- Ali *et al.* (2004).

Στην ίδια μελέτη, στην καλλιεργούμενη ποικιλία Micro-Tom φάνηκε ότι η SuSy παρουσιάζει μεγαλύτερη δραστικότητα στα αρχικά στάδια ανάπτυξης και στη συνέχεια μειώνεται σταδιακά μέχρι την πλήρη ωρίμανση. Η σταδιακή μείωση της δραστικότητας της SuSy πιθανόν οδηγεί σε μικρότερη συγκέντρωση UDP-γλυκόζης που αποτελεί το προϊόν που καταλύει η αντίδραση της UGPάσης. Το τελευταίο μας οδηγεί στη υπόθεση ότι η μείωση της δραστικότητας της UGPάσης που παρατηρείται τόσο στην έρευνα των Obiadalla- Ali *et al.* (2004) όσο και στην παρούσα εργασία

από το στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού και μέχρι το πέρας της ωρίμανσης εξαρτάται και από τη δραστικότητα της SuSy καθώς φαίνεται ότι η ανεπάρκεια UDP-γλυκόζης έχει ως συνέπεια την έλλειψη διαθέσιμου υποστρώματος για την κατάλυση της αντίδρασης της UGPάσης προς την κατεύθυνση παραγωγής 1-φωσφορογλυκόζης. Με την τελευταία συμφωνεί και η έρευνα των Feshchenko *et al.* (2004) στα ακρορρίζια του αραβοσίτου όπου συσχέτισαν τον εντοπισμό της SuSy με την παραγωγή της UDP-γλυκόζης. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι ο συνεντοπισμός της SuSy και της UGPάσης που παρατήρησαν, πιθανόν να σχετίζεται με τη χρήση της παραγόμενης 1-φωσφορογλυκόζης σε μεταβολικές διαδικασίες που απαιτούνται για τις κυτταροδιαιρέσεις και την επιμήκυνση των κυττάρων (Feshchenko *et al.*, 2004). Επιπλέον, η παρουσία της UGPάσης και της Susy (Wachter *et al.*, 2003) στους ηθμοσωλήνες της πατάτας θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως συμβολή τους στην παροχή αναπνευστικών υποστρωμάτων για την αυξημένη μεταβολική δραστηριότητα των ηθμοσωλήνων λόγω της απαιτούμενης μεταφοράς των ουσιών μέσω των κυττάρων αυτών.

Επίσης, σε κονδύλους πατάτας παρατηρήθηκε μερική υδρόλυση του αμύλου και σύμφωνα με τους Sowokinos *et al* (2004) η UGPάση συμμετέχει στη σύνθεση σακχαρόζης μέσω της υδρόλυσης του αμύλου.

Γενικά η συσχέτιση της UGPάσης με την αποδόμηση της σακχαρόζης, είναι ένα γεγονός που χρειάζεται να ερευνηθεί περαιτέρω. Η συσχέτιση αυτή δεν είναι ξεκάθαρη καθώς σε αυτό το μονοπάτι συμμετέχουν πολλά ένζυμα των οποίων ο ρόλος δεν έχει αποσαφηνισθεί πλήρως. Συγχρόνως, υπάρχει πλήθος ερευνών με αντιφατικά αποτελέσματα όσον αφορά το ρυθμιστικό ρόλο της UGPάσης.

Έτσι, λόγου χάριν, τα αποτελέσματα των Meng *et al.* (2008 ) στο *Arabidopsis* συμφωνούν με δεδομένα των Zrenner *et al.* (1993) σε κόνδυλους πατάτας όπου ενώ παρεμποδίστηκε η έκφραση των γονιδίων της UGP, δεν παρατηρήθηκαν αλλαγές στο περιεχόμενο των υδατανθράκων ακόμα και σε μεταλλάγματα που είχαν υποστεί παρεμπόδιση της δραστικότητας του ενζύμου μέχρι και 96%. Οι Zrenner *et al.* (1993) υπέθεσαν ότι ακόμα και ένα 4% της ενεργότητας του ενζύμου είναι αρκετό για την αδιατάραχτη λειτουργία του μεταβολισμού. Επίσης, οι Kleczkowski *et al.* (2004) αναφέρουν ότι σε σχέση με άλλα ένζυμα που εμπλέκονται στο μεταβολισμό της σακχαρόζης, η UGPάση παρουσιάζει υψηλή δραστικότητα και πιθανολογούν μη ρυθμιστικό ρόλο του ενζύμου στη ροή άνθρακα από και προς τη σακχαρόζη. Σε άλλες όμως μελέτες όπου η δραστικότητα του ενζύμου είχε παρεμποδιστεί κατά 50%



παρατηρήθηκε δραστική μείωση στο περιεχόμενο των διαλυτών σακχάρων (Spsychalla *et al.*, 1994 , Boronkov *et al.*, 1996). Το τελευταίο αντιπρότεινε μια άλλη άποψη ότι δηλαδή η UGPάση και η αντίδραση που αυτή καταλύει ρυθμίζει την ταχύτητα του μεταβολικού μονοπατιού που ανήκει. Σε υπεράσπιση της θέσης των Spsychalla *et al.* (1994) και των Boronkov *et al.* (1996) έρχεται να προστεθεί και μια πρόσφατη έρευνα των Park *et al.* (2010) στο *Arabidopsis* όπου αναφέρεται ότι η έκφραση των γονιδίων της UGPάσης είναι απαραίτητη τόσο για την βλαστική όσο και την αναπαραγωγική φάση.

### 4.3 Η έκφραση των γονιδίων της UGPάσης.

Αρχικά, είχε διατυπωθεί η πιθανότητα η UGPάση να κωδικοποιείται από μόνο ένα γονίδιο σε κάθε είδος βασισμένο σε μελέτες που διενεργήθηκαν στο κριθάρι από τους Eimert *et al.* (1996) όπως επίσης και στο γονιδίωμα του ανθρώπου στο οποίο έχει χαρακτηριστεί μόνο ένα γονίδιο *UGP* το οποίο παράγει δύο mRNAs (Eimert *et al.* (1996). Παρόλα αυτά οι Bishop *et al.* (2002) χαρακτήρισαν δύο γονίδια *UGP* στο μυξομύκητα *Dictyostelium discoideum* και αργότερα οι Meng *et al.* (2007) χαρακτήρισαν δύο γονίδια *UGP* στη λεύκα. Το γονιδίωμα του ρυζιού επίσης περιέχει δύο ομόλογα γονίδια της UGPάσης, το *Ugp1* στο χρωμόσωμα 9 (Abe *et al.*, 2002) και το *Ugp2* στο χρωμόσωμα 2 (Mu, 2002). Ακόμα, οι Kleczkowski *et al.* (2004) χαρακτήρισαν δύο γονίδια *UGP* στο *Arabidopsis*. Όμως, μόλις πρόσφατα, οι Okazaki *et al.* (2009) αναγνώρισαν στο *A. thaliana* ένα νέο γονίδιο, το UGP3 που απαιτείται για τη βιοσύνθεση των θειολιπιδίων. Οι παραπάνω αναφορές δείχνουν ότι πιθανόν στους περισσότερους οργανισμούς η UGPάση κωδικοποιείται από περισσότερα του ενός γονίδια. Στην τομάτα εντοπίσαμε δύο γονίδια που κωδικοποιούν την UGPάση, τα οποία διέφεραν κατά ένα τμήμα. Πιο συγκεκριμένα η μία νουκλεοτιδική αλληλουχία (ak 321564) δεν περιείχε ένα τμήμα 51 νουκλεοτιδίων, εύρημα που πιθανόν παραπέμπει σε εναλλακτική ωρίμανση του mRNA (alternative splicing), όπως συμβαίνει και με την ανθρώπινη UGPάση (Geisler *et al.*, 2004). Επειδή η ανίχνευση των μεταγραφημάτων αυτών είναι εκτός ορίου αυτής της μελέτης, σχεδιάστηκαν εκκινήτες οι οποίοι υβριδίζουν και με τις δύο νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (ak327004 και ak 321564).

Με έρευνα στη βάση δεδομένων Sol genomics εντοπίστηκε κλώνος BAC (SL2.30sc3748) ο οποίος περιείχε το γονίδιο της UGPάσης. Ευθυγράμμιση μέρος του

κλώνου αυτού με cDNA του γονιδίου της πατάτας, μας επέτρεψε να προσδιορίσουμε για πρώτη φορά τη δομή του γονιδίου της τομάτας. Το γονίδιο αποτελείται από 20 εξόνια και 6.151 νουκλεοτίδια (**Εικόνα 3.3**).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα της RT-PCR, φαίνεται ότι τα συγκεκριμένα γονίδια εκφράζονται στον καρπό της τομάτας, το πλήθος τους όμως στα 15mm και στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού είναι πολύ μεγαλύτερο στους ένσπερμους σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Όμως τα αποτελέσματα αυτά συγκρινόμενα με την *in vitro* δραστηριότητα του ενζύμου, είναι δύσκολο να αξιολογηθούν εκτός αν υποθεθεί ότι η μεταμεταφραστική τροποποίηση του ενζύμου όπως η ολιγομερίωση (Torshin, 1999; Peneff *et al.*, 2001; Wilczynska *et al.*, 2003; Perugini *et al.*, 2005), η φωσφορυλίωση (Rutter *et al.*, 2002) και η Ο-γλυκοζυλίωση (Wells *et al.*, 2003) είναι διαφορετική στους δύο τύπους καρπών. Επίσης θεωρείται σκόπιμο να αναφερθεί ότι οι Meng *et al.* (2009) παρατήρησαν ότι η δραστηριότητα και το πλήθος των μεταγραφημάτων δεν συσχετίζονται.

## 5. Συμπεράσματα.

- 1) Το πρότυπο εντοπισμού της *in situ* δραστικότητας του ενζύμου φαίνεται ότι συμπίπτει με το πρότυπο του ανοσοεντοπισμού της πρωτεΐνης.
- 2) Το γονίδιο που μελετήσαμε εκφράζεται στον καρπό, όμως το πλήθος των μεταγραφημάτων δεν φαίνεται να συσχετίζεται με τη δραστικότητα του ενζύμου.
- 3) Η UGRάση εντοπίζεται σε όλους τους ιστούς του καρπού με διαφορετική όμως ένταση.
- 4) Η δραστικότητα του ενζύμου ακολουθεί περίπου το ίδιο πρότυπο και στους έσπερμους και τους παρθενοκαρπικούς καρπούς.

## **6. Βιβλιογραφία.**

- Abdalla AA, Verkerk K** (1968) Growth, flowering and fruit set of the tomato at high temperature. *Neth J Agri Sci* **16**: 71-76.
- Abe T, Niiyama H, Sasahara T** (2002) Cloning of cDNA for UDP-glucose pyrophosphorylase and the expression of mRNA in rice endosperm. *Theor Appl Genet* **105**: 216–221.
- Alabadi D, Aguero MS, Perez-Amador MA, Carbonell J** (1996) Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries: changes in unpollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin and gibberellin. *Plant Physiol* **112**: 1237-1244.
- Alexander RD, Morris PC**, (2006) A proteomic analysis of 14:3:3 binding proteins from developing barley grains. *Proteomics* **6**: 1886–1896.
- Allaby M** (1998) Oxford dictionary of plant sciences. Oxford University Press, New York. pp. 262.
- Alonso MD, Lomako J, Lomako WM, Whelan WJ** (1995) A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* **9**: 1126–1137.
- Altschul, S.F., T.L. Madden, A.A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D.J. Lipman.** (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-34028.
- Amor Y, Haigler CH, Johnson S, Wainscott M, Delmer DP** (1995) A membrane-associated form of sucrose synthase and its potential role in synthesis of cellulose and callose in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9353–9357.
- Andersson-Gunneras S, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM, Nilsson P, Henrissat B, Moritz T, Sundberg B** (2006) Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: Global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *Plant J* **45**:144–165.
- ap Rees T** (1992) Synthesis of storage starch. In CR Pollock, JF Farrar, AJ Gordon, eds, Carbon Partitioning Within and Between Organisms. *Bios Scientific Publishers*, Oxford, pp 115–131.
- Appeldoorn NJG, Sergeeva L, Vreugdenhilb D, van der Plas LHW, Visser RGF** (2002) In situ analysis of enzymes involved in sucrose to hexose-phosphate conversion during stolon-to-tuber transition of potato. *Physiologia Plantarum* **115**: 303–310.
- Archbold DD, Jr Dennis FG, Fiore JA** (1982) Accumulation of <sup>14</sup>C labelled material from foliarapplied <sup>14</sup>C sucrose by tomato ovaries during fruit set and initial development. *J Am Soc Hort Sci* **107**: 19-23.
- Asahira T, Takeda Y, Nishio T, Hirabayashi M, Tsukamoto Y** (1967). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005).
- Asahira T, Takagi H, Takeda Y, Tsukamoto Y** (1968). Αναφορά από **Atherton J, Rudich G** (1986).
- Asahira T, Hosoki T, Shinya K** (1982) Regulation of low temperature-induced malformation of tomato fruit by plant growth regulators. *J Jpn Soc Hort Sci* **50**: 468-474.
- Atherton J, Rudich G** (1986) Tomato crop. A scientific basis for improvement. Chapman and Hall UK.
- Aw TY, Jones DP** (1982). Direct determination of UDP-glucuronic acid in cell extracts by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **127**: 32–36.
- Aw TY, Jones DP** (1984). Control of glucuronidation during hypoxia. Limitation by UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.* **219**: 707–712.

- Baud S, Vaultier MN, Rochat C** (2004) Structure and expression profile of the sucrose synthase multigene family in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **55**: 397–409.
- Bearden JC** (1978). Quantitation of submicrogram quantities of protein by an improved protein-dye binding assay. *Biochimica et Biophysica Acta.* **533**: 525-529.
- Becker M, Vincent C, Reid JSG** (1995) Biosynthesis of (1, 3)(1, 4)- $\beta$ -glucan and (1, 3)- $\beta$ -glucan in barley (*Hordeum vulgare* L.): properties of the membrane-bound glucan synthases. *Planta* **195**: 331–338.
- Bird I.F., Porter H.K., Stocking C.R.** (1965) Intracellular localization of enzymes associated with sucrose synthesis in leaves. *Biochim. Biophys. Acta* (Amst) **100**: 366- 375.
- Bishop JD, Moon BC, Harrow F, Gomer RH, Dottin RP, Brazill DT** (2002) A second UDP-glucose pyrophosphorylase is required for differentiation and development in *Dictyostelium discoideum*. *J Biol Chem* **277**: 32430–32437.
- Bohner J, Bangerth F** (1988a). Αναφορά από **Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993).
- Borovkov AY, McClean PE, Sowokinos JR, Ruud SH, Secor GA** (1996) Effect of expression of UDP-glucose pyrophosphorylase ribozyme and antisense RNAs on the enzyme activity and carbohydrate composition of field-grown transgenic potato plants. *J Plant Physiol* **147**: 644–652.
- 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.
- Chang HY, Peng HL, Chao YC, Duggleby RG** (1996) The importance of conserved residues in human liver UDP-glucose pyrophosphorylase. *Eur J Biochem* **236**: 723–728
- Chen R, Zhao X, Shao Z, Zhu L. He G** (2007) Multiple isoforms of UDP-glucose pyrophosphorylase in rice. *Physiologia Plantarum.* **129**: 725-736.
- Chen , R. , Zhao , X. , Shao , Z. , Wei , Z. , Wang , Y. , Zhu , L.** (2007b) Rice UDP-glucose pyrophosphorylase1 is essential for pollen callose deposition, and its cosuppression results in a new type of thermosensitive genic male sterility . *Plant Cell* **19** : 847– 861.
- Chiu WB, Lin CH, Chang CJ, Hsieh MH, Wang AY** (2006) Molecular characterization and expression of four cDNAs encoding sucrose synthase from green bamboo *Bambusa oldhamii*. *New Phytol.* **170**: 53–63.
- Ciereszko I, Johansson H, Hurry V, Kleczkowski LA** (2001a) Phosphate status affects the gene expression, protein content and enzymatic activity of UDP-glucose pyrophosphorylase in wild-type and pho mutants of Arabidopsis. *Planta* **212**: 598–605.
- Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA** (2001b) Sucrose and light regulation of a cold-inducible UDP-glucose pyrophosphorylase gene via a hexokinase-independent and abscisic acid-insensitive pathway in *Arabidopsis*. *Biochem J* **354**: 67–72.
- Ciereszko I, Kleczkowski LA** (2002) Glucose and mannose regulate the expression of a major sucrose synthase gene in *Arabidopsis* via hexokinase-dependent mechanisms. *Plant Physiol Biochem* **40**: 907–911.
- Ciereszko I, Kleczkowski LA** (2005) Expression of several genes involved in sucrose/starch metabolism as affected by different strategies to induce phosphate deficiency in Arabidopsis. *Acta Physiol. Plant.* **27**: 147–155.
- Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA** (2005). Interactive effects of phosphate deficiency, sucrose and light/dark conditions on gene expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in Arabidopsis. *J. Plant Physiol.* **162**: 343–353.

- Ciereszko I, Kleczkowski LA** (2006) Phosphate deficiency-dependent upregulation of UDP-glucose pyrophosphorylase genes is insensitive to ABA and ethylene status in *Arabidopsis* leaves. *Acta Physiol. Plant.* **28**: 387–393.
- Coleman H, Ellis D, Gilbert M, Mansfield SD** (2003) Increased growth and yield by altered carbohydrate allocation. In B Sundberg, ed, *Tree Biotechnology* UPSC Publishers, Umeå, Sweden, pp S10.41.
- Coleman H.D., Canam T., Kang K.Y., Ellis D.D. and Mansfield S.D.** (2007) Over-expression of UDP-glucose pyrophosphorylase in hybrid poplar affects carbon allocation. *J. Exp. Bot.* **58**: 4257–4268.
- Coleman H.D.** (2008) Modification of cellulose biosynthesis through varied expression of sucrose metabolism genes in tobacco and hybrid poplar. *B. S. F.*, University of British Columbia.
- Coleman H.D., Yan J. and Mansfield S.D.** (2009). Sucrose synthase affects carbon partitioning to increase cellulose production and altered cell wall ultrastructure. *PNAS.* **106**: 13118–13123.
- Coombe B** (1976). Αναφορά από **Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Crested tinamou, *Eudromia elegans* (Aves: Tinamiformes: Tinamidae). *Chromosome Info Serv* **29**: 19-21.
- 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.
- Damon S, Hewitt J, Nieder M, Bennett AB** (1988) Sink metabolism in tomato fruit. II. Phloem unloading and sugar uptake. *Plant Physiol* **87**: 731–736.
- Daran JM, Dallies N, Thines-Sempoux D, Francois J** (1995) Genetic and biochemical characterization of the UGP1 gene encoding UDP-glucose pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **233**: 520–530.
- Davies JW, Cocking EC** (1965). Αναφορά από **Atherton J, Rudich G** (1986)
- Dean CR, Goldberg JB** (2002). *Pseudomonas aeruginosa galU* is required for a complete lipopolysaccharide core and repairs a secondary mutation in a PA103 (serogroup O11) wbpM mutant. *FEMS Microbiol. Letters* **210**: 277–283.
- Déjardin A, Sokolov LN, Kleczkowski LA** (1999) Sugar/osmoticum levels modulate differential abscisic acid-independent expression of two stressresponsive sucrose synthase genes in *Arabidopsis*. *Biochem J* **344**: 503–509.
- Dimond RL, Farnsworth PA, Loomis WF** (1976). Isolation and characterization of mutations affecting UDPG pyrophosphorylase activity in *Dictyostelium discoideum*. *Dev. Biol.* **50**: 169–181.
- Duggleby RG, Chao YC, Huang JG, Peng HL, Chang HY** (1996) Sequence differences between human muscle and liver cDNAs for UDPglucose pyrophosphorylase and kinetic properties of the recombinant enzymes expressed in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **235**: 173–179.
- Echeverria E, Boyer CD, Thomas PA, Liu KC, Shannon JC** (1988) Enzyme activities associated with maize kernel amyloplasts. *Plant Physiol* **86**:786–792.
- Eimert K, Villand P, Kilian A, Kleczkowski LA** (1996) Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley (*Hordeum vulgare*) tissues. *Gene* **170**: 227–232.
- Falavigna A, Badino M, Soressi GP** (1978). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005).
- 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.



- Feingold DS, Barber GA** (1990). Nucleotide sugars. In: Dey, P.M. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry*, vol. 2. Academic Press, London, pp. 39–78.
- Fernando , D.D.** ( 2005 ) Characterization of pollen tube development in *Pinus strobus* (Eastern white pine) through proteomic analysis of differentially expressed proteins. *Proteomics* **5**: 4917 – 4926.
- Feshchenko NF, Krasavina MS, Burmistrova NA, Nosov AV** (2004) Phloem unloading and activity of enzymes hydrolyzing sucrose in the apex of the growing root. *Doklady Biochemistry and Biophysics* **399**: 383-385.
- Flores-Diaz M, Alape-Giron A, Persson B, Pollesello P, Moss M, Eichel-Streiber C, Thelestam M, Florin I** (1997) Cellular UDP-glucose deficiency caused by a single point mutation in the UDP-glucose pyrophosphorylase. *J Biol Chem* **272**: 23784–23791.
- Fos M, Nuez F, Garcia-Martinez JL** (2000) The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. *Plant Physiol* **122**: 471-479.
- Frey PA** (1996) The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* **10**: 461–470.
- Fridman E, Pleban T, Zamir D.** (2000) A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 4718–4723.
- Geisler M, Wilczynska M, Karpinski S, Kleczkowski LA** (2004) Toward a blueprint for UDP-glucose pyrophosphorylase structure/function properties: homology-modeling analyses. *Plant Mol. Biol.* **56**: 783–794.
- Geisler-Lee J, Geisler M, Coutinho PM, Segerman B, Nishikubo N, Takahashi J, Aspeborg H, Djerbi S, Master E, Andersson-Gunneras S, Sundberg B, Karpinski S, Teeri TT, Kleczkowski LA, Henrissa B, Mellerowicz. EJ** (2006). Poplar carbohydrate active enzymes (CAZymes). Gene identification and expression analyses. *Plant Physiol.* **140**: 946–962.
- George W, Scott J, Spilltstoesser W** (1984) Parthenocarpy in tomato. *Hort Rev* **6**: 65-84.
- Gibeaut DM** (2000) Nucleotide sugars and glucosyltransferases for synthesis of cell wall matrix polysaccharides. *Plant Physiol Biochem* **38**: 69–80.
- Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993) Fruits: A developmental perspective. *Plant Cell* **5**: 1439-1451.
- Goetz M, Vivian-Smith A, Johnson SD, Koltunow AM** (2006) AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1873-1886.
- Gonzali S, Loreti E, Novi G, Poggi A, Alpi A, Perata P** (2005) The Use of Microarrays to Study the Anaerobic Response in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* **96**: 661-668.
- Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005) Parthenocarpic fruit development in tomato. *Plant Biol* **7**: 131-139.
- Gough C, Hobson GE** (1990) A comparison of the productivity, quality, shelf life characteristics and consumer reaction to the crop from cherry tomato plants grown at different levels of salinity. *J Hort Sc* **65**: 431-439.
- Goulard F, Diouris M, Quere G, Deslandes E, Floch JY** (2001) Salinity effects on NDP-sugars, floridoside, starch, and carrageenan yield, and UDP-glucose pyrophosphorylase and epimerase activities of cultivated *Solieria chordalis*. *J. Plant Physiol.* **158**: 1387–1394.
- Grierson D, Kader AA** (1986) Fruit ripening and quality. In: *The Tomato Crop*. (ed. Atherton JG & Rudich J). Chapman and Hall Publication Company. pp. 241-275.

- Groot SPC, Bruinsma J, Karssen CM** (1987) The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: Studies with a gibberellin-deficient mutant. *Physiol Plantarum* **71**: 184-190.
- Gustafson FG** (1936) Inducement of fruit development by growth promoting chemicals. *Proc Natl Acad Sci USA* **22**: 628-636.
- Gustafson FG** (1942) Parthenocarpy: natural and artificial. *Bot Rev* **8**: 599-654.
- Hallman E, Kobryń J** (2003) Yield and quality of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*) cultivated on rockwool and cocofibre. *Acta Hort* **614**: 693-697.
- Hames B.D. and Rickwood D.** (1981) Gel electrophoresis of protein a practical approach *IRL press Oxford pp 14- 15.*
- Hammond BL, Lester WA Jr, Braga M, Taft CA** (1990) Theoretical study of the interaction of ionized transition metals (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu) with argon. *The American Physical Society* **41**: 10447-10452.
- Harris WM, Spurr AR** (1969) Chromoplasts of tomato fruits. II. The red tomato. *Am J Bot* **56**: 380-389.
- Heiser C, Anderson G** (1999). Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007).
- Hertzberg M, Aspeborg H, Schrader J, Andersson A, Erlandsson R, Blomqvist K, Bhalerao R, Uhlen M, Teeri TT, Lundeberg J** (2001) A transcriptional roadmap to wood formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 14732-14737.
- 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.
- Hobson G** (1988) Cherry tomatoes. *The Garden* pp 55-60.
- Houghtalin HB** (1935). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986).
- Howlett FS** (1939) The modification of flower structure by environment in varieties of *Lycopersicon esculentum*. *J Agr Res* **58**: 79-117.
- Igamberdiev AU, Kleczkowski LA** (2000) Capacity for NADPH/NADP turnover in the cytosol of barley seed endosperm: the role of NADPHdependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiol Biochem* **38**: 747-753.
- Janes BE** (1941) Some chemical differences between artificially produced parthenocarpic fruits and normal seeded fruits of tomato. *Am J Bot* **28**: 639-646.
- Johansson H, Sterky F, Amini B, Lundeberg J, Kleczkowski LA** (2002) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding poplar UDPglucose dehydrogenase, a key enzyme of hemicellulose/pectin formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**: 53-58.
- Johansson H** (2003) Gene regulation of UDP-glucose synthesis and metabolism in plants. PhD thesis, Umeå University, Umeå, Sweden.
- Kataoka K, Uemachi A, Yazawa S** (2003) Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in *pat-2* and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. *Sci Hort* **98**: 9-16.
- Kataoka K, Uemachi A, Nonaka M, Yazawa S** (2004) Effect of endogenous gibberellins in the early stages of fruit growth and development of the 'Severianin' tomato. *J Hort Sci Biot* **79**: 54- 58.
- Katsube T, Kazuta Y, Mori H, Nakano K, Tanizawa K, Fukui T** (1990) UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: cDNA cloning and sequencing. *J. Biochem.* **108**: 321-326.
- Kazuta Y, Omura Y, Tagaya M, Nakano K, Fukui T** (1991) Identification of lysyl residues located at the substrate-binding site in UDP-glucose pyrophosphorylase from potato tuber: affinity labeling with uridine di- and triphosphopyridoxals. *Biochemistry* **30**: 8541-8545.

- Kimura S, Mitsui T, Matsuoka T, Igaue I** (1992) Purification, characterization and localization of rice UDP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiol Biochem* **30**: 683–693.
- Klann EM, Hall B, Bennett AB** (1996) Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenictomato fruit. *Plant Physiol* **12**: 1321–1330.
- Kleczkowski LA** (1994a) Glucose activation and metabolism through UDPglucose pyrophosphorylase in plants. *Phytochemistry* **37**: 1507–1515.
- Kleczkowski LA** (1994b) Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **45**: 339– 367.
- Kleczkowski LA, Geisler M, Ciereszko I, Johansson H** (2004) UDP-Glucose Pyrophosphorylase. An Old Protein with New Tricks. *Plant Physiology* **134**: 912–918.
- Kleczkowski LA, Martz F, Wilczynska M** (2005). Factors affecting oligomerization status of UDP-glucose Pyrophosphorylase. *Phytochemistry* **66**: 2815–2821.
- Koch KE, Nolte KD, Duke ER, McCarty DR, Avigne WT** (1992) Sugar levels modulate differential expression of maize sucrose synthase genes. *Plant Cell* **4**: 59–69.
- Kojima K, Tamura Y, Nakano M, Han D-S Niimi Y** (2003) Distribution of indole-acetic acid, gibberellin and cytokinins in apoplast and symplast of parthenocarpic tomato fruits. *Plant Growth Regul* **41**: 99-104.
- Koltunow AM, Grossniklaus U** (2003) Apomixis: A developmental perspective. *Annu Rev Plant Biol* **54**: 547-574.
- Konishi Y, Tanizawa K, Muroya S, Fukui T** (1993) Molecular cloning and affinity labeling of bovine liver UDP-glucose pyrophosphorylase. *J Biochem* **114**: 61–68.
- Kortstee A.J., Appeldoorn N.J.G., Oortwijn M.E. P. and Visser R.G.F.** (2007) Differences in regulation of carbohydrate metabolism during early fruit development between domesticated tomato and two wild relatives. *Planta* **226**:929–939.
- Lamerz AC, Haselhorst T, Bergfeld AK, von Itzstein M, Gerardy-Schahn R** (2006) Molecular cloning of the Leishmania major UDP-glucose pyrophosphorylase, functional characterization, and ligand binding analyses using NMR spectroscopy. *J Biol Chem* **281**:16314–16322.
- Lifschitz E, Brodai L, Hareven D, Hurwitz C, Prihadash A, Pnueli L, Samach A, Zamir D** (1993) Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005).
- Lin S, Splittstoesser WE, George WL** (1983) A comparison of normal seeds and pseudoembryos produced in parthenocarpic fruit of 'Severianin' tomato. *HortScience* **18**: 75-76.
- Long VH** (1998) Cherry tomato seed production. AVRDC-ARC Research Report.
- Lukyanenko AN** (1991) Parthenocarpy in tomato. In: Genetic improvement of tomato (ed. Kalloo G). Monographs on Theor Appl Genet Springer-Verlag, Berlin. pp. 167-177.
- McCoy JG, Bitto E, Bingman CA, Wesenberg GE, Bannen RM, Kondrashov D A, Phillips GN Jr** (2007). Structure and Dynamics of UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Arabidopsis thaliana* with Bound UDP-Glucose and UTP. *J Mol Biol.* **366**: 830–841.
- Magel E, Abdel-Latif A, Hampp R** (2001) Non-structural carbohydrates and catalytic activities of sucrose metabolizing enzymes in trunks of two Juglans species and their role in heartwood formation. *Holzforschung* **55**: 135–145.
- 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.
- Martz F, Wilczynska M, Kleczkowski LA** (2002). Oligomerization status, with the monomer as active species, defines catalytic efficiency of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Biochem. J.* **367**: 295–300.

- Mazzucato A, Taddei AR, Soressi GP** (1998) The parthenocarpic fruit (*pat*) mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sets seedless fruits and has aberrant anther and ovule development. *Development* **125**: 107-114.
- Meng M, Geisler M, Johansson H, Mellerowicz EJ, Karpinski S, Kleczkowski LA** (2007) Differential tissue/organ-dependent expression of two sucrose- and cold-responsive genes for UDP-glucose pyrophosphorylase in *Populus*. *Gene*. **389**: 186–195.
- Meng M, Wilczynska M, and Kleczkowski LA** (2008) Molecular and kinetic characterization of two UDP-glucose pyrophosphorylases, products of distinct genes, from *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta* **1784** : 967– 972.
- Meng M, Geisler M, Johansson H, Harholt J, Scheller H.V., Mellerowicz E.J., and Kleczkowski L.A.** (2009) UDP-Glucose Pyrophosphorylase is not Rate Limiting, but is Essential in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*. **50**(5): 998–1011.
- Meredith FI, Purcell AE** (1966) Changes in the concentration of carotenes of ripening homestead tomatoes. *J Am Soc Hort Sci* **89**: 544-548.
- Mikami S, Hori H, Mitsui T** (2001) Separation of distinct compartments of rice Golgi complex by sucrose density gradient centrifugation. *Plant Sci* **161**: 665–675.
- Mio T, Yabe T, Arisawa M, Yamada-Okabe H** (1998). The eukaryotic UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylases. Gene cloning, protein expression, and catalytic mechanism. *J. Biol. Chem.* **273**: 14392–14397.
- Miron D., Schaffer A.A.** (1991) Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in the developing fruits of *Lycopersicon esculentum* Mill. and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* Humb. and Bonpl. *Plant Physiol* **95**:623–627.
- Mohr WP, Stein M** (1969) Fine structure of fruit development in tomato. *Can J Plant Sci* **49**: 549–553.
- Mu H** (2002). Screening of Genes Related to Pollen Development in a Thermo-Sensitive Male Sterile Rice (*Oryza sativa* L.): Cloning and Characterization of UDP-Glucose Pyrophosphorylase. PhD dissertation (Hong Kong, China: University of Hong Kong).
- Mu H., Ke J., Liu W., Zhuang C. and Yip W.** (2009) UDP-glucose pyrophosphorylase2 (*OsUgp2*), a pollen-preferential gene in rice, plays a critical role in starch accumulation during pollen maturation. *Chinese Sci. Bull.* **54** : 234– 243.
- Muller CH** (1940). Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007).
- Neckelmann G, Orellana A** (1998) Metabolism of uridine 5-diphosphateglucose in Golgi vesicles from pea stems. *Plant Physiol* **117**: 1007–1014.
- Nishikawa S, Zinkl G.M., Swansson R.J., Maruyama D. and Preuss D.** (2005) Callose (β-1,3 glucan) is essential for *Arabidopsis* pollen wall patterning, but not tube growth. *BMC Plant Biol.* **5** : 22.
- Nitsch JP** (1952). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005).
- Nogler GA** (1984). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005)
- Nomura T., Nakayama N., Murata T. and Akazawa T.** (1967) Biosynthesis of Starch in Chloroplasts *Plant Physiology* **42**:327-332.
- Obiadalla-Ali H., Fernie A.R., Kossmann J., Lloyd J.R.** (2004) Developmental analysis of carbohydrate metabolism in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) fruits. *Physiol Plant* **120**:196–204.
- Okazaki Y., Shimojima M., Sawada Y., Toyooka K., Narisawa T., Mochida K., Tanaka H., Matsuda F., Hirai A., Hirai M.Y., Ohta H., and Saito K.** (2009). A Chloroplastic UDP-Glucose Pyrophosphorylase from *Arabidopsis* Is the Committed Enzyme for the First Step of Sulfolipid Biosynthesis. *The Plant Cell* **21**: 892- 909.
- Olimpieri I, Siligato F, Caccia R, Soressi GP, Mazzucato A, Mariotti L, Ceccarelli N** (2007) Tomato fruit set driven by pollination or by the parthenocarpic fruit allele are mediated by transcriptionally regulated gibberellin biosynthesis. *Planta* **226**: 877-888.

- Ολύμπιος XM** (2001) Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. Σταμούλης, Αθήνα. σελ. 40-44.
- Omidiji MO** (1979). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986).
- Osborne DJ and Went FW** (1953). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005).
- Park J- In., Ishimizu T., Suwabe K., Sudo K., Masuko H., Hakozaiki H., Nou hi- S., Suzuki G. and Watanabe M.** (2010) UDP-Glucose Pyrophosphorylase is Rate Limiting in Vegetative and Reproductive Phases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. **51**(6): 981- 996.
- Peneff C, Ferrari P, Charrier V, Taburet Y, Monnier C, Zamboni V** (2001). Crystal structures of two human pyrophosphorylase isoforms in complexes with UDPGlc(Gal)NAc: role of the alternatively spliced insert in the enzyme oligomeric assembly and active site architecture. *EMBO J*. **20**: 6191–6202.
- Peng HL, Chang HY** (1993). Cloning of a human liver UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA by complementation of the bacterial galU mutation. *FEBS Letters*, **329**: 153–158.
- Perugini MA, Griffin MDW, Smith BJ, Webb LE, Davis AJ, Handman E, Gerrard JA** (2005) Insight into the self-association of key enzymes from pathogenic species. *Eur. Biophys. J*. **34**: 469–476.
- Philouze J** (1981). Αναφορά από Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986).
- Philouze J** (1985). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005).
- Philouze J, Maisonneuve B** (1978) Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety *Severianin*. *Tomato Genet Coop Rep* **28**: 12-13.
- Preil W**(1973) Influence of temperature on the parthenocarp of tomatoes. *Angew Bot* **47**: 135- 140.
- Pua EC, Lim SSW, Liu P, Liu JZ** (2000) Expression of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNA during fruit ripening of banana. *Aust J Plant Physiol* **27**: 1151–1159.
- 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 FI*) harvested at different ripening stages. *J Agr Food Chem* **50**: 6550–6556.
- Repetto O, Bestel-Corre G, Dumas-Gaudot E, Berta G, Gianinazzi-Pearson V, Gianinazzi S** (2003) Targeted proteomics to identify cadmium-induced protein modifications in *Glomus mosseae*-inoculated pea roots. *New Phytol* **157**: 555–567.
- Rick CM** (1976). Αναφορά από **Tucker G, Walley P, Seymour G** (2007).
- Rick CM** (1978) The tomato. *Sci Amer* **239**: 77-87.
- Roberts KMJ** (1990) Observation of uridine triphosphate: glucose-1-phosphate uridylyltransferase activity in maize root tips by saturation transfer <sup>31</sup>P-NMR. Estimation of cytoplasmic PPI. *Biochimica et Biophysica Acta* **1051**: 29-36.
- Roeben A, Plitzko J M, Körner Böttcher RU, Siegers MK, Hayer-Hartl M, Bracher A** (2006) Structural Basis for Subunit Assembly in UDP-glucose Pyrophosphorylase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* **364**: 551–560.
- Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Huub L, Kerckhoffs J, Elliott RC** (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J* **21**: 547-552.
- Ross JJ, O'Neill DP** (2001) New interactions between classical plant hormones. *Trends Plant Sci* **6**: 2-4.

- Rosso SW** (1968). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986).
- Ruan YL, Llewellyn DJ, Furbank RT** (2003) Suppression of sucrose synthase gene expression represses cotton fiber cell initiation, elongation, and seed development. *Plant Cell* **15**: 952–964.
- Rubatzhy VE, Yamaguchi M** (1997) World vegetables (principles, production and nutritive values). Chapman and Hall, London. pp. 533-553.
- Rutter J, Probst BL, McKnight SL** (2002) Coordinate regulation of sugar flux and translation by PAS kinase. *Cell* **111**: 17–28.
- Sasaki M, Nishida C, Takagi N, Hori H** (1980) Sex-chromosomes of the elegant crested tinamou, *Eudromia elegans* (Aves: Tinamiformes: Tinamidae). *Chromosome Info Serv* **29**: 19-21.
- Sawhney VK, Greyson RI** (1971) Induction of multilocular ovary in the tomato by gibberellic acid. *J Am Soc Hort* **96**: 196-198.
- Schaffer A.A., Petreikov M.** (1997) Sucrose-to-starch metabolism in tomato fruit undergoing transient starch accumulation. *Plant Physiol* **113**:739–746.
- Schlüpmann H, Bacic A, Read S.M** (1994) Uridine-diphosphate glucosyltransferase and callose synthases in cultured pollen tubes of *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol.* **105**: 659–670.
- Seifert GJ** (2004) Nucleotide sugar interconversions and cell wall biosynthesis: how to bring the inside to the outside. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 1–8.
- Sergeeva LI, Vreugdenhil D.** (2002) *In situ* staining of activities of enzyme involved in carbohydrate metabolism in plant tissues. *J. Exp.Bot* **53**: 361-70.
- Setha OE** (1995) Cherry tomato varietal trial. ARC Training report.
- Silbert JE, Sugumaran G** (1995). Intracellular membranes in the synthesis, transport, and metabolism of proteoglycans. *Biochim. Biophys. Acta*, **1241**: 371–384.
- Simpson DJ, Baquar MR, McGlasson WB, Lee TH** (1976). Αναφορά από **Grierson D, Kader AA** (1986).
- Sjut V, Bangerth F** (1982) Induced parthenocarpy: a way of changing the levels of endogenous hormones in tomato fruits (*Lycopersicon esculentum* Mill.): 1. Extractable hormones. *Plant Growth Regul* **1**: 243-251.
- Smith O** (1935). Αναφορά από **Gillaspy G, Ben-David H, Gruissem W** (1993).
- Sonnhammer EL, Eddy SR, Durbin R** (1997) Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins* **28**: 405–420.
- Sowokinos JR, Thomas C, Burrell MM** (1997) Allelic polymorphism of UDP-glucose pyrophosphorylase in potato cultivars and its association with tuber resistance to sweetening in the cold. *Plant Physiol* **113**: 511–517.
- Sowokinos, J.R., Vigdorovich, V. and Abrahamsen, M.** (2004) Molecular cloning and sequence variation of UDP-glucose pyrophosphorylase cDNAs from potatoes sensitive and resistant to cold sweetening. *J. Plant Physiol.* **161**: 947–955.
- Spychalla JP, Scheffler BE, Sowokinos JR, Bevan MW** (1994) Cloning, antisense RNA inhibition and the coordinated expression of UDP-glucose pyrophosphorylase with starch biosynthetic genes in potato tubers. *J Plant Physiol* **144**: 444–453.
- Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan C, Wasternack C.** (2003). Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle specific generation of jasmonates in tomato – amplification in wound-signalling. *The Plant Journal* **33**: 577–589.
- Stommel J.R.** (1992) Enzymic components of sucrose accumulation in the wild tomato species *Lycopersicon peruvianum*. *Plant Physiol* **99**:324–328.

- Sun J., Loboda T., Sung S-J., Black C.C.** (1992) Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength. *Plant Physiol* **98**:1163–1169.
- Tang GQ, Sturm A** (1999). Antisense repression of sucrose synthase in carrot (*Daucus carota* L.) affects growth rather than sucrose partitioning. *Plant Mol. Biol.* **41**: 465–479
- 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.
- Thomas TH** (1982). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986).
- Torshin I** (1999) Activating oligomerization as intermediate level of signal transduction: analysis of protein–protein contacts and active sites in several glycolytic enzymes. *Front. Biosci.* **4**: 557–570.
- Tsuboi KK, Fukunaga K, Petricciani JC** (1969) Purification and specific kinetic properties of erythrocyte uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase. *J Biol Chem* **244**:1008–1015.
- 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.
- Turnquist RL, Hansen RG** (1974). Uridine diphosphoryl glucose pyrophosphorylase. In *The Enzymes* (Boyer, P. D., ed.), 3rd edit., vol. 8, pp. 51–72. Academic Press, New York.
- Unligil UM, Rini JM** (2000). Glycosyltransferase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**: 510–517.
- Valla S, Coucheron DH, Fjaervik E, Kjosbakken J, Weinhouse H, Ross P, Amikam D, Benziman M** (1989) Cloning of a gene involved in cellulose biosynthesis in *Acetobacter xylinum*: complementation of cellulosenegative mutants by the UDPG pyrophosphorylase structural gene. *Mol Gen Genet* **217**: 26–30.
- 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.
- Wachter R, Langhans M, Aloni R, Gotz S, Weilmunster A, Koops A, Temguia L, Mistrik I, Pavlovkin J, Rascher U, Schwalm K, Koch KE, Ullrich CI** (2003) Vascularization, High-Volume Solution Flow, and Localized Roles for Enzymes of Sucrose Metabolism during Tumorigenesis by *Agrobacterium tumefaciens* *Plant Physiology* **133**: 1–14.
- Walker AJ** (1975). Αναφορά από **Ho LC, Hewitt JD** (1986).
- Wang-Gillam A, Pastuszak I, Stewart M, Drake RR, Elbein AD** (2000). Identification and modification of the uridine-binding site of the UDPGalNAc (GlcNAc) pyrophosphorylase. *J. Biol. Chem.* **275**: 1433–1438.
- Wells L, Whalen SA, Hart GW** (2003) O-GlcNAc: a regulatory posttranslational modification. *Biochem Biophys Res Commun* **302**: 435–441.
- Wilczynska M, Lobov S, Ny T** (2003) The spontaneous polymerization of plasminogen activator inhibitor type-2 and Z-antitrypsin are due to different molecular aberrations. *FEBS Lett.* **537**: 11–16.
- Wilson LA, Sterling C** (1976) Studies on the cuticle of tomato fruit. I. Fine structure of the cuticle. *Z Pflanzenphysiol* **77**: 359– 371.

- Winter H, Huber SC** (2000) Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Crit Rev Plant Sci* **19**: 31–67.
- Witt HJ** (1992) UDP-glucose metabolism during differentiation and dedifferentiation of *Riella helicophylla*. *J. Plant Physiol.* **140**: 276– 281.
- Woo , M.O. , Ham , T.H. , Ji , H.S. , Choi , M.S. , Jiang , W. , Chu , S.H.** (2008) Inactivation of the *UGPase1* gene causes genic male sterility and endosperm chalkiness in rice (*Oryza sativa* L.) . *Plant J.* **54** : 190 – 204.
- Xuan PT** (1999) Effect of potassium nitrate on seed production of cherry tomato. *ARC Training report*.
- Yagi T, Baroja-Fernandez E, Yamamoto R, Munoz FJ, Akazawa T, Hong KS, Pozueta-Romero J** (2003). Cloning, expression and characterization of a mammalian Nudix hydrolase-like enzyme that cleaves the pyrophosphate bond of UDPglucose. *Biochem. J.* **370**: 409–415.
- Yelle S., Hewitt J.D., Robinson N., Damon S., Benett A.B.** (1988) Sink metabolism in tomato fruit III analysis of carbohydrate assimilation in a wild species. *Plant Physiol* **87**:737–740.
- Zrenner R, Salanoubat M, Willmitzer L, Sonnewald U** (1995) Evidence of the crucial role of sucrose synthase for sink strength using transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.* **7**: 97–107.
- Zrenner R, Willmitzer L, Sonnewald U** (1993) Analysis of the expression of potato uridinediphosphate-glucose pyrophosphorylase and its inhibition by antisense RNA. *Planta* **190**: 247–252.
- Ramakers, C., Ruijter, J.M., Deprez, R.H., and Moorman, A.F.** (2003). Assumption free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett.* **339**: 62–66.