ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΚΗΣ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑΣ ΦΥΤΩΝ

Ανοσοεντοπισμός και δραστηριότητα της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης σε παρθενοκαρπικούς και μη καρπούς τομάτας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ
ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΠΟΝΙΑ
ΥΠΟ ΤΗΝ ΕΠΙΒΛΕΨΗ ΤΟΥ ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗ ΓΕΩΡΓΙΟΥ ΑΪΒΑΛΑΚΙ

ΣΚΑΡΜΟΥΤΣΟΣ Ε. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2010

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΣΤΑ ΠΛΑΙΣΙΑ
ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΞΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

«Ανοσοεντοπισμός και δραστηριότητα της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης σε παρθενοκαρπικούς και μη καρπούς τομάτας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους»

Συμβουλευτική Επιτροπή:

Επ. Καθηγητής Γ. Αϊβαλάκις, Επιβλέπων

Καθηγητής Γ. Καραμπουρνιώτης, Μέλος

Αν. Καθηγητής Κ. Ακουμιανακής, Μέλος

ΣΚΑΡΜΟΥΤΣΟΣ Ε. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Η ανάθεση της παρούσας μελέτης έγινε με απόφαση της υπ. αριθ. 16 της 2/6/2007 Γενικής Συνέλευσης του Τμήματος Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

Πρόλογος

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

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να ευχαριστήσω:

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

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

Το Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών για την παραχώρηση του φυτικού υλικού και την άψογη συνεργασία μας και ιδιαίτερα τον Δρ. Ι. Καραπάνο και τη γεωπόνο Δ. Μακρογιάννη.

Τους συναδέλφους Μ. Θάνου, Γ. Παπαχαράλαμπο και Γ. Τσανικλίδη για την άψογή συνεργασία μας κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης του πειράματος στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Φυτών.

Το Γ. Τσανικλίδη για την ιδέα.

Το Γ. Τσομπάνογλου για την άρτια παρουσίαση του κειμένου.

Σκαρμούτσος Κωνσταντίνος
Δεκέμβριος 2009

Περιεχόμενα

Περίληψη **5**

Abstract **6**

1. Εισαγωγή **7**
1.1 Η τομάτα cherry 8
1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση της τομάτας 8
1.1.2 Φυλογένεση - βοτανική ταξινόμηση και καταγωγή της τομάτας τύπου cherry 8
1.1.3 Διαιτητική αξία του καρπού της τομάτας τύπου cherry 9
1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry 9
1.1.5 Μορφολογία και ανατομία του καρπού 10
1.1.6 Η ανάπτυξη του καρπού 12
1.1.6.1 Πρώιμη ανάπτυξη καρπού 12
1.1.6.2 Ώριμος πράσινος καρπός 14
1.1.6.3 Ωρίμανση του καρπού 14
1.2 Η Παρθενοκαρπία 15
1.2.1 Οι τρείς κύριες πηγές παρθενοκαρπίας στην τομάτα (pat-1, pat-2 pat-3/pat-4) 16
1.2.2 Μηχανισμός της παρθενοκαρπίας 17
1.2.3 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα 18
1.2.4 Περιβαλλοντικοί παράγοντες και παρθενοκαρπία 19
1.2.5 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας 19
1.3 Η Σακχαρόζη 20
1.3.1 Η Σημασία της σακχαρόζης στα φυτά 20
1.3.2 Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της σακχαρόζης 20
1.4 Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS) 21
1.4.1 Δομή του ενζύμου 21
1.4.2 Εντοπισμός του ενζύμου 21
1.4.3 Σημασία του ενζύμου 22
1.4.4 Ρύθμιση του ενζύμου 22
1.4.4.1 Ρόλος της 2,6 διφώσφορο-φρουκτόζης 22
1.4.4.2 Ενδογενείς ρυθμοί 23
1.4.4.3 Εναλλαγές φωτός/σκότους 24
1.4.4.4 Ωσμωτική καταπόνηση 24
1.4.4.5 Καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών 25
1.4.4.6 Έλεγχος μέσω αντιστρεπτής πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης 25
1.4.4.7 Πρωτεϊνικά συσσωματώματα που περιλαμβάνουν την SPS 26
1.5 Οικογένειες SPS γονιδίων στα φυτά 27
1.5.1 Έκφραση των SPS γονιδίων 28
1.6 Σκοπός της εργασίας 28

2. Υλικά και Μέθοδοι **29**
2.1 Η διαδικασία του πειράματος 30
2.2 Η εκχύλιση του ενζύμου 30
2.3 Η μέτρηση της δραστικότητας της SPS 32
2.4 Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων 32
2.5 Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SPS 33

2.6 Οι ηλεκτροφορήσεις των μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών....33
2.7 Η ανοσοβιοχημική μελέτη....34
2.8 Ο ανοσοεντοπισμός της SPS....35

3. Αποτελέσματα....38
3.1 Ανοσοεντοπισμός της SPS....39
3.1.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm....39
3.1.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm....40
3.1.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού....42
3.1.4 Στάδιο αλλαγής χρώματος....43
3.1.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού....44
3.2 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων....45
3.3 Ο προσδιορισμός της *in vitro* δραστικότητας της SPS....46

4. Συζήτηση....47
4.1 Η SPS στους ένσπερμους καρπούς....48
4.2 Η SPS στους παρθενοκαρπικούς καρπούς....50

5. Συμπεράσματα....52

6. Βιβλιογραφία....54

Περίληψη

Στη μελέτη αυτή μελετήθηκε η συνθάση της φωσφοροσακχαρόζης (SPS) σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς τομάτας τύπου cherry, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Τα στάδια που επιλέχτηκαν 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 ανθήρων από κλειστά άνθη και την ακόλουθη εφαρμογή 50ppm β-ναφθοξυοξεικού οξέος. Για τη μελέτη του ενζύμου χρησιμοποιήθηκε ο ανοσοεντοπισμός της πρωτεΐνης και η εκτίμηση της δραστικότητας του ενζύμου σε εκχυλίσματα των καρπών από τα παραπάνω στάδια.

Η SPS εντοπίστηκε έντονα στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες σε όλα τα υπό μελέτη στάδια, τόσο στους παρθενοκαρπικούς όσο και στους ένσπερμους καρπούς. Στους ένσπερμους καρπούς η SPS εντοπίστηκε έντονα στα όργανα του εμβρύου και το ενδοσπέρμιο. Στον κεντρικό κύλινδρο του εμβρυακού ριζιδίου όμως, στο τελευταίο στάδιο της ανάπτυξής του, το σήμα όμως ήταν χαμηλότερο. Τέλος, η SPS 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 σύνθεση της σακχαρόζης γίνεται τόσο στους φωτοσυνθετικούς ιστούς του καρπού, όσο και στους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς.

Η δραστικότητα του ενζύμου ήταν 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. Μέρος της αυξημένης δραστικότητας του ενζύμου στα στάδια του ώριμου πράσινου καρπού και αλλαγής χρώματος μπορεί να συσχετιστεί με την υδρόλυση του αμύλου που συμβαίνει στα τελευταία στάδια της ανάπτυξης του καρπού.

Abstract

In the present study the activity and immunolocalization of sucrose phosphate synthase (SPS) 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 β-naphthoxyacetic acid on emasculated closed flowers.

SPS was heavily localized in vascular bundles of all organs examined of parthenocarpic and seeded fruits. In seeded fruits the SPS protein was also heavily localized in embryo organs and in the endosperm. The localization signal was however less intense in the central cylinder of embryonic root, in the last stage of its development, as well as in locular parenchyma and pericarp.

From immunolocalization pattern is prominent that sucrose synthesis occurs in photosynthetic as well as in non photosynthetic tomato fruit tissues.

Enzyme activity was higher in seeded than in parthenocarpic fruits. This evidence, combined with the immunolocalization pattern, points to the greater participation of embryonic tissues to the total SPS activity. However, a part of high enzyme activity observed in mature green and breaker fruits can be correlated to the massive starch hydrolysis which occurs in these stages.

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

1.1.2 Φυλογένεση - βοτανική ταξινόμηση και καταγωγή της τομάτας τύπου cherry

Σύμφωνα με τον Quiros (1974) υπάρχει μία φυλογενετική σειρά η οποία οδηγεί με αφετηρία έναν πρόγονο πριν την εμφάνιση του Solanum, στο *S. peruvianum*, μετά στο *S. hirsutum*, ακολούθως στο *S. lycopersicon* var. *cerasiforme* και τελικά στην καλλιεργούμενη τομάτα. Τα *S. pimpinellifolium, S. cheesmanii*, *S. 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 ανθήρων 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 ανθήρων, 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 αξίας της και στα ιδιαίτερα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά της. Άλλωστε, οι τομάτες cherry παρουσιάζουν υψηλότερη αναλογία σε ξηρά ουσία και μεγαλύτερο περιεχόμενο σε ολικά σάκχαρα, οργανικά οξέα, βιταμίνη C, ελεύθερα αμινοξέα, αντιοξειδωτικά (β-καροτίνη, λυκοπένιο) και φλαβονοειδή σε σχέση με τις μεγαλόκαρπες τομάτες (Hallman and Kobryń, 2003). Εκτός αυτού, εμφανίζουν και υψηλότερη περιεκτικότητα σακχάρων (γλυκόζης και φρουκτόζης) και οργανικών οξέων (κιτρικό και μηλικό), τα οποία αποτελούν βασικούς παράγοντες στον προσδιορισμό της γλυκύτητας, της οξύτητας και γενικά της έντασης της γεύσης των καρπών της τομάτας (Raffo et al., 2002).

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

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

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

1.1.4 Βοτανικοί χαρακτήρες της τομάτας cherry

Βλαστός

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

όταν το φυτό κλαδεύεται σε μονοστέλεχο σύστημα (Ολύμπιος, 2001).

Φύλλα

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

Άνθη-ταξιανθίες

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

Σπέρματα

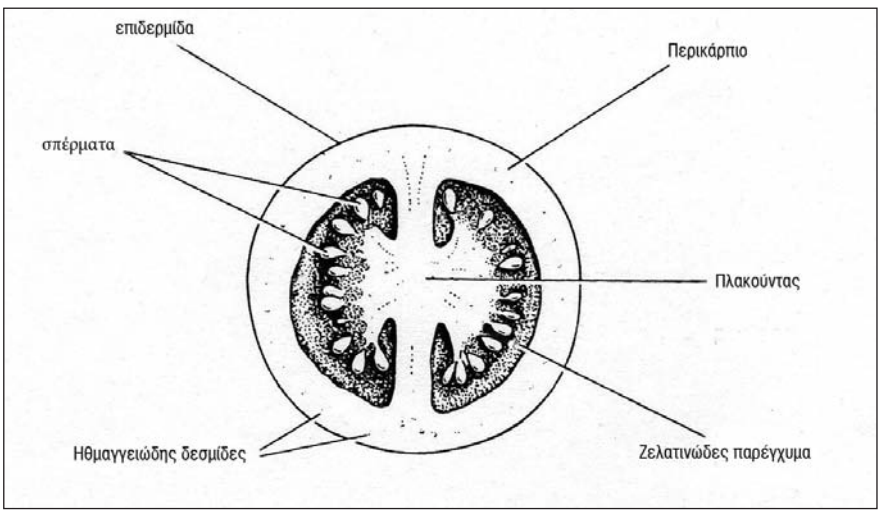
Το βάρος των σπερμάτων δεν φαίνεται να διαφέρει μεταξύ των ποικιλιών cherry και των μεγαλόκαρπων ποικιλιών. Το βάρος 1000 σπόρων της cherry είναι περίπου 2.1g ενώ στις μεγαλόκαρπες τομάτες είναι περίπου 2.2g (Xuan, 1999).

Καρπός

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



Εικόνα 1: Ανατομία δίχωρου καρπού τομάτας τύπου cherry (Ho and Hewitt, 1986).

Περικάρπιο

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

Τα κύτταρα του περικαρπίου υφίστανται ανατομικές αλλαγές κατά τη διάρκεια της πρώτης

εβδομάδας σχηματισμού του καρπού. Μία έως δύο μέρες μετά τη γονιμοποίηση, τα μικρά χυμοτόπια μέσα σε κάθε κύτταρο ενώνονται ώστε να σχηματιστεί ένα κεντρικό χυμοτόπιο (Mohr and Stein, 1969). Στις ακόλουθες δύο εβδομάδες το κυτταρόπλασμα μειώνεται σε ένα λεπτό περιφερειακό στρώμα. Εντωμεταξύ πραγματοποιείται και η αρχική φάση διαχωρισμού του κυτταρικού τοιχώματος. Ο διαχωρισμός αρχίζει από τις περιοχές που συνδέονται τα γειτονικά κύτταρα και συνεχίζεται κατά μήκος των μεσοτοιχίων. Τα πλασμοδέματα που αλληλοσυνδέουν το κυτόπλασμα των γειτονικών κυττάρων είναι πολύ μικρά. Όλα τα οργανίδια μπορούν να παρατηρηθούν μέσα στα κύτταρα αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και το πλασμάλημμα και ο τονοπλάστης παραμένουν άθικτοι (Mohr and Stein, 1969) και φυσιολογικώς ενεργοί (Vickery and Bruinsma, 1973) στη διάρκεια ωρίμανσης του καρπού. Τα μιτοχόνδρια, οι χρωμοπλάστες και το αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο, διατηρούνται και στους ώριμους καρπούς (Crookes and Grierson, 1983). Τα πλαστίδια περιέχουν άμυλο και διαθέτουν τυπικές περιοχές grana και θυλακοειδείς μεμβράνες στρώματος (Harris and Spurr, 1969). Στους πράσινους καρπούς τα επιδερμικά κύτταρα τείνουν να έχουν λιγότερο άμυλο σε σχέση με αυτά του εσωτερικού παρεγχύματος (Rosso, 1968). Ο κύριος όγκος της κυτταρικής διαίρεσης στο περικάρπιο πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της πρώτης εβδομάδας μετά την άνθηση (Davies and Cocking, 1965) αν και οι Asahira et al. (1968) αναφέρουν πως κυτταρικές διαιρέσεις μπορεί να υπάρξουν και κατά τη δεύτερη εβδομάδα. Ωστόσο, στο *L. pimpinellifolium* κυτταρική διαίρεση παρατηρήθηκε σε όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού (Houghtalin, 1935).

Το εξωκάρπιο

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

Το ζελατινώδες παρέγχυμα

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

Ο πλακούντας

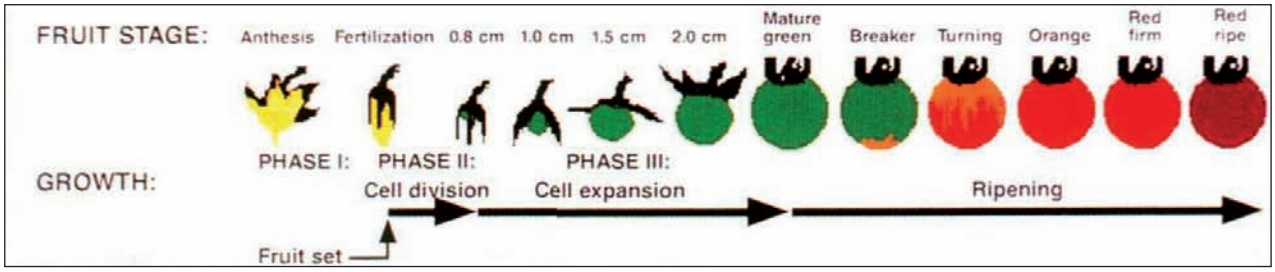
Ο πλακούντας είναι η περιοχή της ωοθήκης από την οποία εκφύονται οι σπερματικές βλάστες με τις οποίες συνδέονται μέσω του ομφαλικού ιμάντα. Μετά τη γονιμοποίηση του ωοκυττάρου εξελίσσονται σε σπέρματα. Ο πλακούντας θεωρείται ο ιστός που τροφοδοτεί τις σπερματικές βλάστες με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία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

Ηθμαγγειώδεις δεσμίδες

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

1.1.6 Η ανάπτυξη του καρπού

Στις σύγχρονες ποικιλίες τομάτας η ανάπτυξη του καρπού αρχίζει με τη γονιμοποίηση. Το νωπό βάρος της 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-τρείς 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 τρείς 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.



Εικόνα 2. Ανάπτυξη του καρπού της τομάτας (Gillaspy et al., 1993)

1.1.6.1 Πρώιμη ανάπτυξη καρπού

Σύμφωνα με τους Gillaspy et al. (1993) η πρώιμη ανάπτυξη του καρπού μπορεί επιπλέον να διαχωριστεί σε τρείς φάσεις (*Εικόνα 2*). Η πρώτη φάση περιλαμβάνει την ανάπτυξη της ωοθήκης καθώς και τη διαδικασία της επιλογής της καρπόπτωσης ή συνέχισης των κυτταρικών διαιρέσεων, δηλαδή την καρπόδεση. Στη δεύτερη φάση η ανάπτυξη του καρπού βασίζεται κυρίως σε κυτταρικές διαιρέσεις, ενώ στη τρίτη πραγματοποιείται αύξηση του μεγέθους των κυττάρων έως ότου ο καρπός αποκτήσει το τελικό του μέγεθος (Ho and Hewitt, 1986). Πιο συγκεκριμένα:

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

Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης η εξέλιξη της καρπόδεσης έπεται την επιτυχημένη ολοκλήρωση της επικονίασης και γονιμοποίησης. Η γονιμοποίηση που ακολουθεί την επικονίαση προϋποθέτει τη βλάστηση της γύρης, τη διείσδυση και ανάπτυξη του γυρεοσωλήνα μέσα στο 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) (*Εικόνα 3*).

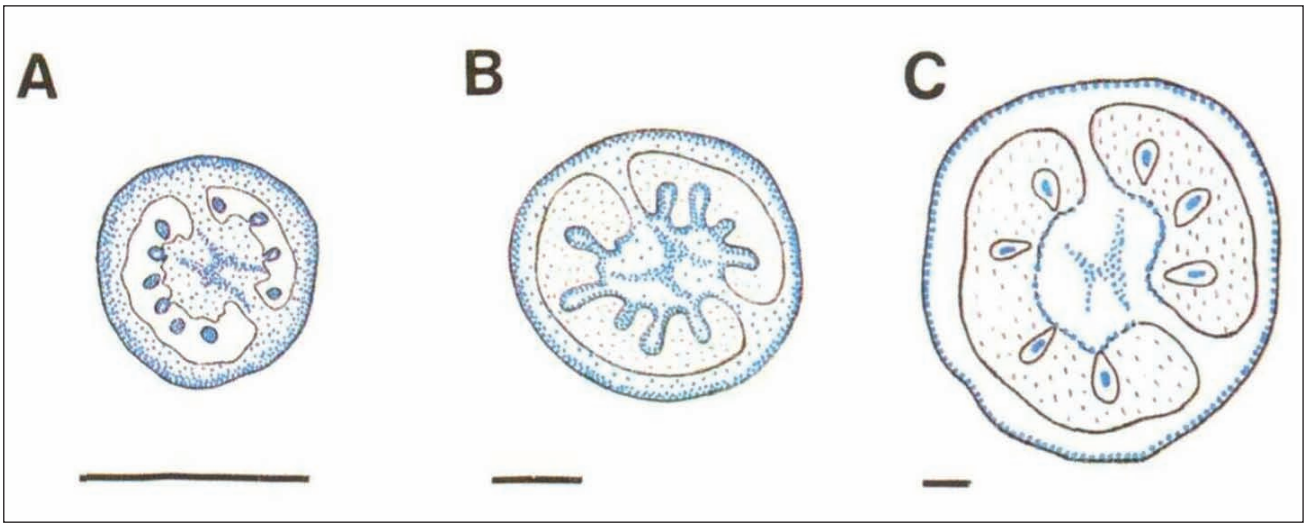
Στα πολύ πρώιμα στάδια της φάσης αυτής η μιτωτική δραστηριότητα είναι πιο έντονη στο εξωτερικό περικάρπιο σε σχέση με το εσωτερικό. Οι κυτταρικές διαιρέσεις στα αναπτυσσόμενα σπέρματα γίνονται κυρίως στις περιφερειακές στιβάδες των χιτώνων παρά στο έμβρυο.

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) (*Εικόνα 3*). Στον καρπό της τομάτας,

ο όγκος των κυττάρων στον πλακούντα, στο ζελατινώδες παρέγχυμα και στο εσωτερικό περικάρπιο μπορεί να δεκαπλασιαστεί, αλλά τα κύτταρα που αποτελούν το εξωτερικό περικάρπιο επειδή συνεχίζουν να διαιρούνται αυξάνονται λιγότερο.

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



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

1.1.6.2 Ώριμος πράσινος καρπός

Στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού τα παρεγχυματικά κύτταρα του περικαρπίου έχουν διάμετρο μεταξύ 300-500μm 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_3 φυτού. Επίσης, στους χλωροπλάστες του ανώριμου καρπού μπορούν να διακριθούν και αμυλόκοκκοι αλλά μειώνονται όσο η ανάπτυξη πλησιάζει τον πράσινο ώριμο καρπό. Οι χλωροπλάστες επίσης περιέχουν τις χρωστικές του καρπού, τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Οι επικρατέστερες χρωστικές στους πράσινους καρπούς αποτελούνται από ένα μίγμα χλωροφύλλης α και β. Αντίθετα, τα καροτενοειδή απαντούν σε μικρές ποσότητες. Μάλιστα, περισσότερο από το μισό αυτών αποτελούν οι ξανθοφύλλες, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια του πράσινου ώριμου καρπού, ενώ καθώς ο καρπός ωριμάζει η αναλογία αυτή μειώνεται (Rabinowitch et al., 1975). Τέλος, υπάρχουν α- και β- καροτένια σε μικρές όμως συγκεντρώσεις (Meredith and Purcell, 1966).

1.1.6.3 Ωρίμανση του καρπού

Η μετατροπή του καρπού της τομάτας από το ώριμο πράσινο στάδιο στο πλήρως ώριμο κόκκινο περιλαμβάνει δραματικές αλλαγές στο χρώμα, στη σύνθεση, στο άρωμα, στη γεύση και στη δομή

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

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

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

1.2 Η Παρθενοκαρπία

Σε κανονικές συνθήκες ανάπτυξης, η επαγωγή της καρπόδεσης εξαρτάται από την επιτυχημένη ολοκλήρωση της επικονίασης και της γονιμοποίησης. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, ο φυσιολογικός σχηματισμός του καρπού μπορεί να πραγματοποιηθεί ανεξάρτητα της επικονίασης και της γονιμοποίησης. Αυτό μπορεί να εξασφαλιστεί με δύο τρόπους, την απόμιξη και την παρθενοκαρπία. Η απόμιξη είναι η αγενής αναπαραγωγή μέσω εμβρύων (Nogler, 1984), που οδηγεί στο σχηματισμό κλώνων (Koltunow and Grossniklaus, 2003). Αντίθετα, παρθενοκαρπία είναι η ανάπτυξη της ωοθήκης σε άσπερμο καρπό χωρίς να μεσολαβήσουν η επικονίαση και η γονιμοποίηση (Lukyanenko, 1991). Η παρθενοκαρπία μπορεί να είναι φυσική αλλά μπορεί να επαχθεί και τεχνητά με την εφαρμογή μιας ποικιλίας ορμονών (Gustafson, 1936, 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. (Varoquaux et al., 2000). Εκτός αυτού, η ζωή ενός παρθενοκαρπικού καρπού είναι μεγαλύτερη σε σχέση με έναν ένσπερμο, καθώς τα σπέρματα παράγουν ορμόνες που σταδιακά επιφέρουν τη γήρανση του. Παρά τα πλεονεκτήματα που μπορεί να παρουσιάζει ένας άσπερμος καρπός η χρήση του φαινομένου της παρθενοκαρπίας στη γεωργία είναι περιορισμένη. Άλλωστε, μεταλλάξεις που δημιουργούν παρθενοκαρπικούς καρπούς συχνά παρουσιάζουν πλειοτροπικές δράσεις αλλά και συνδέονται με ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά όπως αρσενική και θηλυκή στειρότητα ή μικρότερους και κακοσχηματισμένους καρπούς (Varoquaux et al., 2000).

1.2.1 Οι τρείς κύριες πηγές παρθενοκαρπίας στην τομάτα (*pat-1*, *pat-2 pat-3/pat-4*)

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

Το γονίδιο *pat-1*

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

Η μετάλλαξη *pat-1* παράγει καρπούς τομάτας με βάρος και μέγεθος που βρίσκεται περίπου στα δύο τρίτα ενός κανονικού καρπού (Bianchi and Soressi, 1969; Falavinga et al., 1978; Philouze and Pecaut, 1986).

Το γονίδιο *pat-2*

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

Τα γονίδια (*pat-3/pat-4*).

Η σειρά *RP75/59* στην τομάτα βρέθηκε στους απογόνους της διασταύρωσης μεταξύ *'Atom'* x *'Bubjekosoko'*. Σε αυτή την περίπτωση παρατηρήθηκε υψηλό επίπεδο παρθενοκαρπίας δίχως εμφανή αποτελέσματα στο μέγεθος και στην εμφάνιση του καρπού (Philouze, 1983b, 1985). Ωστόσο, σε αυτήν την καινούργια πηγή παρθενοκαρπίας βρέθηκε μία συσχέτιση ανάμεσα στην καρπόδεση και στο μέγεθος των καρπών μέσα στην ίδια ταξιανθία ή και φυτό: όταν στο ίδιο φυτό υπάρχουν μαζί ένσπερμοι και άσπερμοι καρποί, οι ένσπερμοι είναι μεγαλύτεροι σε μέγεθος (Philouze, 1989). Στη σειρά *RP75/59* η παρθενοκαρπία είναι προαιρετική, συνεπώς για να αποκτηθούν άσπερμοι καρποί θα πρέπει τα φυτά να αναπτυχθούν σε συνθήκες που δυσκολεύουν την επικονίαση ή/και τη γονιμοποίηση, ή τα άνθη θα πρέπει πρώτα να ευνουχισθούν.

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_1 και του GA_3 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 συνεχής έκφραση του GA_{20}-ox1 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_{19} και GA_{20} στις ωοθήκες άγριου τύπου. Αντίθετα, στις ωοθήκες *pat-1*, τα GA_{20} και το ενεργό GA_1 βρέθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις (Olimpieri et al., 2007). Το μονοπάτι βιοσύνθεσης του GA φαίνεται να αποτελεί το κλειδί για την έναρξη σχηματισμού του άσπερμου καρπού και στα τρία μεταλλάγματα (*pat-1, pat-2 pat-3/pat-4*).

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

Εκτός των γιββερελλινών και η αυξίνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη παρθενοκαρπικών καρπών. Γενικά η αυξίνη συντηρεί το επίπεδο της GA_3 οξειδάσης και συνεπώς της βιοσύνθεσης GA_1 (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 ψευδοέμβρυου 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 ψευδοέμβρυων συσχετίζεται με την ανάπτυξη του καρπού και βρίσκεται υπο τον έλεγχο του GA_3 και/ή του ουνικοναζολίου (uniconazole), ενός παρεμποδιστή της βιοσύνθεσης γιββερελλινών (Kataoka et al., 2003).

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

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

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

1.2.3 Η τεχνητή επαγωγή της παρθενοκαρπίας στην τομάτα

Σε αρχικές μελέτες, ο Gustafson (1936) ανέφερε πως κανονικού μεγέθους παρθενοκαρπικοί καρποί αναπτύχθηκαν μετά από χειρισμό των ύπερων με ινδολυλο-3-προπιονικό οξύ, φαινυλοξεικό οξύ, IAA και IBA. Σε σύγκριση με το IAA το 4-χλωροφαινόξυ-οξεικό 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-ναφθυλοξεικό οξύ μπορεί να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε συγκεντρώσεις 40-60pmm. Επίσης, εφαρμογή βρίσκει το 2-(3-χλωροφαινόξυ) προπιονικό οξύ στα 25-40pmm μόνο για καλλιέργεια θερμοκηπίου και το N-m-τολοφθαλιμικό οξύ 0.1-0.5% με καθολικό ψεκασμό όταν τα φυτά έχουν αναπτύξει 2-3 ταξικαρπίες, όπου η καθεμία έχει 2-3 ανοικτά άνθη (Thomas, 1982). Το 4- χλωροφαινόξυ-οξεικό οξύ, με προτεινόμενη συγκέντρωση τα 15-50pmm (Τα 15pmm 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 εξαρτάτο από το γονότυπου των φυτών. Η παρθενοκαρπία εμφανίστηκε με μεγαλύτερη συχνότητα σε μεγάλους καρπούς που προέρχονταν από πολύχωρες ωοθήκες, ενώ ήταν μικρότερη σε γονότυπους με μικρούς καρπούς και ωοθήκες με λιγότερες χώρους.

1.2.5 Διαφορές μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας

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

Το νωπό βάρος των καρπών που προέρχονται από γενετική παρθενοκαρπία είναι το μισό ή τα δύο τρίτα των ένσπερμων καρπών (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 Σακχαρόζη

Οι υδατάνθρακες αποτελούν μια από τις πιο άφθονες ομάδες οργανικών συστατικών του φυτικού βασιλείου. Απαντούν σε διάφορες μορφές: μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, ολιγοσακχαρίτες, πολυσακχαρίτες καθώς και τα παράγωγα τους. Ο δισακχαρίτης σακχαρόζη είναι το τελικό προϊόν καθήλωσης του άνθρακα κατά τη διάρκεια της φωτοσυνθετικής λειτουργίας. Η σακχαρόζη αποτελεί ένα μη αναγωγικό, γλυκείας γεύσεως, πολύ διαλυτό στο νερό μόριο. Το μόριο της σακχαρόζης έχει υψηλή ελεύθερη ενέργεια υδρόλυσης (ΔGo = - 7.0 Kcal mol^{-1}) το οποίο αποτελεί και το υψηλότερο για γλυκοσιδικό δεσμό (Avigad and Dey, 1997).

1.3.1 Η Σημασία της σακχαρόζης στα φυτά

Η σακχαρόζη αποτελεί το κύριο προϊόν της φωτοσύνθεσης που διακινείται από τα φύλλα με σκοπό να τροφοδοτήσει το υπόλοιπο φυτό με άνθρακα και ενέργεια, απαραίτητα για την ανάπτυξη και το σχηματισμό αποθησαυριστικών ουσιών όπως το άμυλο και τα λίπη (Lunn and Furbank, 1999). Άλλωστε, η σακχαρόζη από μόνη της αποτελεί την κύρια αποθησαυριστική ουσία σε ορισμένα φυτά όπως στα στελέχη του ζαχαροκάλαμου (*Saccharum officinarum*), στις ρίζες του τεύτλου (*Beta bulgaris*) και στους καρπούς πολλών ειδών. Επίσης, τα φυτικά κύτταρα συσσωρεύουν σακχαρόζη ως αποτέλεσμα της επικράτησης χαμηλών θερμοκρασιών (Strand et al., 2003) και ξηρασίας (Yang et al., 2001). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στο ότι η σακχαρόζη σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες και τις μεμβράνες σχηματίζοντας έτσι ένα ενεργειακό απόθεμα ικανό να προκαλέσει ταχύτατη έναρξη του μεταβολισμού όταν οι συνθήκες καταπόνησης βελτιωθούν (Lunn and MacRae, 2003). Επιπλέον, αναφέρεται ότι η σακχαρόζη διαδραματίζει και ρόλο σηματοδότη στα φυτά, έχοντας μάλιστα αποκαλυφτεί πως ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα (Ciereszko et al., 2001; Stitt et al., 2002), μεταφορείς (Vaughn et al., 2002) και αποθησαυριστικές πρωτεΐνες (Zourelidou et al., 2002). Η σακχαρόζη επηρεάζει και την έκφραση γονιδίων που συμμετέχουν στην κυτταρική διαίρεση και διαφοροποίηση (Gaudin et al., 2000; Blazquez et al., 1998). Εμπλέκεται επίσης και στον έλεγχο διαφόρων διαδικασιών ανάπτυξης όπως η επαγωγή της άνθησης (Ohto et al., 2001; King et al., 2001), η διαφοροποίηση του αγγειωδών ιστών (Uggla et al., 2001), η ανάπτυξη των σπερμάτων (Iraqi and Tremblay, 2001) και η συσσώρευση αποθηκευτικών ουσιών (Rook et al., 2001; Davoren et al., 2002). Γι' αυτό το λόγο, η σημασία της σακχαρόζης δεν περιορίζεται μόνο ως κυτταρικό «καύσιμο» για την ανάπτυξη του φυτού αλλά είναι πιθανό να διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τύχη της (Lunn and MacRae, 2003).

1.3.2 Το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της σακχαρόζης

Ο σχηματισμός της σακχαρόζης, μια διαδικασία η οποία πιστεύεται ότι απαντάται μόνο στα φυτά, στα κυανοβακτήρια και σε ορισμένα πρωτεοβακτήρια (Chua et al., 2008), βασίζεται στη δράση των παρακάτω κυτοπλασματικών ενζύμων: της συνθάσης της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS) και της φωσφατάσης της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPP)

Το ένζυμο της συνθάσης της 6-φωσφοροσακχαρόζης (EC 2.4.1.14) καταλύει την πρώτη αντίδραση στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της σακχαρόζης μεταφέροντας την ομάδα γλυκόζης από έναν ενεργοποιημένο δότη σακχάρων, όπως είναι η ουρίδινο διφώσφορο γλυκόζη (UDP-Glc), σε ένα δέκτη σακχάρων την 6-φωσφορο-φρουκτόζη με αποτέλεσμα τον σχηματισμό UDP και 6-φωσφορο-σακχαρόζης.

UDP-γλυκόζη + 6-φωσφορο-φρουκτόζη → 6-φωσφορο-σακχαρόζη + UDP

Την αντίδραση αυτή ακολουθεί η αποφωσφορυλίωση της 6-φωσφορο-σακχαρόζης ολοκληρώνοντας έτσι το μονοπάτι της βιοσύνθεσης της.

6-φωσφορο-σακχαρόζη + H_2O → Σακχαρόζη + Pi

Η υδρόλυση της 6-φωσφορο-σακχαρόζης πραγματοποιείται με τη δράση του ενζύμου φωσφατάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (EC 3.1.3.24). Με τον τρόπο αυτό εμποδίζεται η συσσώρευση της 6-φωσφορο-σακχαρόζης ενώ πραγματοποιείται μια ικανή παραγωγή σακχαρόζης ακόμη και με χαμηλά επίπεδα UDP-γλυκόζης και 6-φωσφορο-φρουκτόζης ή σε υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης (Avigad and Dey, 1997).

1.4 Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS)

Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS) καταλύει μία σημαντική και ρυθμιζόμενη αντίδραση στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της σακχαρόζης (Stitt et al., 1988). Στους φωτοσυνθετικούς ιστούς, όπως τα φύλλα, η δραστηριότητα του ενζύμου έχει μελετηθεί διεξοδικά τόσο ως προς τη λειτουργία του όσο και ως προς τη ρύθμισή του (Huber and Huber, 1996; Lunn and MacRae, 2003). Αντίθετα, ο ρόλος του ενζύμου στους μη φωτοσυνθετικούς ιστούς, όπου λαμβάνει χώρα η εισαγωγή και η αποδόμηση της σακχαρόζης, αρχίζει τώρα να γίνεται αντιληπτός (Park et al., 2008).

1.4.1 Δομή του ενζύμου

Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης είναι ένα διμερές ή τετραμερές μόριο με μονομερή 138kD (Bruneau et al., 1991). Όλες οι μέχρι σήμερα γνωστές SPS και όμοιες με SPS αλληλουχίες των φυτών έχουν δύο υψηλά συντηρημένες περιοχές οι οποίες παρουσιάζουν ισχυρή ομοιότητα με τη συνθάση της σακχαρόζης και τις άλλες γλυκοζυλοτρανφεράσες (Winter and Huber, 2000). Η περιοχή της γλυκοζυλοτρανφεράσης περιλαμβάνει την υποπεριοχή της σύνδεσης της UDP-γλυκόζης και μοτίβο σύνδεσης της 6-φωσφορο-γλυκόζης. Η SPS πιστεύεται πως διαθέτει την ίδια βασική τρισδιάστατη δομή όπως οι διάφορες γλυκοζυλοτρανφεράσες, σε ορισμένες εκ των οποίων η δομή έχει καθοριστεί με κρυσταλλογραφία ακτινών Χ (Gibson et al., 2002).

1.4.2 Εντοπισμός του ενζύμου

Οι Cheng et al. (1996) ανοσοεντόπισαν την SPS σε εγκάρσιες τομές φύλλων αραβόσιτου. Οι τομές από τα νεαρά πράσινα φύλλα (ηλικίας 7 έως 10 ημερών) έδειξαν ισχυρό σήμα κυρίως στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού και λιγότερο στα κύτταρα του μεσόφυλλου. Αντίθετα, στα ώριμα φύλλα (ηλικίας 6 εβδομάδων) το ένζυμο εντοπίστηκε εξίσου τόσο στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού όσο και στα κύτταρα του μεσόφυλλου.

Οι Lunn and Furbank (1997) μελέτησαν τον εντοπισμό του ενζύμου στα πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα των C_4 φυτών και βρήκαν πως στον αραβόσιτο (*Zea mays* L.) και στο φυτό *Atriplex spongiosa* F. Muell. η SPS εντοπίστηκε σχεδόν αποκλειστικά στα κύτταρα του μεσόφυλλου. Σε άλλα είδη, το ένζυμο εντοπίστηκε σε διάφορους ιστούς, με την ενεργότητα στα κύτταρα του παρεγχυματικού κολεού να κυμαίνεται από 5% της ολικής δραστηριότητας του φύλλου στο *Echinochloa crus-galli* (L.) Beav. και μέχρι 35% στο *Sorghum bicolor* Moench. Επίσης, οι Pagnussat et al. (2000) αναφέρουν διαφορετικά σημεία εντοπισμού της SPS πρωτεΐνης σε ιστούς από φωτοσυνθετικά και εκχλοιωτικά φύλλα ρυζιού (*Oryza sativa*). Ισχυρά σήματα εντοπίστηκαν στην επιδερμίδα και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και ασθενή στα κύτταρα του μεσόφυλλου στα εκχλοιωτικά φύλλα. Αντίθετα, στα ώριμα

φύλλα η παρουσία της SPS πρωτεΐνης στους ιστούς του μεσόφυλλου ήταν χαρακτηριστικά υψηλότερη σε σχέση με τα νεαρά και τα εκχλοιωτικά φύλλα, αλλά στα κύτταρα της επιδερμίδας και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες μόλις που ανιχνεύτηκε.

1.4.3 Σημασία του ενζύμου

Η σημασία του ενζύμου στη βιοσύνθεση της σακχαρόζης έχει επιβεβαιωθεί μέσω της χρήσης της μοριακής γενετικής. Υπερ-έκφραση του ενζύμου του καλαμποκιού σε φυτό τομάτας είχε ως αποτέλεσμα την αυξημένη παραγωγή σακχαρόζης, αυξημένη αναλογία σακχαρόζης/αμύλου στα φύλλα καθώς και αυξημένη φωτοσυνθετική ικανότητα, αποδεικνύοντας πως η SPS αποτελεί σημαντικό σημείο ελέγχου της φωτοσύνθεσης κυρίως κάτω από συνθήκες αυξημένου CO_2 υπό συνθήκες κορεσμού φωτισμού (Galtrier et al., 1993, 1995; Micallef et al., 1995). Αντιστρόφως, μείωση της έκφρασης της SPS στα φύλλα πατάτας μέσω καταστολής της μεταγραφής του ενζύμου οδήγησε στην παρεμπόδιση σχηματισμού σακχαρόζης και στην παράλληλη αύξηση της ροής του άνθρακα προς την κατεύθυνση σχηματισμού αμύλου και αμινοξέων (Krause, 1994). Μελέτες σε διαγονιδιακά φυτά έδειξαν ότι ο συντελεστής ελέγχου της SPS στη σύνθεση της σακχαρόζης βρέθηκε μεταξύ 0.3 μέχρι 0.45 (Krause, 1994; Geingenberger et al., 1995) αποκαλύπτοντας ότι η SPS αποτελεί ένα από τα ένζυμα που συμμετέχουν στον έλεγχο της βιοσύνθεσης σακχαρόζης. Μάλιστα, οι Winter and Huber (2000) αναφέρουν πως σε ορισμένες περιπτώσεις υπερ-έκφρασης του ενζύμου SPS δεν οδήγησαν σε αύξηση της δράσης του εξαιτίας μετα-μεταφραστικής ρύθμισης αυτού.

1.4.4 Ρύθμιση του ενζύμου

Το επίπεδο ενεργότητας του ενζύμου ελέγχεται από μια σειρά ρυθμιστικών μηχανισμών (Huber and Huber, 1992a).

Σε επίπεδο μεταβολικού ελέγχου το ένζυμο υφίσταται αλλοστερική ρύθμιση από την παρουσία ανόργανων φωσφορικών (Pi), που παρεμποδίζουν την αντίδραση, ενώ αντίθετα η 6-φωσφορο-γλυκόζη την προάγει. Γι' αυτό το λόγο, η αναλογία 6-φωσφορο-γλυκόζη/Pi στο κύτταρο παρουσιάζει σημαντική επίδραση στο επίπεδο κατάλυσης του ενζύμου (Doehlert and Huber, 1985; Stitt et al., 1988). Σε μία λοιπόν κατάσταση στην οποία τα Pi έχουν διαμερισματοποιηθεί και οι φωσφορικές εξόζες βρίσκονται σε υψηλά επίπεδα η SPS ενεργοποιείται επιταχύνοντας το σχηματισμό σακχαρόζης. Ωστόσο, εξαιτίας των πολύπλοκων μεταβολικών επιδράσεων που επιφέρει η στέρηση των Pi σε ολόκληρο τον κυτταρικό μεταβολισμό το αποτέλεσμα της παραπάνω κατάστασης στο ρυθμό σχηματισμού σακχαρόζης *in vivo* δεν μπορεί να προβλεφτεί με απλό τρόπο (Usuda and Shimogawara, 1993; Cakmak et al., 1994; Huber et al., 1994a). Παράλληλα, σε πολλές μελέτες βρέθηκε ότι στέρηση των Pi συνοδευόμενη από περιορισμό της ολικής ανάπτυξης του φωτοσυνθετικού ιστού δεν οδήγησε στη μείωση (ή την αύξηση) της συσσώρευσης σακχαρόζης και αμύλου σε μη φωτοσυνθετικές αποθηκευτικές περιοχές του φυτού, όπως ρίζες και σπέρματα.

Η έλλειψη ανόργανων φωσφορικών μπορεί να έχει και άμεσο αποτέλεσμα, ως μεταγραφικό σήμα, το οποίο αυξάνει τη σύνθεση της SPS (Usuda and Shimogawara, 1993; Huber et al., 1994a). Παρόμοια σηματοδοτική επίδραση για τα Pi αποδείχθηκε και για τη σύνθεση της ρυθμιστικής α-υπομονάδας της πρωτεΐνης PFP (Theodorou et al., 1992) και για τη χυμοτοπιακή όξινη φωσφατάση (VspB), (Sadka et al., 1994), δύο ένζυμα των οποίων οι δραστηριότητες εμπλέκονται στενά στο μεταβολισμό της σακχαρόζης.

1.4.4.1 Ρόλος της 2,6 διφώσφορο-φρουκτόζης

Ένας ακόμη παράγοντας που ρυθμίζει τη ταχύτητα της αντίδρασης σύνθεσης της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης αποτελεί η διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων της καθώς και οι συγκεντρώσεις τους στο κυτταρόπλασμα (Avigad and Dey, 1997). Στην περίπτωση αυτή, σημαντικό ρόλο στο

ρυθμό σχηματισμού σακχαρόζης έχει το έμμεσο ρυθμιστικό αποτέλεσμα της 2,6 διφωσφορο-φρουκτόζης (fructose-2,6-P_2). Η fructose-2,6-P_2 πιστεύεται πως διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ροής υδατανθράκων και στην κατανομή τους στους φυτικούς ιστούς. Ως μεταβολίτης του κυτταροπλάσματος, αποτελεί ισχυρό αναστολέα της διφωσφατάσης της 1,6-διφωσφορο-φρουκτόζης και συνεπώς μπορεί να διαμορφώσει το ρυθμό με τον οποίο παρέχονται οι φωσφορικές εξόζες προς το σχηματισμό σακχαρόζης. Βέβαια, πολλές μελέτες καταδεικνύουν μια αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ φυσιολογικών επιπέδων της fructose-2,6-P_2 στους ιστούς και αυτών της σύνθεσης σακχαρόζης. Οι παράγοντες που θα μπορούσαν να επιδράσουν στο μεταβολισμό της fructose-2,6-P_2 και στην αποδόμησή της, όπως λ.χ. η διάρκεια φωτεινών και σκοτεινών περιόδων, θα μπορούσαν επίσης να επηρεάσουν το ρυθμό σύνθεσης σακχαρόζης και την κατανομή του άνθρακα (Stitt, 1990; Huber et al., 1990).

1.4.4.2 Ενδογενείς ρυθμοί

Ημερήσιες διακυμάνσεις της δραστηριότητας του ενζύμου παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά στη σόγια. Οι αλλαγές αυτές ήταν ιδιαίτερα σημαντικές καθώς κανένα άλλο ένζυμο που συμμετέχει στη βιοσύνθεση σακχαρόζης δεν τις παρουσίαζε (Rufty et al., 1983; Huber et al., 1985). Το ημερήσιο πρότυπο της δραστικότητας της SPS σε βλαστικά όργανα φυτών σόγιας θερμοκηπίου και αγρού τυπικά παρουσιάζουν διπλό μέγιστο, με τη μία κορυφή στο πρώτο μέρος της φωτοπεριόδου και από μια δεύτερη κορυφή 12 ώρες αργότερα. Γι' αυτό άλλωστε και η δραστηριότητα του ενζύμου παρουσιάζεται συχνά μικρότερη κατά τις απογευματινές ώρες. Βέβαια, αποτελεί ενδιαφέρον το γεγονός ότι αλλαγές στη δραστηριότητα του ενζύμου κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου γενικά συμβάδιζαν με τις αλλαγές στο ρυθμό της διακίνησης των φωτοσυνθετικών προϊόντων (Huber et al., 1985). Ημερήσιες αλλαγές στη δραστικότητα της SPS παρατηρήθηκαν επίσης και σε πλήρως εκπτυγμένα φύλλα βαμβακιού, όπου και εκεί η δράση του ενζύμου βρέθηκε ότι συσχετίζεται θετικά με το ρυθμό της διακίνησης των φωτοσυνθετικών προϊόντων κατά τη διάρκεια της φωτοπεριόδου (Hendrix and Huber, 1986). Τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζουν την άποψη πως η δραστηριότητα της SPS συμβάλλει στον έλεγχο της ροής άνθρακα προς σακχαρόζη (Huber et al., 1985).

Η βάση διάκρισης ενός ενδογενούς ρυθμού ρύθμισης της δραστικότητας της SPS από τη ρύθμισή της μέσω κύκλων φωτός/σκότους είναι ότι στην πρώτη περίπτωση αλλαγές στη δραστικότητα του ενζύμου δε συμβαδίζουν αυστηρά με τις μεταβολές σκότους/φωτός. Επιπρόσθετα, οι ενδογενείς ρυθμοί διατηρούνται όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες παραμένουν σταθερές. Η ημερήσια διακύμανση της δραστικότητας του ενζύμου στα φύλλα σόγιας (Kerr et al., 1985) και τομάτας (Jones and Ort, 1997) έχει αποδειχθεί ότι διατηρείται κάτω από σταθερές περιβαλλοντικές συνθήκες, παρέχοντας ενδείξεις για τη ρύθμισή της από βιολογικά ρολόγια. Στην περίπτωση της σόγιας, η δραστηριότητα του ενζύμου διακυμάνθηκε σε μία περίοδο περίπου 12 ωρών σε συνθήκες είτε σταθερού φωτός ή εκτεταμένου σκοταδιού πράγμα που επιβεβαιώνει τη σχετική ανεξαρτησία της από τους κύκλους φωτός-σκότους (Kerr et al., 1985). Η βάση για τις μεταβολές της δραστικότητας της SPS έχει προταθεί ότι περιλαμβάνει σταθερή παρουσία της πρωτεΐνης ή μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις που επηρεάζουν μόνο τη μέγιστη καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου και όχι τις ρυθμιστικές ιδιότητες ή τις συγγένειες με τα υποστρώματα (Kerr et al., 1987). Η δραστικότητα λ.χ. της SPS στα φύλλα τομάτας που εκτέθηκαν σε συνεχές φωτισμό χαμηλής έντασης, διακυμάνθηκε με περίοδο περίπου 24 ωρών φανερώνοντας έναν κιρκαδικό ρυθμό (Jones and Ort, 1997) και η φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης θεωρήθηκε ως ο βιοχημικός μηχανισμός πίσω από αυτό το φαινόμενο. Οι φωσφατάσες της SPS πιστεύεται ότι ελέγχονται από κιρκαδικό ρολόι σε επίπεδο γονιδιακής έκφρασης (Jones and Ort, 1997). Ο κιρκαδικός ρυθμός που ελέγχει τη δραστικότητα του ενζύμου στην τομάτα μπορεί να επιβραδυνθεί με ολονύκτια έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία (Jones et al., 1998), αλλά όχι στο σόργο. Συνεπώς, είναι φανερό πως το σόργο και η τομάτα παρουσιάζουν ομοιότητα στο γεγονός πως η

δράση της SPS ελέγχεται από έναν ενδογενή ρυθμό, αλλά τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και ο μηχανισμός αυτής της ρύθμισης φαίνεται να είναι διαφορετικός για τα δύο αυτά είδη (Winter and Huber, 2000).

1.4.4.3 Εναλλαγές φωτός/σκότους

Σε πολλά είδη, αντίθετα με τη σόγια και την τομάτα, παρατηρούνται ταχύτατες και αναστρέψιμες αλλαγές της δραστικότητας της SPS εξαιτίας των εναλλαγών σκότους και φωτός. Στα φύλλα του σπανακιού η τροποποίηση της SPS (Walker et al., 1989), η οποία περιλαμβάνει την αντιστρεπτή φωσφορυλίωση της, έχει δειχθεί πως επηρεάζει τη συγγένειά της με την 6-φωσφορο-φρουκτόζη και τους αλλοστερικούς παράγοντες Glc-6-P (ενεργοποιητής) και Pi (αναστολέας) (Stitt et al., 1988). Γι αυτό, η ρύθμιση που προκαλούν οι εναλλαγές ημέρας/νύκτας στη δραστικότητα είναι παρατηρήσιμη. Η ρύθμιση της δραστικότητας της SPS μέσω του φωτός μπορεί να παρατηρηθεί σε μία ποικιλία ειδών αλλά υπάρχουν διαφορές στην έκταση με την οποία επηρεάζεται. Επίσης, πιστεύεται πως η ρύθμιση της δραστικότητας του ενζύμου μέσω του φωτός αποτελεί ένα μηχανισμό ρύθμισης της δυναμικότητας σύνθεσης σακχαρόζης σε σχέση με το ρυθμό φωτοσύνθεσης, διαδικασίας που περιλαμβάνει ακτινοβολία, CO_2 και άλλους παράγοντες (Winter and Huber, 2000).

1.4.4.4 Ωσμωτική καταπόνηση

Έχει βρεθεί ότι όταν φύλλα σπανακιού (Quick et al., 1989; Zrenner and Stitt, 1991; Toroser et al., 1997) ή κόνδυλοι πατάτας (Reimholz et al., 1994; Geigenberger et al., 1995) επωαστούν σε υπερτονικά διαλύματα μαννιτόλης ή σορβιτόλης ώστε να προαχθεί η ωσμωτική καταπόνηση παρατηρείται ταυτόχρονη ενεργοποίηση της SPS. Στο φυτό του φασολιού η κατάσταση ενεργοποίησης της SPS αυξήθηκε επίσης δραματικά (Castrillo, 1992) παρόλο που η ωσμωτική καταπόνηση οδηγεί σε αξιοσημείωτη μείωση της μέγιστης δραστικότητας της SPS (Vassey et al., 1989; Castrillo, 1992) γεγονός που φανερώνει ότι περισσότερες της μιας διαδικασίες υφίστανται ταυτόχρονα στο φυτό αυτό. Η ενεργοποίηση που υφίσταται το ένζυμο όταν βρεθεί κάτω από ωσμωτικές συνθήκες καταπόνησης οφείλεται στη φωσφορυλίωση μιας μοναδικής περιοχής αυτού στη Ser_{424} (Toroser et al., 1999). Είναι γνωστό πως η έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων ανταποκρίνεται στην καταπόνηση από ξηρασία και αλατότητα, περιλαμβάνοντας και γονίδια που κωδικοποιούν Ca^{+2} εξαρτώμενες πρωτεϊνικές κινάσες (Urao et al., 1994). Μία Ca^{+2} εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση επίσης εμφανίζεται να συμμετέχει στη διαδικασία ενεργοποίησης της ωσμωτικής καταπόνησης, αλλά πιθανόν διαχωρίζεται από τις κινάσες που έχουν κλωνοποιηθεί μέχρι σήμερα (Winter and Huber, 2000). Επίσης οι Winter and Huber (2000) αναφέρουν πως εάν η ενεργοποίηση της SPS ως αποτέλεσμα της ωσμωτικής καταπόνησης περιλαμβάνει μηχανισμό μεταγωγής σήματος τότε είναι πιθανό να αλληλοσχετίζεται με άλλα μονοπάτια. Μια ενδιαφέρουσα πιθανότητα είναι η χαμηλή θερμοκρασία και η ωσμωτική καταπόνηση (ξηρασία) να προκαλούν ενεργοποίηση της SPS μέσω ενός κοινού μηχανισμού. Είναι άλλωστε γνωστό πως η έκφραση ενός αριθμού γονιδίων μπορεί να προαχθεί από κοινού τόσο από τη ξηρασία όσο και από χαμηλή θερμοκρασία ακόμη και όταν οι συνθήκες καταπόνησης διαφέρουν μεταξύ τους (Liu et al., 1998). Ωστόσο, χρειάζεται ακόμη έρευνα προκειμένου εάν υφίσταται όντως τέτοιος κοινός μοριακός μηχανισμός που να ενεργοποιεί τη δραστικότητα της SPS (Winter and Huber, 2000). Γενικά η ωσμωτική καταπόνηση οδηγεί στην αύξηση των διαλυτών σακχάρων, ιδιαίτερα της σακχαρόζης και στη μείωση του αμύλου διότι προάγει τη σύνθεση σακχάρων και αποτρέπει τη σύνθεση αμύλου. Η συσσώρευση σακχαρόζης θα μπορούσε να παίξει άμεσο ρόλο στην ωσμωρύθμιση και θα μπορούσε επίσης να προάγει τον ταχύτατο μεταβολισμό των υδατανθράκων προς την παραγωγή ενέργειας όταν μειώνεται η καθήλωση του άνθρακα και υπάρχει μια μεταβολή της ροής του από την ανάπτυξη σε άλλες λειτουργίες (Iyer et al., 1998).

1.4.4.5 Καταπόνηση χαμηλών θερμοκρασιών

Προκειμένου τα φυτά να προσαρμοστούν στις χαμηλές θερμοκρασίες συχνά απαιτείται η συσσώρευση διαλυτών σακχάρων, με τη σακχαρόζη να αποτελεί το πιο κοινό και πιο άφθονο από αυτά (Steponkus and Lanphear, 1968; Kaurin et al., 1981; Guy et al., 1992). Η αυξημένη συσσώρευση σακχαρόζης σε φωτοσυνθετικούς (Jeong and Housley, 1990; Tongetti et al., 1990; Guy et al., 1992; Holaday et al., 1992) και μη φωτοσυνθετικούς (Geigenberger et al., 1995) ιστούς έχει συνδεθεί με την αύξηση της δραστικότητας της SPS. Τόσο στα φύλλα του σπανακιού όσο και στους κονδύλους πατάτας η αυξημένη μεγίστη δραστικότητα της SPS που παρατηρήθηκε λόγο έκθεσης σε ψύχος παραλληλίστηκε με μια αυξημένη παρουσία της πρωτεΐνης.

Αντίθετα, η αυξημένη δραστικότητα της SPS σε κονδύλους πατάτας εκτεθειμένους σε χαμηλές θερμοκρασίες συνδέθηκε με την εμφάνιση ενός νέου ισότυπου SPS (Reimholz et al., 1997). Έχει βρεθεί πως το φυτό της πατάτας περιέχει τέσσερεις ισότυπους SPS οι οποίοι διαφέρουν στο μέγεθος της υπομονάδας: SPS-1a (125kDa), SPS-1b (127kDa), SPS-2(135kDa) και SPS-3(145kDa). Οι τέσσερεις αυτοί ισότυποι έχουν διαφορετική κατανομή στους ιστούς αλλά τα SPS-1a/b αποτελούν τους πιο συχνά απαντώμενους.Έκθεση στο ψύχος οδήγησε σε μία αντιστρεπτή αύξηση στην SPS-1b που συνέπεσε με μία αλλαγή στις κινητικές ιδιότητες της SPS. Επειδή η SPS ρυθμίζεται από την παρουσία υποστρωμάτων in vivo, μεταβολές στις κινητικές ιδιότητες θεωρείται ότι παρέχουν έναν αποτελεσματικό μηχανισμό για τη διαφοροποίηση της καταλυτικής ιδιότητας του ενζύμου. Αντινοηματικά φυτά με 75% μείωση της έκφρασης της SPS μείωσε (10-40%) τη συγκέντρωση διαλυτών σακχάρων ως αντίδραση στη χαμηλή θερμοκρασία (Krause et al., 1998) αποδεικνύοντας πως η επί τις εκατό έκφραση της SPS δεν αποτελεί το μοναδικό παράγοντα ελέγχου της συσσώρευσης σακχαρόζης. Η αύξηση της SPS-1b, ως αντίδραση στην αποθήκευση στο ψύχος συνοδεύτηκε με μείωση της SPS-1a (Reimholz et al., 1997), που είναι σύμφωνη με την παρατήρηση πως η μέγιστη δραστικότητα της SPS δεν αυξήθηκε με την καταπόνηση. Είναι πιθανόν, δίχως να έχει αποδειχθεί, ότι οι SPS-1a και SPS-1b κωδικοποιούνται από το ίδιο γονίδιο, καθώς και οι δύο ισότυποι παρουσίασαν μείωση σε αντινοηματικά φυτά ενώ οι SPS-2 και -3 όχι (Krause et al., 1998). Εάν συμβαίνει αυτό τότε οι δύο αυτοί ισότυποι είναι δυνατόν να προέρχονται από διαφορετικό splicing ή κάποια μετα-μεταφραστική τροποποίηση. Ωστόσο, η φωσφορυλίωση δεν φαίνεται να αποτελεί τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση που εμπλέκεται σε αυτή την περίπτωση (Reimholz et al., 1997). Είναι επίσης πιθανόν να κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλλά σχεδόν πανομοιότυπα γονίδια.

1.4.4.6 Έλεγχος μέσω αντιστρεπτής πρωτεϊνικής φωσφορυλίωσης

Η SPS φωσφορυλιώνεται in vivo σε πολλαπλά κατάλοιπα σερίνης, αλλά φαίνεται πως σε τρεις θέσεις από αυτές μπορεί να προκληθεί ρύθμιση του ενζύμου κάτω από κατάλληλες συνθήκες (Winter and Huber, 2000). Οι τρείς αυτές θέσεις φωσφορυλίωσης πιστεύεται πως απαντούν στους βρόγχους της πρωτεΐνης και είναι η Ser_{158}, Ser_{424} και η Ser_{229} (Salvucci et al., 1995). Παρακάτω παρουσιάζεται μόνο η επίδραση της φωσφορυλίωσης στη θέση Ser_{158}.

Στα φύλλα του σπανακιού, η φωσφορυλίωση της Ser_{158} είναι αυτή που συμμετέχει στην απενεργοποίηση του ενζύμου στο σκοτάδι (McMichael et al., 1993). Κατά τους Huber et al. (1996) το κατάλοιπο αυτό συντηρείται μεταξύ των ειδών. Η φωσφορυλίωση της Ser_{158} μειώνει τη δραστικότητας της SPS μεταβάλλοντας τις συγγένειες με τα υποστρώματα και τους τροποποιητές δίχως να επηρεάζει τη μέγιστη καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου. Σημειακές μεταλλάξεις της Ser_{158} της SPS των φύλλων του σπανακιού επιβεβαίωσε το ρόλο του κατάλοιπου σερίνης στη ρύθμιση της δραστικότητας του ενζύμου τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Toroser et al., 1999). Διαγονιδιακά φυτά καπνού με μεταλλαγμένο ένζυμο στη θέση της Ser_{158} παρουσίαζε μια σχετικά αυξημένη κατάσταση ενεργοποίησης και δεν απενεργοποιείτο στο σκοτάδι. Αντίθετα, εισαγωγή μίας όξινης ομάδας στην 158 θέση στο διπλό μετάλλαγμα S157F/S158E παρήγε ένζυμο που δεν ενεργοποιείτο από το φως. Τα

αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν το ρυθμιστικό ρόλο της Ser_{158} ως την κυρία υπεύθυνη περιοχή για την in vivo απενεργοποίηση της SPS, και παρέχει ενδείξεις ότι η συνεισφορά της φωσφορυλίωσης είναι η εισαγωγή αρνητικού φορτίου σε αυτή τη θέση.

Μια από τις κύριες πρωτεϊνικές κινάσες που φωσφορυλιώνουν την Ser_{158} έχει οριστεί η PK_{III} η οποία τείνει να συν-απομονώνεται με την SPS (McMichael et al., 1995). Η PK_{III} είναι ανεξάρτητη της παρουσία του Ca^{+2} και έχει Mr 150kD. Η καταλυτική της υπομονάδα είναι 60kDa και αναγνωρίζεται από αντισώματα εναντίον της RKIN1, μιας ομόλογης της SNF1 των φυτών (Douglas et al., 1996). Ένα χαρακτηριστικό των κινασών που είναι όμοιες με την SNF1 είναι ότι συχνά ρυθμίζονται από φωσφορυλίωση και αυτό έχει αποδειχθεί για την PK_{III} (Winter and Huber, 2000). Ωστόσο, οι ίδιοι αναφέρουν πως δεν είναι γνωστό εάν η κατάσταση φωσφορυλίωσης και κατ' επέκταση η δράση της PK_{III} μεταβάλλεται *in vivo*. Εάν συμβαίνει αυτό, θα μπορούσε να συμβάλλει απευθείας στον έλεγχο της δραστικότητας της SPS.

Η ρύθμισης της καταλυομένης από την PK_{III} φωσφορυλίωσης /ανενεργοποίησης της SPS πιστεύεται ότι περιλαμβάνει μεταβολίτες και ιδιαίτερα την 6-φωσφορογλυκόζη (Weiner et al., 1992). Η 6-φωσφορογλυκόζη θα μπορούσε να δράσει είτε με την πρόσδεσή της στην αλλοστερική θέση της SPS είτε επιδρώντας κατευθείαν στην κινάση PK_{III}, πιθανόν διαμέσου μιας υποτιθέμενης ρυθμιστικής θέσης που πιστεύεται ότι συνδέεται με την καταλυτική θέση των 60kDa. Η μεταβολική ρύθμιση της κινάσης/ων που δρουν στην SPS θα μπορούσε να ερμηνεύσει τη θετική συσχέτιση που παρατηρήθηκε μεταξύ της κατάστασης ενεργοποίησης της SPS και της αναλογίας της 6-φωσφορογλυκόζης σε κονδύλους πατάτας σε *in vivo* κατάσταση (Giegenberger et al., 1998).

Η φωσφορορυλιωμένη στη θέση Ser_{158} SPS μπορεί να αποφωσφορυλιωθεί και να ενεργοποιηθεί *in vitro* από την καταλυτική υπομονάδα φωσφατασών του τύπου 2A, αλλά όχι από την πρωτεϊνική φωσφατάση τύπου 1, (PP2A) (Siegl et al., 1990). Ωστόσο, πιθανότατα οι PP2A να υφίστανται *in vivo* ως ολιγομερείς πρωτεΐνες με την καταλυτική υπομονάδα 35kDa να είναι συνδεδεμένη με μία ή και περισσότερες ρυθμιστικές υπομονάδες.

Μία από τις ενδιαφέρουσες ρυθμιστικές ιδιότητες της PP2A που ενεργεί στην SPS είναι η παρεμπόδιση από τα ανόργανα φωσφορικά (Weiner et al., 1992). Ενδιαφέρον προκαλεί το γεγονός ότι η ενεργότητα και οι ρυθμιστικές ιδιότητες της SPS-PP2A φαίνεται να αλλάζουν με το χειρισμό φωτός/σκότους των φύλλων. Το ένζυμο στα φωτισμένα φύλλα παρουσιάζει ελαφρώς υψηλότερη ενεργότητα και πολλαπλάσια μείωση της ευαισθησίας στην παρεμπόδιση από τα ανόργανα φωσφορικά (Weiner et al., 1993).

Η μοριακή βάση αυτής της μεταβολής των ιδιοτήτων δεν είναι γνωστή, αλλά εμπλέκει τη σύνθεση κυτοπλασματικών πρωτεϊνών (Weiner et al., 1992; Weiner et al., 1993).

Η αποφωσφορυλίωση της SPS από τις PP2A μπορεί επίσης να επηρεαστεί και από αμινοξέα. Έχει παρατηρηθεί πως η ενεργοποίηση της SPS από το φως σε αποκομμένα φύλλα μπορεί να μειωθεί με τη χορήγηση αμινοξέων μέσω του ρεύματος της διαπνοής. Παρεμπόδιση της δραστικότητας της SPS-PP2A από αμινοξέα έχει παρατηρηθεί και *in vitro* (Huber et al., 1996).

1.4.4.7 Πρωτεϊνικά συσσωματώματα που περιλαμβάνουν την SPS

Σύμφωνα με τον Srere (1987) υπάρχουν ενδείξεις από ποικίλα συστήματα ότι διαλυτά ένζυμα συχνά υφίστανται σε διακριτά συσσωματώματα με άλλα ένζυμα του ίδιου βιοχημικού μονοπατιού. Σε ορισμένες μάλιστα περιπτώσεις ένζυμα που καταλύουν διαδοχικές αντιδράσεις συνδέονται σε συσσωμάτωμα με τροποποιημένες φυσικές και/ή καταλυτικές ιδιότητες (Gaertner, 1978; Anderson et al., 1995). Εξαιτίας του υψηλού ιξώδους του κυτοπλάσματος εκτιμάται πως η κίνηση των μεταβολιτών μέσω διάχυσης συναντά ισχυρή παρεμπόδιση (Clegg, 1992) και γι' αυτό το λόγο κάποιου είδους «τάξη» των μακρομορίων στο κυτόπλασμα ίσως είναι ουσιώδης για αποτελεσματικό μεταβολισμό. Η SPS θα μπορούσε επίσης να σχηματίσει συσσωμάτωμα με την φωσφατάση της 6-φωσφο-

ροσακχαρόζης (SPP). Η ύπαρξη τέτοιων συσσωμάτων ενισχύεται από πολλαπλές ενδείξεις που σχετίζονται με τη συμετανάστευση της SPS και της SPP κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης μη μετουσιωμένων πρωτεϊνών (Echeverria et al., 1997) και τη διέγερση της δραστικότητας της SPS και της μειωμένης παρεμπόδισης από τα ανόργανα φωσφορικά παρουσία της SPP (Salerno et al., 1996; Echeverria et al., 1997).

1.5 Οικογένειες SPS γονιδίων στα φυτά

Τα πρώτα γονίδια SPS που κλωνοποιήθηκαν προήλθαν από το καλαμπόκι (Worrell et al., 1991) και το σπανάκι (*Spinacea oleracea*; Klein et al., 1993; Sonnewald et al., 1993). Ακολούθησε κλωνοποίηση και άλλων SPS γονιδίων από 20 περίπου φυτά (κυρίως δικοτυλήδονα) όπως επίσης και κυανοβακτήρια (Lunn and MacRae, 2003). Καθώς προχωρούσε η κατάθεση νέων νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του ενζύμου από όλο και περισσότερα είδη, προέκυψε η ιδέα κατηγοριοποίησης των αλληλουχιών σε δύο ομάδες, μία ομάδα από τα δικοτυλήδονα και μία από τα μονοκοτυλήδονα. Βασισμένοι σε αναλύσεις υβριδισμού αρχικά υιοθετήθηκε η άποψη πως κάθε είδος περιείχε ένα μόνο SPS γονίδιο (Worrell et al., 1991; Valdez-Alarcon et al., 1996). Ωστόσο, οι Sugiharto et al. (1997) κλωνοποίησαν δύο διαφορετικά cDNA SPS από ζαχαροκάλαμο, ένα από τα οποία παρουσίαζε μεγάλη ομοιότητα με το γονίδιο του καλαμποκιού, ενώ το άλλο κωδικοποιούσε μια μικρότερη πρωτεΐνη που έδειχνε να έχει ομοιότητα με τα SPS δικότυλων φυτών που ήταν γνωστά μέχρι τότε. Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειχναν ότι τουλάχιστον κάποια φυτά περιέχουν πολλαπλά γονίδια SPS και διαφωνούσαν με μία φυλογένεια βασισμένη σε διαχωρισμό δικοτυλήδονων-μονοκοτυλήδονων (Castleden et al., 2004).

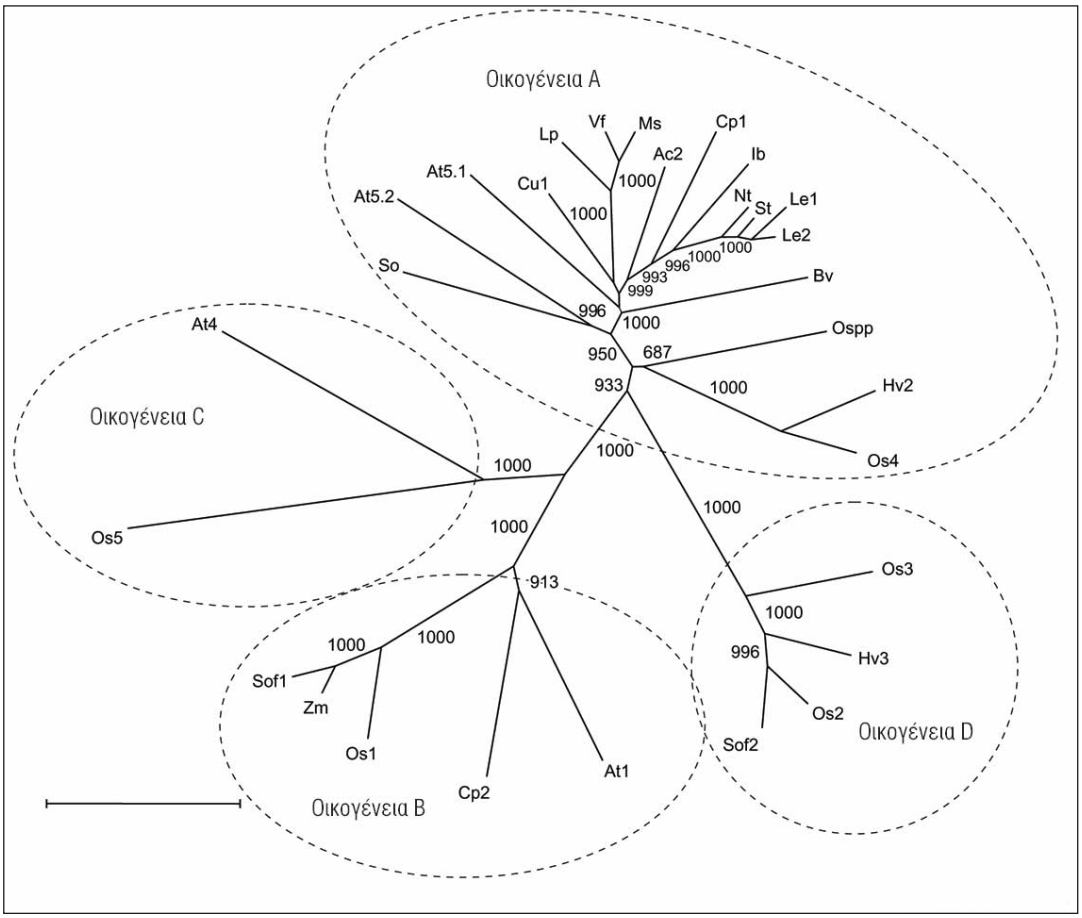
Οι Langenkämper et al. (2002) αναλύοντας τις αλληλουχίες όλων των γνωστών SPS ανακάλυψαν πως αυτές συναθροίζονται σε τρεις διαφορετικές οικογένειες, τις οποίες και ονόμασαν A,B και C. Σε αυτές προστέθηκε και η D οικογένεια η οποία περιλαμβάνει αλληλουχίες που ανήκουν μόνο στην οικογένεια *Poaceae* (Εικόνα 3). Μάλιστα, στην D οικογένεια οι πρωτεΐνες είναι μικρότερες από εκείνες των υπολοίπων οικογενειών με μοριακές μάζες 108 - 109 kD έναντι 114 – 119 kD (Castleden et al., 2004).

Μέχρι σήμερα τρία διαφορετικά γονίδια SPS έχουν εκφραστεί στα φύλλα του φυτού *Citrus unshiu* (Komatsu et al., 1996) και τέσσερα στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (SPS1, At1g04920; SPS4, At4g10120; SPS5a, At5g11110; SPS5b, At5g20280) (Langenkämper et al., 2002). Τόσο το *Citrus unshiu* όσο και το *Arabidopsis thaliana* (SPS5a και 5b) περιλαμβάνουν γονίδια που ανήκουν στην A οικογένεια, αλλά και τα δύο είδη έχουν από ένα γονίδιο της οικογένειας B και C.

Οι Lunn and MacRae (2003) υπέθεσαν πως όλα τα ανώτερα φυτά περιλαμβάνουν τουλάχιστον έναν αντιπρόσωπο από κάθε SPS οικογένεια στο γένωμα τους και ότι το μέλος κάθε οικογένειας εκφράζεται παρόλο που κάποιος ισόμορφος μπορεί να κυριαρχεί.

Οι περισσότερες από τις διαθέσιμες αλληλουχίες δικότυλων φυτών ανήκουν στην A οικογένεια. Για παράδειγμα, το φυτό της τομάτας έχει δύο γονίδια SPS στην οικογένεια αυτή. Επίσης, τα περισσότερα από τα διαθέσιμα γονίδια SPS των μονοκότυλων φυτών ανήκουν στην B οικογένεια εκτός από εκείνο της μπανάνας (*Musa acuminata*) που ανήκει στην A (Εικόνα 3).

Οι περισσότερες προσπάθειες υπερ-έκφρασης του ενζύμου της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης σε διαγονιδιακά φυτά έγιναν με τη χρήση γονιδίων είτε από την B οικογένεια του καλαμποκιού (Baxter et al., 2001; Laporte et al., 2001; Strand et al., 2003) είτε από την A οικογένεια του σπανακιού (Lunn et al., 2003). Οι Lunn and MacRae (2003) αναφέρουν πως ετερόλογη έκφραση του γονιδίου της B οικογένειας του καλαμποκιού σε δικότυλα φυτά, όπου η A οικογένεια πιθανόν κυριαρχεί, αποτελεί την πλέον επιτυχημένη περίπτωση αυξήσεως της δραστηριότητας της SPS με αναφορές μάλιστα αυξήσεως της απόδοσης και της ανθεκτικότητας στον παγετό (Lunn et al., 2003).



Εικόνα 3: Φυλλογενετικό δέντρο από τις SPS. Οι SPS φαίνεται ότι ανήκουν σε τρεις κύριες οικογένειες (A, B, C) και πιθανολογείται και μία τέταρτη (D). Από Lunn and MacRae (2003).

Επίσης, και η έκφραση της A οικογένειας του SPS γονιδίου του σπανακιού σε φυτά βαμβακιού έχει δείξει πως αυξάνει την ποσότητα και την ποιότητα της ίνας (Haigler et al., 2001).

1.5.1 Έκφραση των SPS γονιδίων

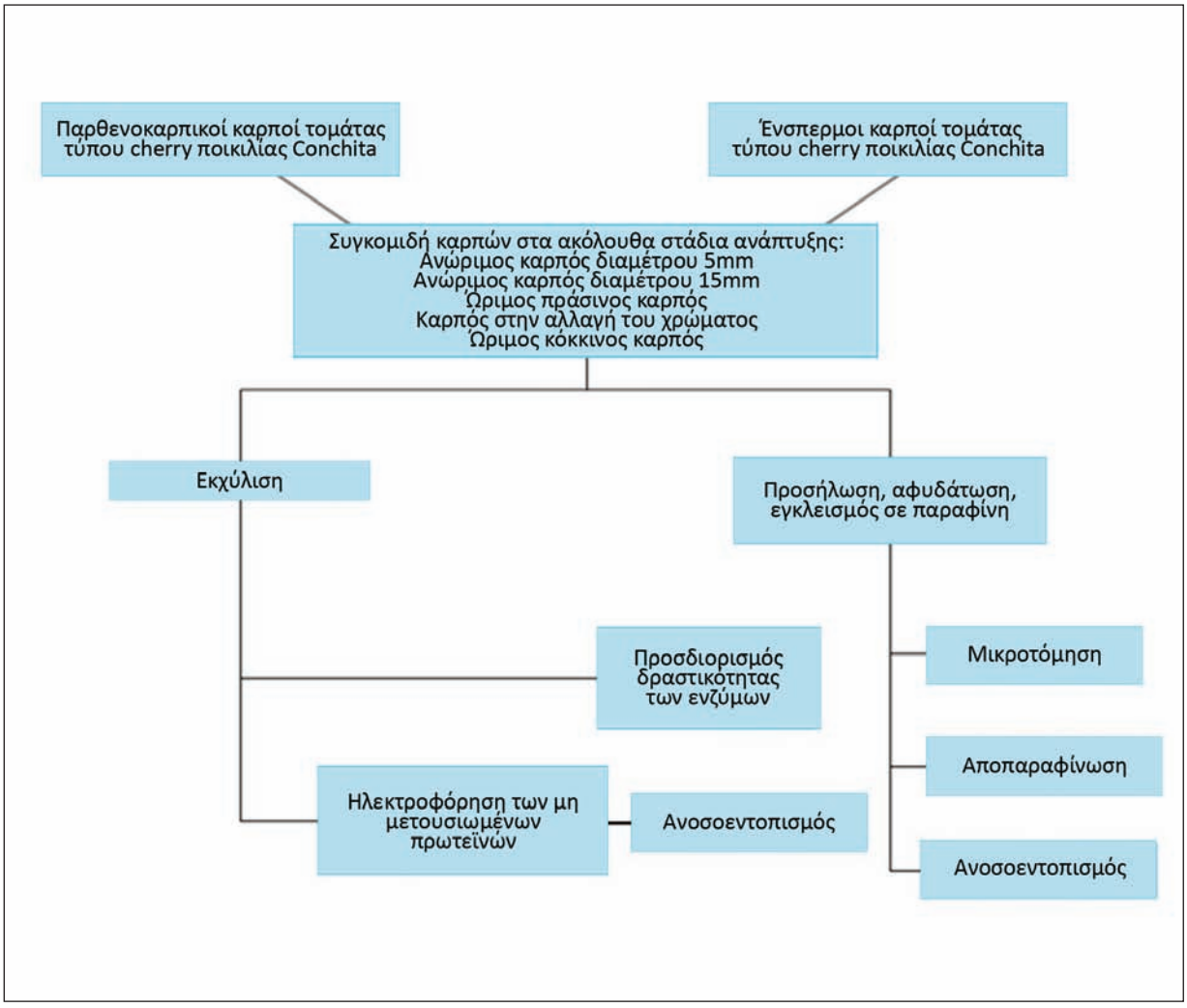
Οι Lehmann et al. (2008) αναφέρουν πως στο φυτό *Arabidopsis thaliana* η SPS1 πρωτεΐνη εκφράζεται στα φύλλα και τα άνθη και μάλιστα στα άνθη αποτελεί και τον κυρίαρχο ισόμορφο, ενώ απουσίαζε από το βλαστό. Οι SPS5a και 5b ήταν οι κυρίαρχοι ισόμορφοι σε φύλλα και βλαστό. Στο σιτάρι οι Castleden et al. (2004) βρήκαν πως από τα πέντε SPS γονίδια, το TaSPSI (οικογένεια C) εκφράζεται πιο έντονα στους σπόρους των βλαστανόντων σποροφύτων και στον κολεό. Τα TaSPSII (οικογένεια A) εκφράζονται σε όλα τα μέρη των βλαστανόντων σποροφύτων και στα φύλλα που περιβάλλουν το στάχυ, ενώ λιγότερο στα εκπτυγμένα φύλλα νεαρών φυτών. Τα γονίδια TaSPSIII (οικογένεια D) εκφράστηκαν περισσότερο στα βλαστανόντα σπορόφυτα, στους στάχεις και λιγότερο στους αναπτυσσόμενους σπόρους κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης τους. Σε αντίθεση, τα γονίδια TaSPSIV (οικογένεια D) εκφράστηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό στα σπέρματα κατά τα τελευταία στάδια ανάπτυξης και λιγότερο στα βλαστάνοντα σπέρματα.

1.6 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης (SPS), του ενζύμου που σχετίζεται με τη σύνθεση της σακχαρόζης στους αναπτυσσόμενους καρπούς τομάτας. Η μελέτη του ενζύμου αποσκοπεί στον εντοπισμό διαφορών μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών όσον αφορά τη δραστικότητα και τον εντοπισμό του.

2. Υλικά & Μέθοδοι

2.1. Οι διαδικασίες του πειράματος



Σχήμα 4: 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 5). Οι καρποί της Conchita είναι λαμπεροί κόκκινοι με μέσο βάρος 20gr. Η ανάπτυξη και η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Εικόνα 6). Η μεταφύτευση των νεαρών φυταρίων στο θερμοκήπιο πραγματοποιήθηκε το μήνα Νοέμβριο.

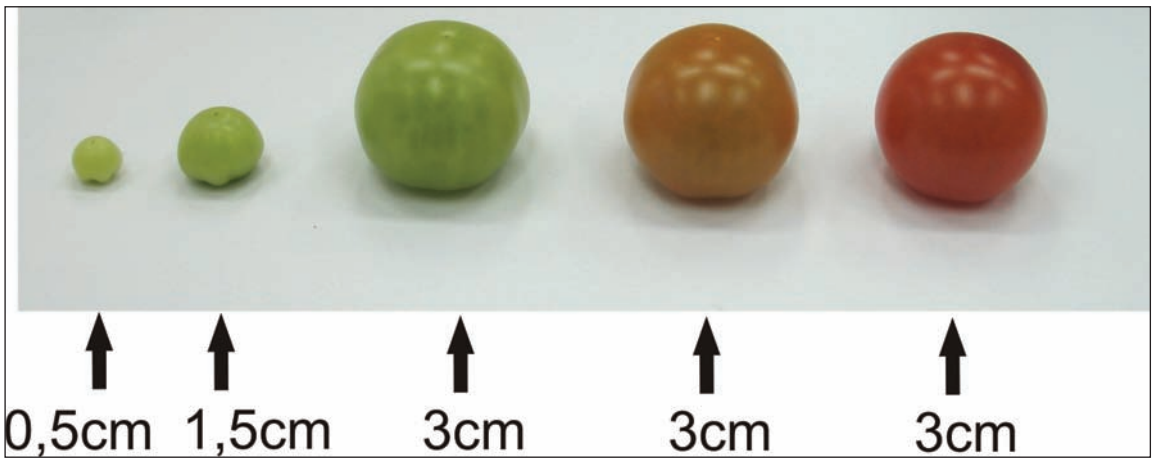
Η συγκομιδή των καρπών στα υπό μελέτη στάδια ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε από τη δεύτερη ταξικαρπία των φυτών. Για την παραλαβή των παρθενοκαρπικών καρπών πραγματοποιήθηκαν οι ακόλουθες ενέργειες. Όταν ακόμη τα άνθη ήταν κλειστά και πριν αυτά καταστούν επιδεκτικά επικονίασης, με μία λαβίδα ανοίχτηκαν τα πέταλα και αφαιρέθηκαν προσεκτικά οι ανθήρες παραμένοντας μόνο ο στύλος με το στίγμα. Ακολούθησε ψεκασμός του στίγματος με κατάλληλη ορμόνη και το άνθος σημάνθηκε με ταμπελάκι όπου αναγραφότανε η ημερομηνία επέμβασης. Όταν οι καρποί έφτα-

Εικόνα 5: Ταξικαρπία τομάτας cherry ποικιλίας Conchita

Εικόνα 6: Η καλλιέργεια στο θερμοκήπιο του Γ.Π.Α.

σαν στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης συγκομίστηκαν. Η ορμόνη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Ortomone με δραστική ουσία το β-ναφθόξυοξεικό οξύ σε συγκέντρωση 50ppm.

Οι άσπερμοι και ένσπερμοι καρποί συγκομίστηκαν σε 5 διαφορετικά στάδια τα οποία σχετίζονται με την ανάπτυξη τους: ανώριμοι καρποί διαμέτρου 0,5cm και 1,5cm, ώριμοι πράσινοι, καρποί στην αλλαγή του χρώματος και ώριμοι κόκκινοι (Εικόνα 7). Αμέσως μετά τη συγκομιδή τους, ένα μέρος των καρπών χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση των τομών για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου, οι δε υπόλοιποι αποθηκεύτηκαν σε κατάλληλο ψυκτικό χώρο στους -80°C ώστε να χρησιμοποιηθούν αργότερα για την εκχύλιση των πρωτεϊνών και τη μέτρηση της δραστικότητας του.



Εικόνα 7: Τα 5 στάδια ανάπτυξης του καρπού τομάτας τύπου cherry βάση των οποίων έγινε η συγκομιδή. Ανώριμοι καρποί διαμέτρου 0,5 και 1,5cm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή χρώματος και κόκκινος ώριμος καρπός.

2.3 Η εκχύλιση του ενζύμου

Μετά την παραλαβή των δειγμάτων για τα 5 στάδια των ένσπερμων και τα αντίστοιχα 5 των άσπερμων καρπών ακολούθησε η εκχύλιση των πρωτεϊνών και οι μετρήσεις των ολικών τους πρωτεϊνών.

Για την εκχύλιση των ολικών πρωτεϊνών τα δείγματα αφού τεμαχίστηκαν, τοποθετήθηκαν σε γουδί μαζί με υγρό άζωτο. Ακολούθως, τα δείγματα λειοτριβήθηκαν. Για κάθε στάδιο αναμιγνυόταν συγκεκριμένη ποσότητα (σε νωπό βάρος) καρπού με αντίστοιχο όγκο μέσου εκχύλισης (αναλογία 1:1). Η όλη διαδικασία διαρκούσε έως ότου προκύψουν ομοιογενή εκχυλίσματα. Τελικά, τα εκχυλίσματα τοποθετήθηκαν μέσα σε eppendorf στον πάγο.

Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 15000g για 15min και 4°C. Ακολούθησε ο προσδιορισμός των πρωτεϊνών των δειγμάτων με τη μέθοδο Bearden. Στη συνέχεια τα εκχυλίσματα χωρίσθηκαν σε δύο μέρη. Στο ένα μέρος προστέθηκαν λίγοι κόκκοι κυανούν της βρωμοφαινόλης για την ηλεκτροφόρηση. Το άλλο μέρος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της δραστικότητας της SPS.

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

Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης πρωτεϊνών
50mM Tris- HCl pH 7.5
15% glycerol
0.02% BSA
2mM Ανοιγμένη γλουταθειόνη
4% PVP
0.1%Triton X
20mM Na_2SO_3

2.4 Η μέτρηση των ολικών πρωτεϊνών των εκχυλισμάτων

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

<u>Διάλυμα Bearden</u>

1. Ζύγιση 10mg Coommassie Brilliant Blue G-250 (Serva 17524).
2. Το παραπάνω αραιώνεται σε 40ml 85% φωσφορικού οξέος.
3. Προσθήκη 200ml αποσταγμένο νερό (dH_2O).
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 φυγοκέντρηση ετοιμάσθηκαν 10 σωλήνες για κάθε δείγμα (5mm και 15mm ανώριμου, ώριμου πράσινου, αλλαγή χρώματος, ώριμου κόκκινου για ένσπερμους και άσπερμους καρπούς) που περιείχαν 1.5ml dH_2O, 100μl εκχυλίσματος και 1.5ml διαλύματος Bearden. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε ένας σωλήνας που περιείχε 1.5ml dH_2O και 1.5ml διαλύματος Bearden. Ακολούθως έγινε φωτομέτρηση στα 595nm. Μετά τις επαναλπτικές μετρήσεις για κάθε δείγμα υπολογίζεται η συγκέντρωσης της συνολικής πρωτεΐνης βάσει της πρότυπης καμπύλης.

2.5 Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της SPS

Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης σε παρθενοκαρπικούς και μη καρπούς τομάτας τύπου cherry βασίστηκε στους Babb and Haigler (2001).

Σύμφωνα με τη μέθοδο, η SPS παράγει φωσφοροσακχαρόζη από UDP-γλυκόζη και φωσφοροφρουκτόζη. Συνεπώς η δραστηριότητα της SPS μπορεί να μετρηθεί με μέσο που περιέχει UDP-γλυκόζη, φωσφοροφρουκτόζη και 6-φωσφορογλυκόζη, η οποία και θεωρείται ενεργοποιητής του ενζύμου.

Για καθένα από τα 10 δείγματα χρησιμοποιήθηκαν 200μl ενζυμικού εκχυλίσματος, 400μl απεσταγμένου νερού και 400μl διαλύματος προσδιορισμού της δραστικότητας της SPS. Μετά την επώαση του ενζυμικού εκχυλίσματος με τα αντιδραστήρια για ορισμένο χρόνο, παράγεται φωσφοροσακχαρόζη. Ακολουθεί τοποθέτηση των δειγμάτων για 60min σε υδατόλουτρο στους 40°C και προσθήκη 200μl KOH με σκοπό τον τερματισμό της αντίδρασης και την απομάκρυνση των εξοζών. Έπειτα, τα δείγματα τοποθετήθηκαν πάλι σε υδατόλουτρο για 10min στους 100°C και ακολούθησε προσθήκη 800μl HCl για την υδρόλυση της φωσφοροσακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση στα 15000g για 15min. Επειδή στα εκχύλισμα των δειγμάτων παρατηρήθηκε συσσώρευση λιπιδίων στην επιφάνεια του υπερκείμενου υγρού ακολούθησε φιλτράρισμα αυτών με τη χρήση ειδικών φίλτρων. Ακολούθησε προσθήκη 40μL 1% ρεσορκινόλης σε 30% HCl και τα δείγματα τοποθετήθηκαν και πάλι στο υδατόλουτρο για 10min στους 80°C. Η ρεσορκινόλη αντιδρά με φρουκτόζη και παράγει ροζ χρώμα και μετά από 10min ακολούθησε η μέτρηση της δραστικότητας της SPS στα 520nm. Όλες οι φωτομετρήσεις έγιναν με σπεκτροφωτόμετρο UV-160A (Shimadzu).

Το διάλυμα προσδιορισμού της δραστικότητας της SPS, σύμφωνα με τους Babb and Haigler (2001) περιείχε:

50mM Hepes- NaOH pH 7.4
8mM UDP-Glucose
4mM 6-P-Fructose
20mM Glucose-6-P
10mM $MgCl_2 6H_2O$
1mM EDTA
0.4mM EGTA
0.04% Triton X

Ο μάρτυρας δεν περιείχε UDP-Glucose και 6-P-Fructose.

2.6 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 ακρυλαμιδίου με 2,7% bis-ακρυλαμίδιο, σε ασυνεχές σύστημα του οποίου τα συστατικά αναφέρονται παρακάτω. Ακολούθως φορτώθηκε με εκχύλισμα πρωτεϊνών που αντιστοιχούσε περίπου σε 40μg πρωτεΐνης από κάθε ιστό.

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

Μέτα το τέλος της παραπάνω διαδικασίας η πηκτή τοποθετήθηκε στα αντίστοιχα διαλύματα επώασης. Στη συνέχεια αφέθηκε για λίγες ώρες μέχρι την εμφάνιση σήματος. Ακολούθως φωτογραφήθηκαν οι πηκτές.

Α. Πηκτή ανάλυσης 8%T, 2.7%C

Μητρικό Διάλυμα Ακριλαμιδίου, Bis- Ακριλαμιδίου (30%, 2.7%)	2.87ml
Ρυθμιστικό Διάλυμα Ανάπτυξης	2.50ml
Αποσταγμένο Νερό	4.45ml
10% Υπερθειϊκό Αμμώνιο	50μl
TEMED	10μl

Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης
378mM Tris-HCl pH 8.9

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

Μητρικό Διάλυμα Ακριλαμιδίου, Bis- Ακριλαμιδίου (30%, 2.7%)	1.0ml
Ρυθμιστικό Διάλυμα συσσώρευσης	5.0ml
Αποσταγμένο Νερό	3.76ml
10% Υπερθειϊκό Αμμώνιο	100μl
TEMED	10μl

Ρυθμιστικό διάλυμα συσσώρευσης
63mM Tris-HCl pH 6.8

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών
25mM Tris
192mM γλυκίνη

2.7 Η ανοσοβιοχημική μελέτη

Για τον ανοσοεντοπισμό του ενζύμου χρησιμοποιήθηκαν τομές από ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας τύπου cherry στα εξής στάδια ανάπτυξης: ανώριμος καρπός διαμέτρου 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% παραφολμαλδεΰδη και 0.5% γλουταραλδεΰδη για χρονικό διάστημα 48h σε θερμοκρασία δωματίου.

Αφυδάτωση
Ακολούθως, οι τομές αφυδατώθηκαν σε διαλύματα αυξανομένων 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 χρη-

σιμοποιήθηκε για τρεις εμβαπτίσεις της μίας ώρας.

Εγκλεισμός των δειγμάτων σε παραφίνη

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

Προετοιμασία αντικειμενοφόρων

1. Οι αντικειμενοφόροι που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν πλένονται σε διάλυμα 1% SDS για 2h περίπου, για να απομακρυνθούν από αυτές οι τυχόν λιποδιαλυτές ουσίες.
2. Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό σε συνεχή ροή.
3. Ακολουθεί πλύσιμό τους επίσης για 2h σε διάλυμα υδροχλωρίου 5%.
4. Ξεπλένονται με απιονισμένο νερό και αποστειρώνονται.
5. Ακολουθεί εμβάπτιση 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 l0μm. 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 εμβάπτιση των ιστών σε διαλύματα που περιείχαν:

-100% ξυλένιο, 75% ξυλένιο-25% αιθανόλη, 50% ξυλένιο-50% αιθανόλη, 25% ξυλένιο-75% αιθανόλη και 100% αιθανόλη για 10min το καθένα.

2.8 Ο ανοσοεντοπισμός της SPS

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 αραίωση 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-Anti-Rabbit, 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 Buffer 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 SPS (rabbit anti-SPS, Agrisera AS03 035A) 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 3φορές 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 3φορές επί 5min TBST 1% ζελατίνης.
- Ανίχνευση δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης με την επώαση των ταινιών σε ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης για 3min παρουσία χρωμοφόρου.
- Αφυδάτωση και φύλαξη της νιτροκυτταρίνης μεταξύ δύο φύλλων διηθητικού χαρτιού.
- Φωτογράφηση 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 πολυκλωνικά αντισώματα παρασκευασθέντα εναντίον συντηρημένων περιοχών της SPS (Agrisera AS03 035A, rabbit anti SPS) σε αραίωση 1:1000 σε TBST-1% BSA για 12h σε θερμοκρασία δωματίου.
- 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 αραίωση 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 SPS με NBT/BCIP (66 μl/33μl BCIP σε 10ml ρυθμιστικού διαλύματος ανίχνευσής της).
- Αφυδάτωση των τομών σε σειρά EtOH.
- Εφαρμογή DPX.
- Σε κάθε περίπτωση η χρώση του μάρτυρα έγινε με Orange G σε απόλυτη αλκοόλη.

Διαλύματα

Ρυθμιστικό διάλυμα TBST
20mM Tris HCl pH 7.5
150mM NaCl
0.05% Tween 20

Ρυθμιστικό διάλυμα ανίχνευσης της αλκαλικής φωσφατάσης-Buffer3
10mM Tris-HCl pH 9.5
100mM NaCl
50 mM $MgCl_2$

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

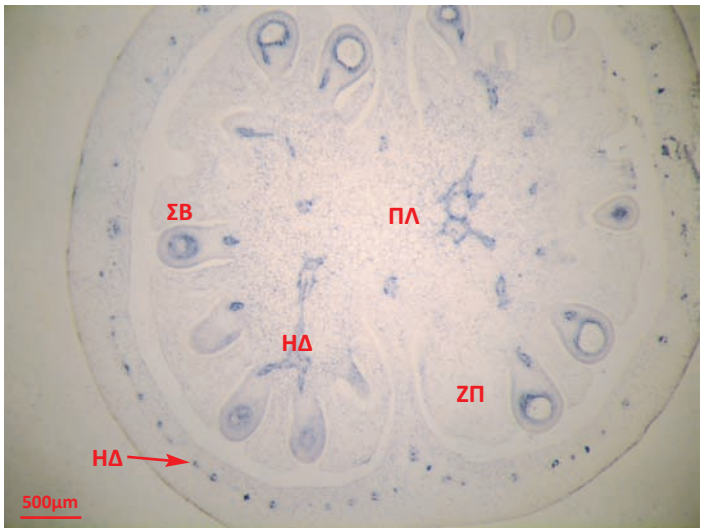
3. Αποτελέσματα

3.1 Ανοσοεντοπισμός της SPS

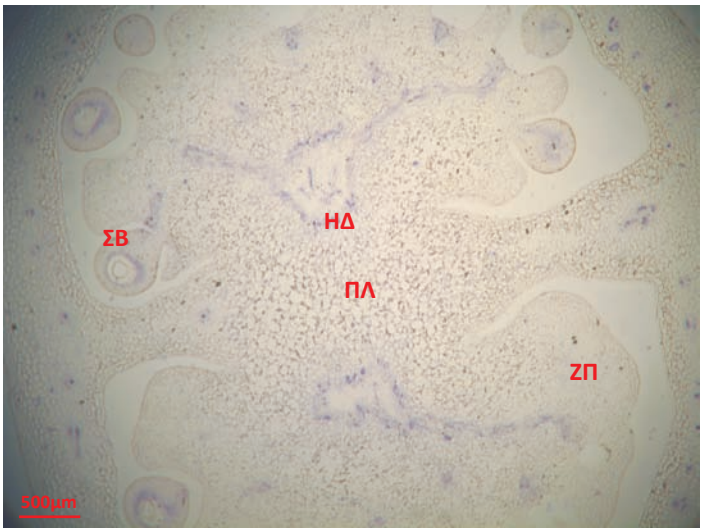
Ο ανοσοεντοπισμός της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης δείχνει τους ιστούς στους οποίους κατά τη στιγμή της προσήλωσης υπάρχει το ένζυμο καθώς και τη σχετική αφθονία του. Η παρουσία μωβ-μπλε χρωματισμού σηματοδοτεί την παρουσία της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης στους φυτικούς ιστούς.

3.1.1 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm

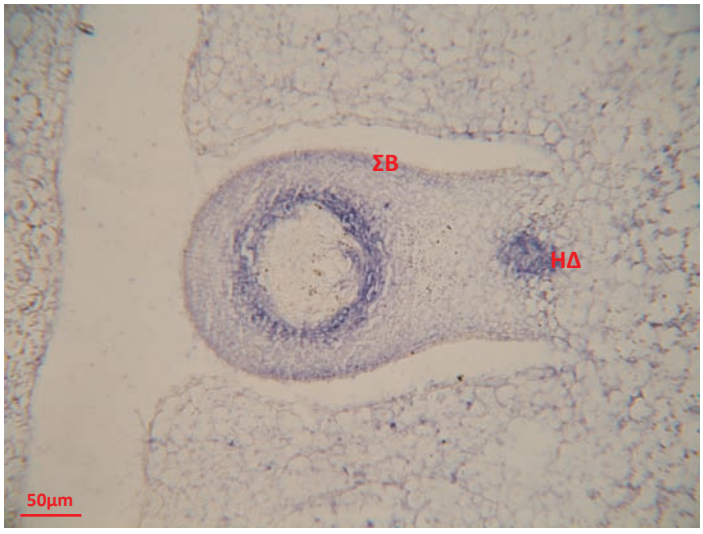
Σε εγκάρσιες τομές στο στάδιο των 5mm του ένσπερμου (Εικόνα 8) και παρθενοκαρπικού (Εικόνα 9) ανώριμου καρπού βρέθηκε πως το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Λιγότερο έντονο είναι το σήμα στην περιοχή του πλακούντα, του ζελατινώδους παρεγχύματος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



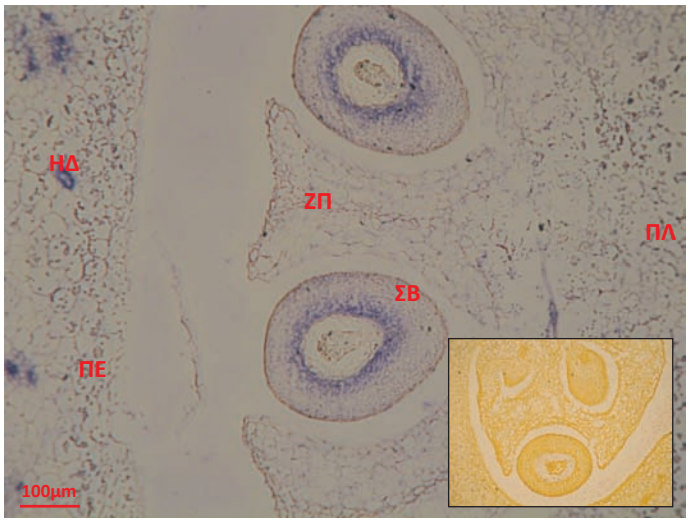
Εικόνα 8: Ανοσοεντοπισμός της SPS σε εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου φαίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΣΒ, σπερματικές βλάστες, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΛ πλακούντας, ΖΠ ζελατινώδες παρέγχυμα.



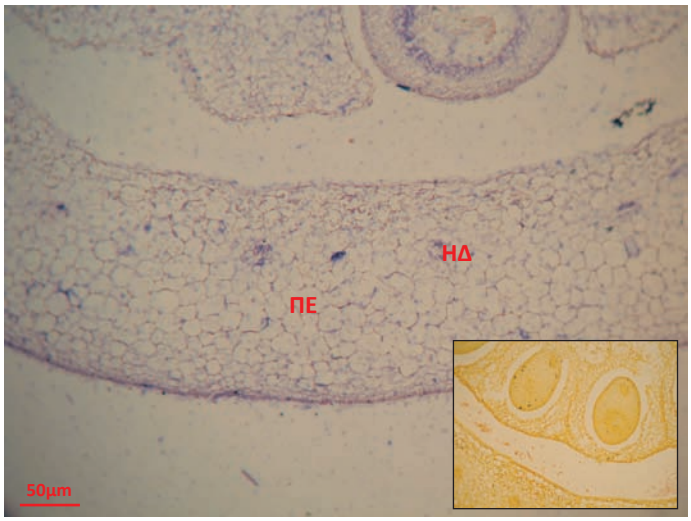
Εικόνα 9: Ανοσοεντοπισμός της SPS σε εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. ΣΒ, σπερματικές βλάστες, ΗΔ, ηθμαγγειώδης δεσμίδα, ΠΛ πλακούντας, ΖΠ ζελατινώδες παρέγχυμα.



Εικόνα 10: Ανοσοεντοπισμός της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης σε λεπτομέρεια σπερματικής βλάστης ένσπερμου ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου παρουσιάζεται πιο έντονη στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ) καθώς και στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ).



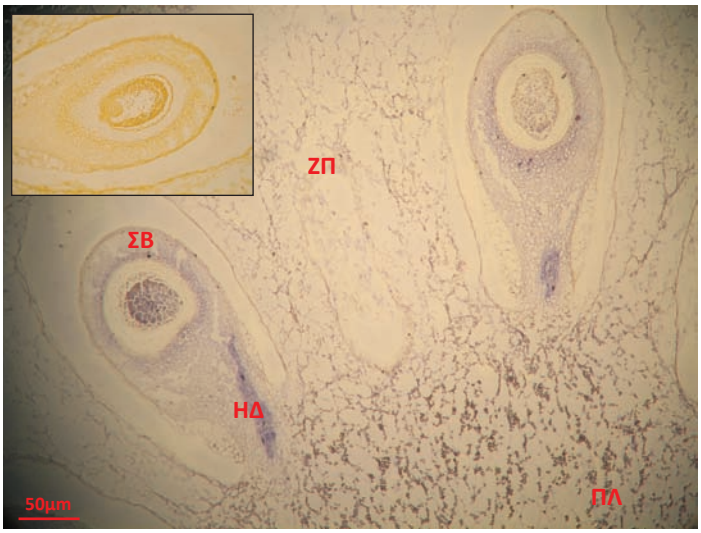
Εικόνα 11: Ανοσοεντοπισμός της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης σε παρθενοκαρπικό ανώριμο καρπό διαμέτρου 5mm σε μεγέθυνση. Διακρίνεται έντονος χρωματισμός στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ) καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και λιγότερο στα κύτταρα του ζελατινώδους παρεγχύματος (ΖΠ) και του πλακούντα (ΠΛ). Στα κύτταρα του περικαρπίου (ΠΕ) η παρουσία του ενζύμου ήταν μικρότερη.
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 5mm. Για τη φωτογράφηση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.



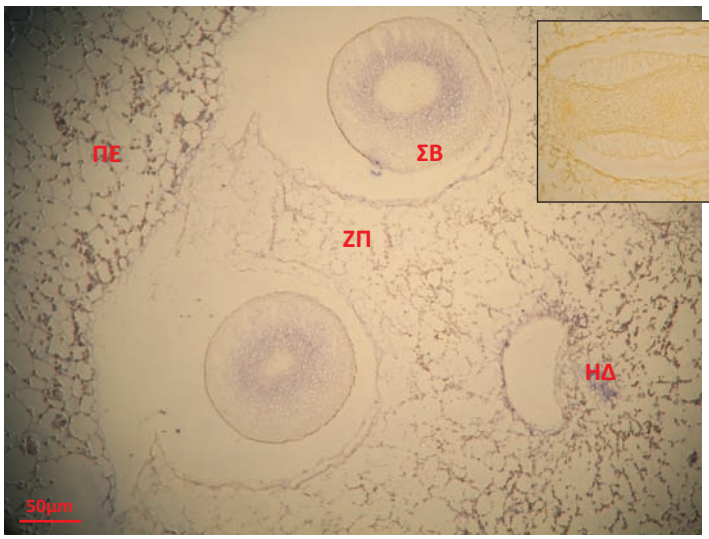
Εικόνα 12: Λεπτομέρεια του ανοσοεντοπισμού της SPS στην περιοχή του περικαρπίου ένσπερμου ανώριμου καρπού διαμέτρου 5mm. Η παρουσία του ενζύμου εντοπίζεται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) του περικαρπίου και λιγότερο στα κύτταρα του περικαρπίου (ΠΕ).
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 5mm. Για τη φωτογράφηση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

3.1.2 Στάδιο ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm

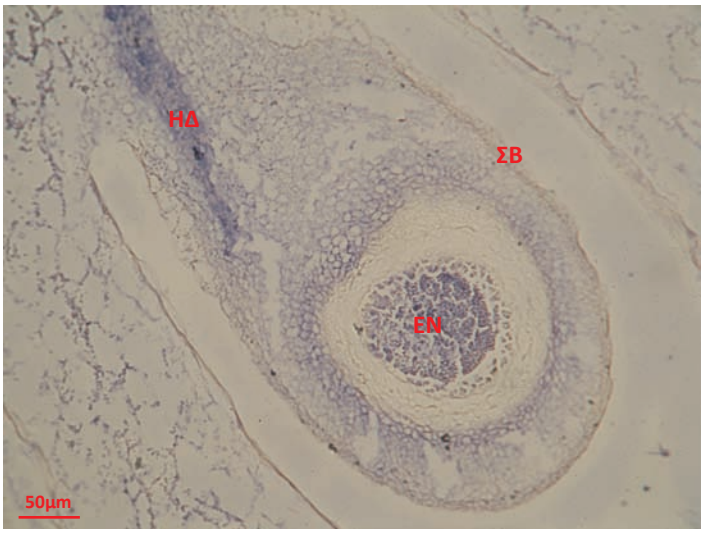
Στο στάδιο του ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm, τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, το ένζυμο εντοπίζεται κατά κύριο λόγο στις σπερματικές βλάστες και στις ηθμαγγειώδης δεσμίδες. Ασθενέστερο ήταν το σήμα στα κύτταρα του περικαρπίου, του πλακούντα και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (Εικόνες 13, 14, 15,16, 17 και 18).



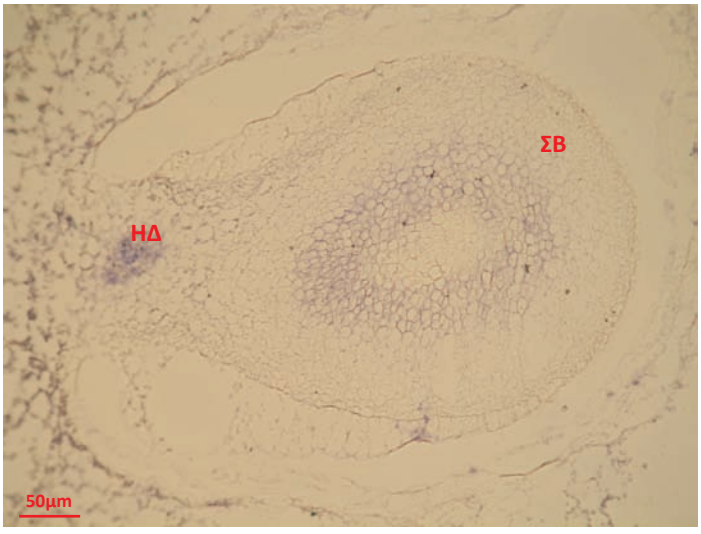
Εικόνα 13: Ανοσοεντοπισμός της SPS σε ένσπερμο ανώριμο καρπό διαμέτρου 15mm. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός στην περιοχή των σπερματικών βλαστών (ΣΒ) και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ). Αντίθετα, το σήμα του ενζύμου ήταν μικρότερο στον πλακούντα (ΠΛ) και το ζελατινώδες παρέγχυμα (ΖΠ).
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή ένσπερμου καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφηση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.



Εικόνα 14: Ανοσοεντοπισμός της SPS σε παρθενοκαρπικό ανώριμο καρπό διαμέτρου 15mm. Και στην περίπτωση αυτή η παρουσία του ενζύμου εντοπίζεται στις σπερματικές βλάστες (ΣΒ) καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ), ενώ ανιχνεύεται λιγότερο στην περιοχή του περικαρπίου (ΠΕ), του ζελατινώδους παρεγχύματος (ΖΠ) και του πλακούντα (ΠΛ).
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας που επωάστηκε με ορρό κουνελιού προ της επαγωγής της ανοσοαντίδρασης Εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού καρπού διαμέτρου 15mm. Για τη φωτογράφηση οι τομές χρωματίστηκαν με Orange G.

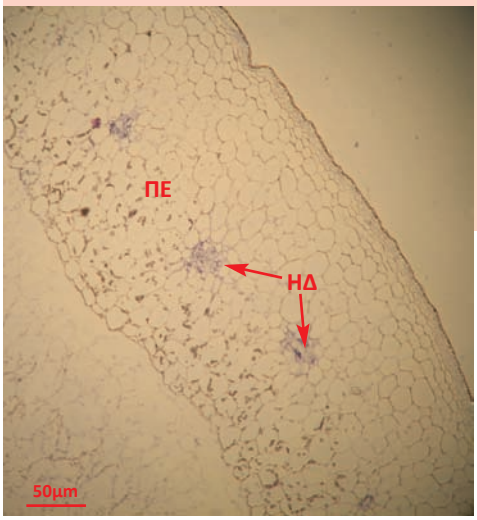


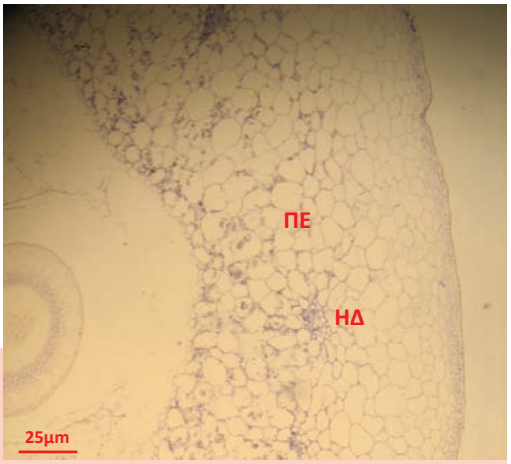
Εικόνα 15: Σπερματική βλάστη ένσπερμου ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm. Διακρίνεται έντονη η παρουσία του ενζύμου στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ), στο ενδοσπέρμιο (ΕΝ) καθώς και στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ).



Εικόνα 16: Σπερματική βλάστη παρθενοκαρπικού ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm. Διακρίνεται έντονη η παρουσία του ενζύμου στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ) και στα κύτταρα του εσωτερικού χιτώνα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ).

Εικόνα 17: Λεπτομέρεια περικαρπίου ένσπερμου ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm. Η δράση του ενζύμου εντοπίζεται κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και ασθενέστερα στα κύτταρα του εσωτερικού περικαρπίου (ΠΕ).



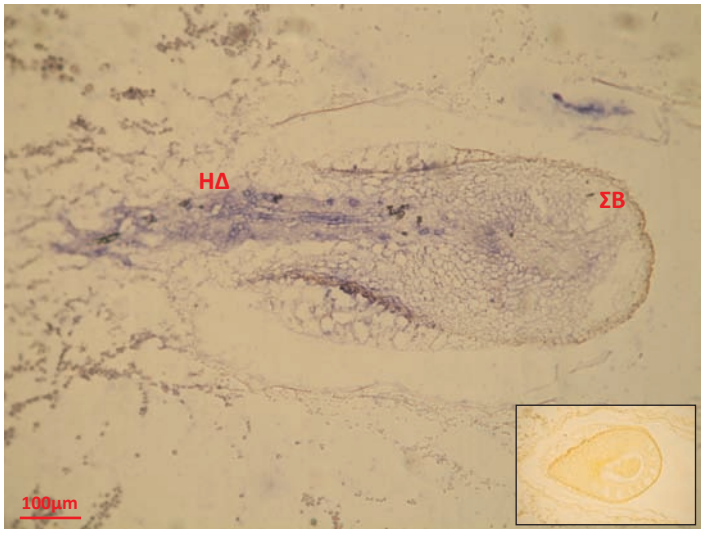


Εικόνα 18: Λεπτομέρεια περικαρπίου παρθενοκαρπικού ανώριμου καρπού διαμέτρου 15mm. Η δράση του ενζύμου εντοπίζεται κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και ασθενέστερα στα κύτταρα του εσωτερικού περικαρπίου (ΠΕ).

3.1.3 Στάδιο ώριμου πράσινου καρπού

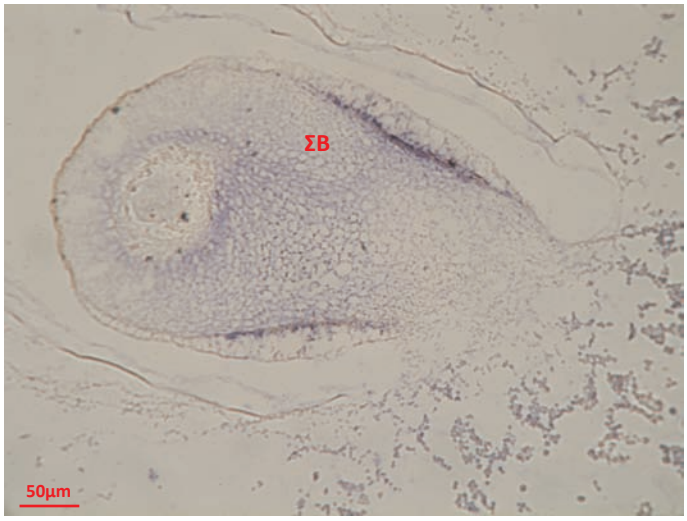
Κατά το στάδιο του ώριμου ένσπερμου πράσινου καρπού η συνθάση της φωσφοροασακχαρόζης εντοπίστηκε κυρίως στους ιστούς του αναπτυσσόμενου εμβρύου (Εικόνες 19, 21, 23) καθώς και στις ηθμαγγειώδης δεσμίδες. Στον παρθενοκαρπικό πράσινο ώριμο καρπό η παρουσία του ενζύμου εντοπίστηκε στις ηθμαγγειώδης δεσμίδες και στα κύτταρα της σπερματικής βλάστης (Εικόνες 20, 22, 24). Και στις δύο περιπτώσεις η SPS εντοπίστηκε στο περικάρπιο και ιδιαίτερα στο εσωτερικό τμήμα αυτού.

Εικόνα 19: Τομή από ένσπερμο πράσινο ώριμο καρπό. Η παρουσία της SPS εστιάζεται στο αναπτυσσόμενο έμβρυο (ΕΜ), στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ) και στο ενδοσπέρμιο (ΕΝ).
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας.

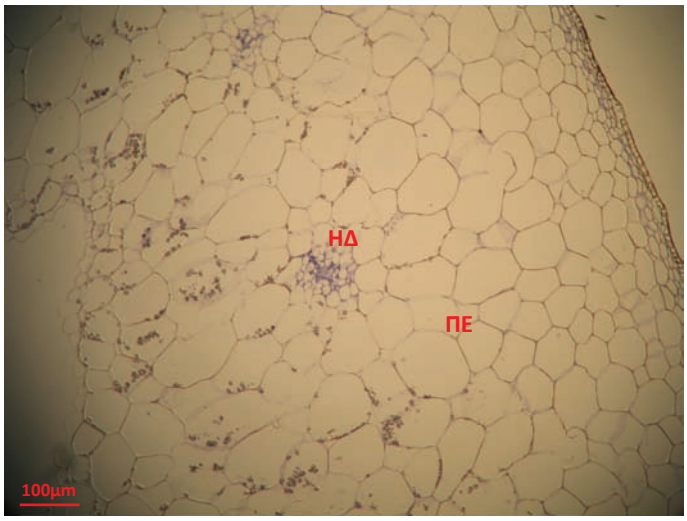


Εικόνα 20: Ανοσοεντοπισμός της SPS σε παρθενοκαρπικό πράσινο ώριμο καρπό. Παρατηρείται έντονος χρωματισμός στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ) καθώς και στα κύτταρα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ).
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας.

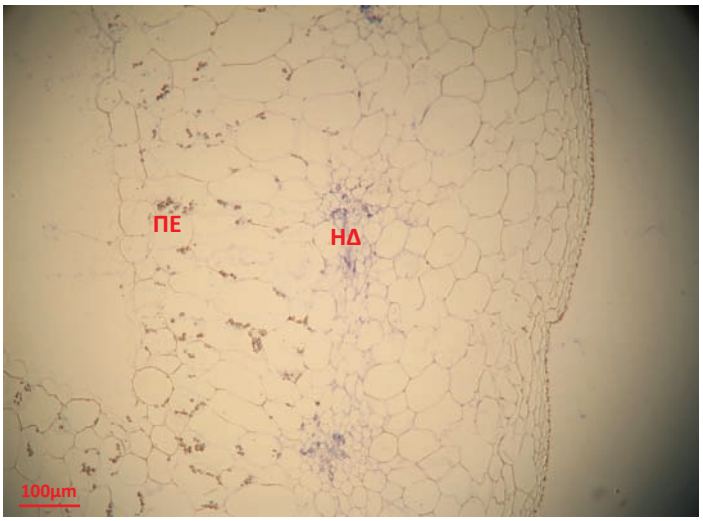
Εικόνα 21: Λεπτομέρεια του αναπτυσσόμενου εμβρύου σε ώριμο πράσινο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου είναι έντονη στην περιοχή του ενδοσπερμίου (ΕΝ), στη ρίζα (Ρ) και στις κοτύλες (ΚΟ).



Εικόνα 22: Σπερματική βλάστη πράσινου ώριμου παρθενοκαρπικού καρπού σε λεπτομέρεια. Ο εντοπισμός της SPS εστιάζεται στα κύτταρα της σπερματικής βλάστης (ΣΒ).



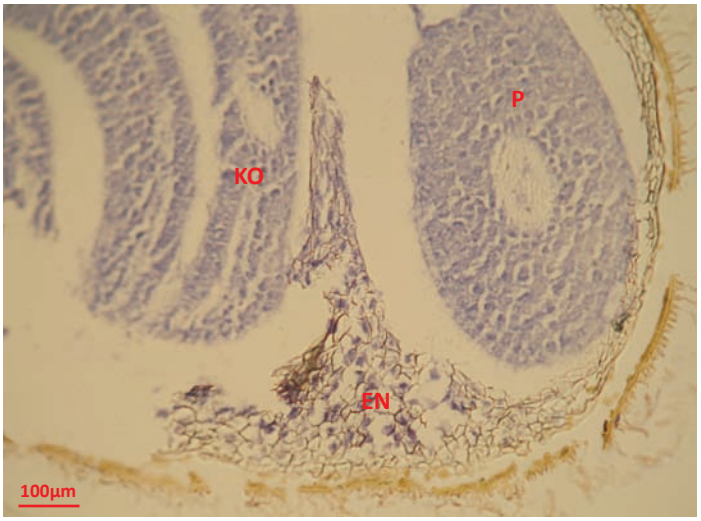
Εικόνα 23: Λεπτομέρεια του περικαρπίου από ένσπερμο ώριμο πράσινο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου εντοπίζεται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και λιγότερο στο περικάρπιο (ΠΕ).



Εικόνα 24: Λεπτομέρεια του περικαρπίου από παρθενοκαρπικό ώριμο πράσινο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου εντοπίζεται στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (ΗΔ) και λιγότερο στο περικάρπιο (ΠΕ).

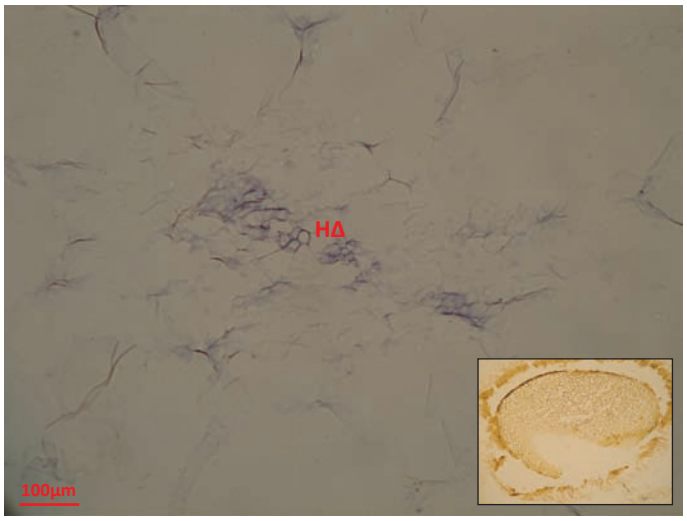
3.1.4 Στάδιο αλλαγής χρώματος

Στον κανονικό καρπό κατά το στάδιο της αλλαγής χρώματος η SPS εντοπίστηκε κυρίως στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου σπέρματος καθώς και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνες 25, 27). Αντίθετα, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η πρωτεΐνη εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνες 26, 28).

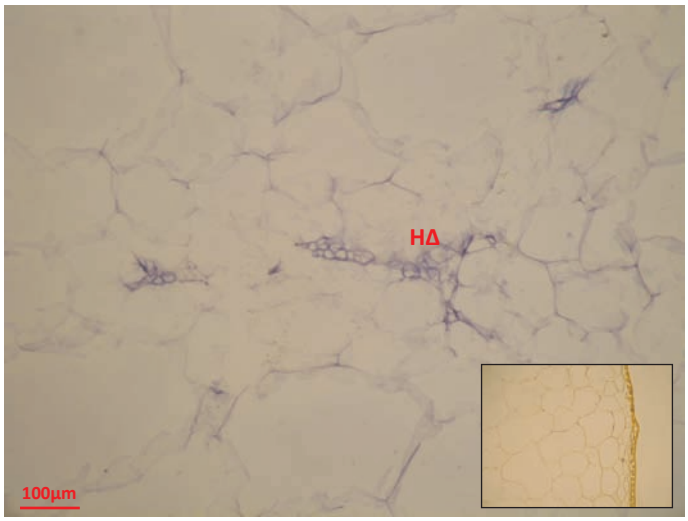


Εικόνα 25: Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της SPS σε ένσπερμο καρπό στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου είναι έντονη στο εσωτερικό του αναπτυσσόμενου εμβρύου και ιδιαίτερα στο ενδοσπέρμιο (ΕΝ), στην Ρίζα (Ρ) και στις κοτύλες (ΚΟ). Η SPS δεν εντοπίζεται στον κεντρικό κύλινδρο της ρίζας.

Εικόνα 26: Ανοσοεντοπισμός της SPS σε σπερματική βλάστη (ΣΒ) παρθενοκαρπικού καρπού στο στάδιο της αλλαγής χρώματος. Δεν διακρίνεται η παρουσία του ενζύμου.



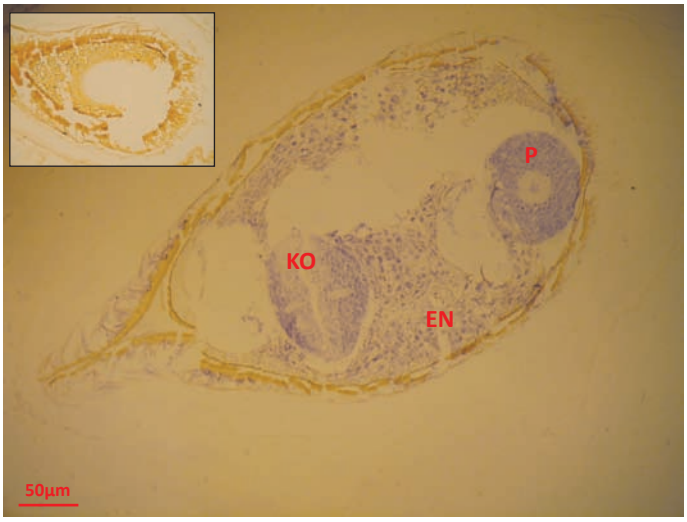
Εικόνα 27: Ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ) από ένσπερμο καρπό στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας.



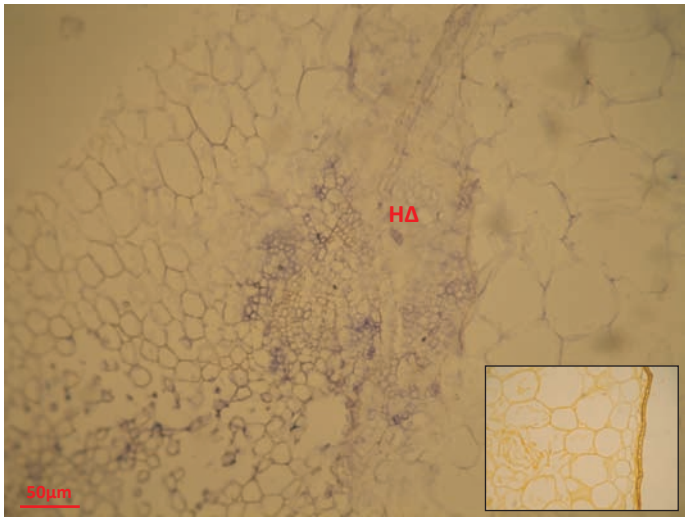
Εικόνα 28: Λεπτομέρεια ηθμαγγειώδους δεσμίδας (ΗΔ) από παρθενοκαρπικό καρπό στο στάδιο αλλαγής χρώματος. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας.

3.1.5 Στάδιο ώριμου κόκκινου καρπού

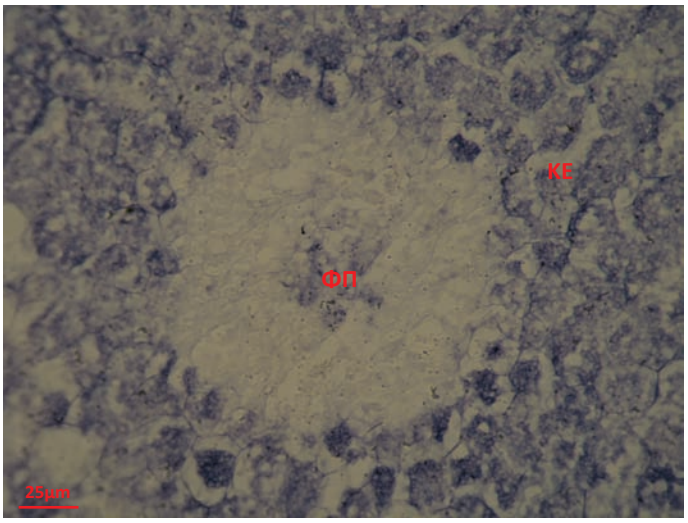
Στο στάδιο του ένσπερμου ώριμου κόκκινου καρπού η παρουσία του ενζύμου ήταν έντονη στο εσωτερικό των αναπτυσσόμενων σπερμάτων καθώς επίσης και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνες 29, 31, 32). Στον παρθενοκαρπικό καρπό το σήμα ήταν ασθενέστερο και εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες (Εικόνα 30).



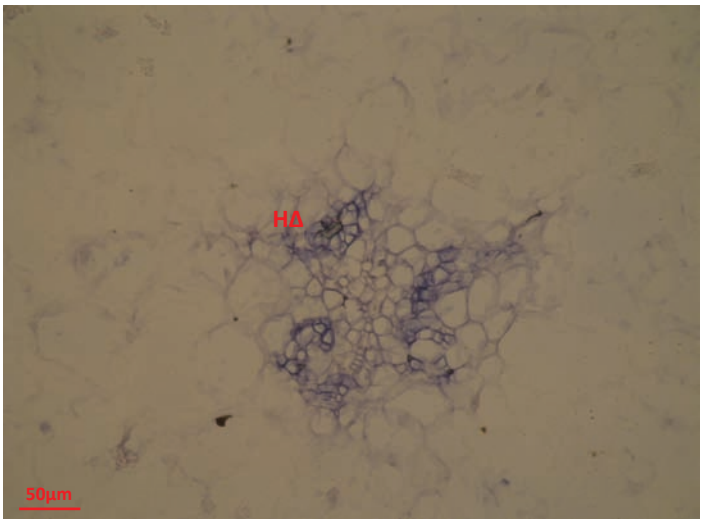
Εικόνα 29: Ανοσοεντοπισμός της SPS σε εγκάρσια τομή αναπτυσσόμενου σπέρματος από κόκκινο ώριμο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. Ενδοσπέρμιο (EN), Ρίζα (P) και κοτύλη (KO).
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας.



Εικόνα 30: Ανοσοεντοπισμός της SPS σε εγκάρσια τομή παρθενοκαρπικού κόκκινου ώριμου καρπού. Η παρουσία του ενζύμου στην ηθμαγγειώδη δεσμίδα (ΗΔ) διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.
Ένθετη εικόνα: Μάρτυρας.



Εικόνα 31: Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της SPS σε εγκάρσια τομή αναπτυσσόμενου σπέρματος στην περιοχή της ρίζας από κόκκινο ώριμο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό. Ο εντοπισμός της SPS εστιάζεται στο φλοιώδες παρέγχυμα (ΦΠ) της ρίζας καθώς και στην μεριστωματική περιοχή (ΜΠ) αυτής.



Εικόνα 32: Λεπτομέρεια ανοσοεντοπισμού της SPS σε εγκάρσια τομή ηθμαγγειώδους δεσμίδας (ΗΔ) από ένσπερμο κόκκινο ώριμο καρπό. Η παρουσία του ενζύμου διακρίνεται από το μπλε-μωβ χρωματισμό.

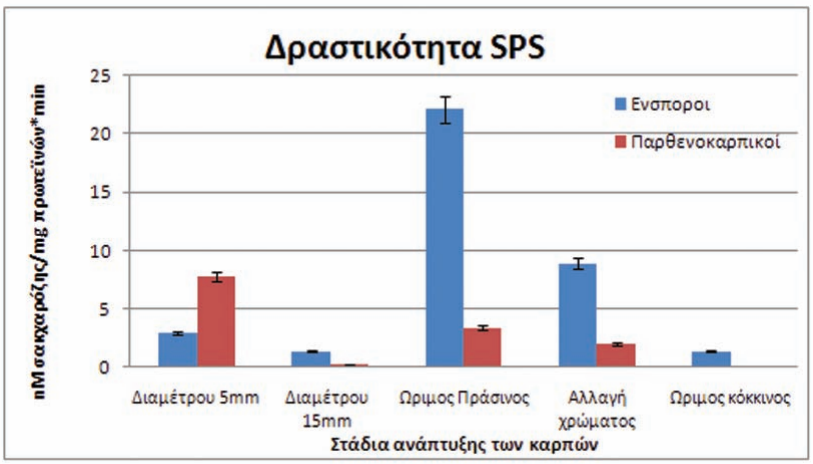
3.2 Έλεγχος της καταλληλότητας των χρησιμοποιηθέντων αντισωμάτων

Τα αποτελέσματα της ανοσοανίχνεσης των πρωτεϊνικών εκχυλισμάτων καρπού τομάτας cherry στο στάδιο της αλλαγής χρώματος μετά την ηλεκτρομεταφορά τους σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης φαίνονται στην Εικόνα 33. Τα χρησιμοποιηθέντα αντισώματα κατά της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης αναγνώρισαν δύο πεπτίδια (βέλη).

Εικόνα 33: Ανοσοεντοπισμός της SPS σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης μετά την ηλεκτρομεταφορά τους από πηκτή πολυακρυλαμίδης. Με βέλη σημειώνονται οι 2 ζώνες που αναγνωρίζονται από τα αντισώματα.

3.3 Ο προσδιορισμός της *in vitro* δραστικότητας της SPS

Η δραστικότητα της συνθάσης της φωσφορογλυκόζης προσδιορίστηκε φωτομετρικά στα 5 υπό εξέταση στάδια ανάπτυξης (ανώριμος καρπός διαμέτρου 5mm και 15mm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός) τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς (Σχήμα 1). Τα αποτελέσματα των μετρήσεων φανερώνουν πως η δραστικότητα του ενζύμου είναι πιο έντονη στους κανονικούς καρπούς σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς. Πιο συγκεκριμένα, στους ένσπερμους καρπούς η δραστικότητα του ενζύμου είναι υψηλότερη κατά το στάδιο του ώριμου πράσινου και στην αλλαγή του χρώματος, μικρότερη κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης (5mm) και ακόμη πιο μικρή στα 15mm του ανώριμου και στον κόκκινο ώριμο καρπό. Αντίθετα, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η δραστικότητα του ενζύμου ήταν πιο έντονη στα 5mm του ανώριμου και στον ώριμο πράσινο καρπό, μικρότερη στην αλλαγή του χρώματος και πολύ μικρή στο στάδιο των 15mm. Στο στάδιο του ώριμου κόκκινου δεν κατέστη δυνατό να ανιχνευτεί η δραστικότητα της SPS.



Σχήμα 1: Δραστικότητα της SPS σε 5 στάδια ανάπτυξης (ανώριμος καρπός διαμέτρου 5mm και 15mm, ώριμος πράσινος καρπός, καρπός στην αλλαγή χρώματος και ώριμος κόκκινος καρπός) παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας τύπου cherry. Οι μπάρες δείχνουν το τυπικό σφάλμα του μέσου όρου.

4. Συζήτηση

Η συνθάση της 6-φωσφοροσακχαρόζης (SPS) καταλύει μία σημαντική και ρυθμιζόμενη αντίδραση στο μονοπάτι της βιοσύνθεσης της σακχαρόζης τόσο στους αυτότροφους όσο και στους ετερότροφους ιστούς (Stitt et al., 1987). Στους φωτοσυνθετικούς ιστούς το ένζυμο διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της σύνθεσης σακχαρόζης και του ρυθμού καθήλωσης του CO_2, καθώς και στο ρυθμό με τον οποίον ο άνθρακας εξέρχεται από το χλωροπλάστη, μέσω της επίτευξης μιας ισορροπίας ανάμεσα σε μηχανισμούς μείωσης της 2,6 διφωφορο-φρουκτόζης (και συνεπώς ενεργοποίησης της SPS) και μηχανισμών ανάδρομης ανάσχεσης που αυξάνουν την 2,6 διφωφορο-φρουκτόζης (και αναστέλλουν την SPS) (Obiadalla-Ali et al., 2003).

Η σακχαρόζη που παράγεται στους φωτοσυνθετικούς ιστούς μεταφέρεται μέσω του ηθμού στα κύτταρα των ετερότροφων ιστών. Κατά τους Sonnewald and Willmitzer (1992) υπάρχουν δύο είδη ετερότροφων ιστών: οι ιστοί που χρησιμοποιούν τη σακχαρόζη και οι όποιοι χαρακτηρίζονται από υψηλή μεταβολική δραστηριότητα (όπως μεριστώματα και εκπτυσσόμενα φύλλα) καθώς και οι αποθησαυριστικοί ιστοί, όπως κόνδυλοι, καρποί, ρίζες που αποταμιεύουν υδατάνθρακες ως αποθησαυριστικές ενώσεις.

Η άμεση μετακίνηση του αφομοιώσιμου άνθρακα προς ένα συγκεκριμένο φυτικό όργανο καθορίζεται από το ρυθμό φωτοσύνθεσης των φωτοσυνθετικών ιστών καθώς και από τη δυναμική της καταβόθρας, δύο παράγοντες που είναι πολύ σημαντικοί για την παραγωγικότητα της καλλιέργειας (Dali et al., 1992). Η δυναμική της καταβόθρας είναι ουσιαστικά η ικανότητα του συγκεκριμένου οργάνου να προσελκύσει τα φωτοσυνθετικά προϊόντα (Ho, 1996). Οι Gifford and Evans (1981) αναφέρουν ότι οι μεταβολικές δραστηριότητες που πραγματοποιούνται στις καταβόθρες καθορίζουν την κατανομή των μεταβολιτών προς αυτές. Συνεπώς, ο προσδιορισμός και η κατανόηση αυτών των δραστηριοτήτων θα μπορούσαν να αυξήσουν τη μεταφορά προς την καταβόθρα και κατ' επέκταση να αυξήσουν την παραγωγικότητα (Dali et al., 1992).

Οι αναπτυσσόμενοι καρποί της τομάτας, αμέσως μετά την άνθηση τους, μετατρέπονται σε σημαντικές καταβόθρες. Άλλωστε, ένα από τα χαρακτηριστικά του καρπού της τομάτας είναι ότι αρχικά περιέχει χλωροπλάστες, οι οποίοι είναι φωτοσυνθετικά ενεργοί, ενώ προς την ωριμότητα του αυτοί διαφοροποιούνται προς χρωμοπλάστες.

Στα πρώτα στάδια ανάπτυξης του ο νεαρός καρπός συσσωρεύει άμυλο (Ho and Hewitt, 1986). Η συσσώρευση αυτή είναι πιο έντονη στο εσωτερικό περικάρπιο και στον πλακούντα του αναπτυσσόμενου καρπού (Wang et al., 1994) και μπορεί να φτάσει μέχρι και το 20% του ξηρού του βάρους, αλλά είναι αμελητέα στον ώριμο κόκκινο. Οι Dinar and Stevens (1981) αναφέρουν πως η συσσώρευση αμύλου λειτουργεί και ως αποθήκη υδατανθράκων κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του καρπού και συνεισφέρει στο επίπεδο των διαλυτών εξοζών στον ώριμο καρπό.

Η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η φρουκτόζη αποτελούν τα κυρίως σάκχαρα που απαντούν στον καρπό της τομάτας (Ho and Hewitt, 1986). Η μεγαλύτερη συγκέντρωση εξοζών αποτελεί χαρακτηριστικό της καλλιεργούμενης τομάτας (*Solanum lycopersicon*), ενώ η συγκέντρωση της σακχαρόζης μειώνεται απότομα από το 1% νωπού βάρους κατά την καρπόδεση σε λιγότερο από 0.1%, ενώ στη συνέχεια παραμένει σταθερή μέχρι την ωρίμανση (Ho and Hewitt, 1986; Yelle et al., 1988). Αντίθετα, σε πολλά άγρια είδη τομάτας, όπως τα *S. hisrutum, S. chmielewskii και S. peruvianum* η συγκέντρωση της σακχαρόζης υπερβαίνει εκείνη των εξοζών κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και τελικά φτάνει το 70% με 90% των σακχάρων στον ώριμο καρπό (Yelle et al., 1991).

4.1 Η SPS στους ένσπερμους καρπούς

Στο στάδιο του ανώριμου καρπού (διαμέτρου 5 και 15mm) η πρωτεΐνη εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στις σπερματικές βλάστες. Αντίθετα, το σήμα εντοπισμού της πρωτεΐνης

ήταν ασθενέστερο στην περιοχή του πλακούντα, του ζελατινώδους παρεγχύματος και του περικαρπίου ***(Εικόνες 8, 10, 12, 13, 15 και 17)***.

Στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού ο εντοπισμός του ενζύμου ήταν έντονος στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες καθώς και στο εσωτερικό της σπερματικής βλάστης (περιοχή ενδοσπερμίου, ρίζας και κοτύλες). Στην περιοχή του περικαρπίου το ένζυμο της SPS εντοπίστηκε κυρίως στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και λιγότερο στα κύτταρα του εσωτερικού περικαρπίου ***(Εικόνες 19, 21, 23)***.

Επίσης, η SPS εντοπίστηκε έντονα στα αναπτυσσόμενα έμβρυα, το ενδοσπέρμιο και στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες τόσο κατά την αλλαγή χρώματος όσο και κατά το στάδιο του ώριμου καρπού ***(Εικόνες 25, 27, 29, 31 και 32)***. Άλλωστε, ο εντοπισμός του ενζύμου στο ενδοσπέρμιο δεν είναι μη αναμενόμενος επειδή το ενδοσπέρμιο στα δικότυλα φυτά είναι παροδικός ιστός που σχηματίζεται αρχικά και καταναλώνεται καθώς αυξάνεται το έμβρυο. Είναι λοιπόν πιθανόν να συμβαίνει σύνθεση της σακχαρόζης στον ιστό αυτό και διοχέτευση της στο έμβρυο μέσω φορέων σακχαρόζης οι οποίοι έχουν καταγραφεί στην τομάτα, όπως για παράδειγμα ο *LeSUT2* (Barker et al., 2000).

Τέλος, ο εντοπισμός της SPS στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες σε παρθενοκαρπικούς και ένσπερμους καρπούς πιθανόν να σχετίζεται με τη σύνθεση της σακχαρόζης κοντά στον ηθμό από εξόζες οι οποίες «αποφορτίζονται» από τους ηθμοσωλήνες. Πράγματι, οι Gear et al. (2000) έχουν εντοπίσει cDNA κλώνους *(LeHT1, LeHT2 και LeHT3)* που κωδικοποιούν τρείς πιθανούς φορείς εξοζών στη τομάτα. Ο *LeHT1* εκφράζεται στους νεαρούς καρπούς, στα ακρορρίζια καθώς και στα νεαρά φύλλα. Ο *LeHT2* εκφράζεται στα ώριμα φύλλα, στα άνθη και στις ώριμες ρίζες και ο *LeHT3* στους νεαρούς καρπούς και στα ακρορρίζια.

Η δραστικότητα της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης μελετήθηκε για τους ένσπερμους καρπούς τομάτας στα πέντε στάδια ανάπτυξης και κυμάνθηκε από 2 έως 23 nM σακχαρόζης/mg πρωτεϊνών*min ***(Σχήμα 1)***.

Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης των ένσπερμων καρπών η δραστικότητα του ενζύμου ήταν χαμηλή. Αυτό συμφωνεί και με τα αποτελέσματα του ανοσοεντοπισμού που δείχνουν μικρή έως ελάχιστη παρουσία του ενζύμου στο περικάρπιο ***(Εικόνες 12 και 17)***, το οποίο αποτελεί το μεγαλύτερο μέρος του καρπού.

Στο στάδιο του πράσινου ώριμου καρπού το ένζυμο παρουσίασε τη μέγιστη δραστικότητά του (περίπου 22 nM σακχαρόζης/mg πρωτεϊνών*min) ***(Σχήμα 1)***. Η υψηλή δραστικότητα του ενζύμου σε αυτό το στάδιο είναι δυνατό να αποδοθεί σε δύο παράγοντες. Αφενός στη φωτοσύνθεση του περικαρπίου αλλά κυρίως στη σύνθεση της σακχαρόζης από τους ιστούς του εμβρύου ***(Εικόνες 19, 21)*** όπως προκύπτει από τη σύγκριση της δραστικότητα του ενζύμου μεταξύ παρθενοκαρπικών και μη καρπών ***(Σχήμα 1)*** . Άλλωστε, το περικάρπιο του καρπού της τομάτας αποτελεί ένα φωτοσυνθετικά ενεργό ιστό (Smillie et al., 1999). Στο περικάρπιο η φωτοσυνθετική δέσμευση του $^{14}CO_2$ εμφανίζεται σε υψηλότερους ρυθμούς σε σχέση με τα φύλλα, όταν εκφράζεται με βάση τη συγκέντρωση των χλωροφυλλών (Laval-Martin et al., 1977). Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν επίσης ότι η φωτοσυνθετική δέσμευση του CO_2 ήταν εξαιρετικά χαμηλή στο ζελατινώδες παρέγχυμα παρόλο που ο συγκεκριμένος ιστός διαθέτει μεγαλύτερη συγκέντρωση χλωροφύλλης σε σχέση με το περικάρπιο.

Επίσης, οι Geromel et al. (2006) αναφέρουν ότι στο περικάρπιο καρπού καφέ *(Coffea arabica)* η δραστηριότητα της SPS ήταν αμελητέα στην πρώιμη φάση ανάπτυξης του καρπού, κατόπιν αυξήθηκε μέχρι μια μέγιστη τιμή (205 μέρες μετά την άνθηση) και μειώθηκε μέχρι την ωρίμανση. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν τόσο με τα δεδομένα του ανοσοεντοπισμού του ενζύμου όσο και με το πρότυπο μεταβολών της δραστικότητάς του που προσδιορίστηκε στα πειράματά μας.

Στο στάδιο της αλλαγής του χρώματος προσδιορίστηκε σχετικά μεγάλη δραστικότητα του ενζύμου, περίπου 9 nM σακχαρόζης/mg πρωτεϊνών*min ***(Σχήμα 1)***. Η μείωση της δραστικότητας είναι δυνατόν να αποδοθεί στη μερική μετατροπή των χλωροπλαστών σε χρωμοπλάστες, όπως άλλωστε αναφέρεται και από τους Piechulla et al. (1987). Η σχετικά αυξημένη τιμή σε αυτό το στάδιο σχετίζεται

με την πιθανή αυξημένη δραστικότητα του ενζύμου στα έμβρυα.

Αύξηση της δραστικότητας της SPS από 7 μmol/h/gr νωπού βάρους μέχρι και 32 μmol/h/gr νωπού βάρους αναφέρουν και οι Hubbard et al. (1989) κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των πεπονιών *(Cucumis melo L.)*. Επίσης, οι Lingle and Dunlap (1987) σε παρόμοια πειράματα στο πεπόνι αναφέρουν ότι η δραστικότητα της SPS ήταν αυξημένη κατά την ωρίμανση, και η αύξησή της μπορούσε να συσχετιστεί με τη συσσώρευση σακχαρόζης. Ωστόσο, η μέτρηση της δραστικότητας του ενζύμου βρέθηκε μια τάξη μεγέθους χαμηλότερη (3 μmol/h/gr νωπού βάρους) από ότι στην προηγούμενη μελέτη. Οι Miron and Schaffer (1991) προσδιόρισαν τη δραστικότητα της SPS στο άγριο είδος S. *hirsutum* οι καρποί του οποίου δεν αποδομούν τη χλωροφύλλη κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης. Η δραστικότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε στα 5μmol σακχαρόζης/g νωπού βάρους*h κατά τα πρώιμα στάδια της ανάπτυξης του καρπού και 40μmol σακχαρόζης/g νωπού βάρους*h κατά τα τελευταία στάδια ανάπτυξης. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με το γενικό πρότυπο της δραστικότητας του ενζύμου που προσδιορίσαμε στους ένσπερμους καρπούς. Η διαφορά που εντοπίζεται στο τελευταίο στάδιο (ώριμος κόκκινος καρπός) μπορεί να αποδοθεί στην αποδόμηση της χλωροφύλλης που συμβαίνει στα καλλιεργούμενα είδη. Επίσης, στο S. *peruvianum* (πρασινόκαρπη άγρια ποικιλία που συσσωρεύει σακχαρόζη) η μέγιστη δραστικότητα της SPS παρατηρήθηκε στα μετέπειτα στάδια της ανάπτυξης του καρπού, ήταν όμως τουλάχιστον πέντε φορές μικρότερη από την αντίστοιχη του S. *hirsutum* (Miron and Schaffer, 1991). Επιπλέον, ο Stommel (1992) αναφέρει ότι η δραστικότητα της SPS σε διάφορα στάδια ανάπτυξης της καλλιεργούμενης τομάτας S. *lycopersicon* ήταν χαμηλή (δεν ξεπέρασε τα 50 μmol σακχαρόζης/ h/g νωπού βάρους). Αν υποτεθεί ότι συγκέντρωση των πρωτεϊνών στον καρπό της τομάτας είναι περίπου 0.1% επί του νωπού βάρους, οι παραπάνω μετρήσεις της δραστικότητας του ενζύμου είναι 29-133 nM σακχαρόζης/mg πρωτεϊνών*min τιμές που βρίσκονται στη περιοχή των μετρήσεών μας δεδομένης της διαφοράς των ποικιλιών.

Στο στάδιο του ώριμου κόκκινου καρπού η δραστικότητα του ενζύμου μειώθηκε στα επίπεδα της δραστικότητας των πρώτων σταδίων της ανάπτυξής του ***(Σχήμα 1)***, όπως άλλωστε συμβαίνει και στις προηγούμενες αναφορές. Αυτό συμφωνεί με τα ευρήματα του Pischa (1987) που αναφέρει ότι στην τομάτα τύπου cherry η φρουκτόζη και η γλυκόζη αποτελούν τα κύρια σάκχαρα του καρπού με τη φρουκτόζη να απαντάται σε υψηλότερα επίπεδα από αυτά της γλυκόζης ιδιαίτερα στα στάδια της ωρίμανσης. Η σακχαρόζη, αν και υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις στον καρπό, εντούτοις είναι υψηλότερη στον ανώριμο πράσινο σε σχέση με τον ώριμο καρπό.

4.2 Η SPS στους παρθενοκαρπικούς καρπούς

Στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η πρωτεΐνη εντοπίστηκε κατά κύριο λόγο στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες και στις σπερματικές βλάστες. Αντίθετα, το σήμα εντοπισμού της πρωτεΐνης ήταν ασθενέστερο στην περιοχή του πλακούντα, του ζελατινώδους παρεγχύματος καθώς και του περικαρπίου ***(Εικόνες 9, 11, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 28 και 30)***.

Η δραστικότητα της SPS μελετήθηκε και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας σε πέντε στάδια ανάπτυξης. Η δραστικότητα του ενζύμου στους παρθενοκαρπικούς καρπούς ήταν χαμηλότερη σε σχέση με τους ένσπερμους, σε όλα τα στάδια εκτός από εκείνο του ανώριμου καρπού μεγέθους 5mm ***(Σχήμα 1)***. Τα αποτελέσματα αυτά μπορεί να αποδοθούν στο γεγονός ότι στους ένσπερμους καρπούς η ανάπτυξη του σπέρματος δημιουργεί μια καταβόθρα μεγάλης ισχύος για τους υδατάνθρακες που οδηγεί στην αυξημένη δραστικότητα της SPS. Ο Basra (2006) αναφέρει ότι κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του σπέρματος είναι πιθανή η επανασύνθεση σακχαρόζης στο έμβρυο ή στο ενδοσπέρμιο από τις εισαγόμενες εξόζες διαμέσου της δράσης της SPS. Για παράδειγμα, η δράση της SPS αυξήθηκε απότομα κατά το τέλος της φάσης της κυτταρικής διαίρεσης στις κοτυληδόνες του

Vicia faba. Η αυξημένη παρουσία του ενζύμου στο στάδιο αυτό μπορεί να σχετίζεται με τη σύνθεση σακχαρόζης και ως εκ τούτου με τη μείωση του πηλίκου εξόζη προς σακχαρόζη (Webber et al., 1997). Παρόμοια, η SPS έχει εντοπιστεί στη βασική περιοχή του αναπτυσσόμενου ενδοσπερμίου καλαμποκιού, εκεί όπου εκφράζεται μια ιμβερτάση συνδεδεμένη με το κυτταρικό τοίχωμα (Cheng and Chourey, 1999). Πιθανόν η σακχαρόζη να επανασυντίθεται στη συγκεκριμένη περιοχή από τα προϊόντα της δράσης της ιμβερτάσης, ενώ μέρος της υδρολυόμενης σακχαρόζης, ως εξόζες, έχει αποδειχθεί ότι προάγουν την αύξηση του σπάδικα (Cheng and Chourey, 1999). Άλλωστε, μεταβολικά, η σακχαρόζη είναι πιο σταθερή από τις εξόζες, και γι' αυτό το λόγο πιθανολογείται ότι η επανασύνθεση της σακχαρόζης ίσως είναι ο τρόπος μεταφοράς άνθρακα προς το ανώτερο μέρος του ενδοσπερμίου όπου και συσσωρεύεται άμυλο. Κατά το στάδιο του κόκκινου ώριμου καρπού δεν κατέστη δυνατόν να προσδιοριστεί η δραστικότητα του ενζύμου ***(Σχήμα 1)***.

Αναφορές σχετικές με τη δραστικότητα της SPS σε παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας δεν εντοπίστηκαν στη διεθνή βιβλιογραφία. Σε παρθενοκαρπικούς καρπούς της μουσμουλιάς (*Eriobotrya japonica* Lindl. 'Ninghai Bai'), όμως, οι οποίοι προήλθαν από ορμονικό χειρισμό, η δραστικότητα της SPS βρέθηκε σημαντικά μειωμένη σε σχέση με εκείνη των ένσπερμων καρπών (Junwei et al., 2006).

Η σχετικά μεγάλη δραστικότητα του ενζύμου που παρατηρείται στους παρθενοκαρπικούς καρπούς των 5mm (Σχήμα 1) πιθανόν να οφείλεται σε διαφορετικό ρυθμό διάσπασης της εισερχόμενης στον καρπό σακχαρόζης και ανασύνθεσης της (N'tchobo et al., 1999, Nguyen-Quoc et al., 1999).

Παρά το γεγονός ότι η δραστικότητα του ενζύμου παραμένει σε χαμηλά επίπεδα, εντούτοις παρουσιάζεται μικρή αύξηση της κατά τα στάδια του ώριμου πράσινου καρπού και του σταδίου αλλαγής του χρώματος. Αυτό είναι δυνατόν να συνδέεται με την μεγάλη υδρόλυση του αμύλου που παρατηρείται κατά τη διάρκεια των σταδίων αυτών, και τη μετατροπή μέρους του σε σακχαρόζη. Στον καρπό της μπανάνας, ο οποίος είναι επίσης παρθενοκαρπικός, και στον οποίο συμβαίνει ταχύτατη μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, η SPS παρουσιάζει αυξημένη δραστικότητα συμβάλλοντας στη σύνθεση σακχάρων από άμυλο (Hubbard et al., 1990). Από τα αποτελέσματά μας όμως, φαίνεται ότι στην τομάτα η συμβολή της SPS στη μετατροπή του αμύλου σε σάκχαρα είναι σχετικά περιορισμένη.

5. Συμπεράσματα

- Η μέγιστη δραστικότητα της συνθάσης της φωσφοροσακχαρόζης στους ένσπερμους καρπούς τομάτας εμφανίστηκε στο στάδιο του ώριμου πράσινου καρπού, ενώ στους παρθενοκαρπικούς παρατηρήθηκε σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης.

- Η διαφορά της δραστικότητας του ενζύμου που παρουσιάζεται κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων παρθενοκαρπικών και μη καρπών τομάτας μπορεί να αποδοθεί στην ανάπτυξη του εμβρύου.

- Η σχετικά αυξημένη δραστικότητα της SPS που παρουσιάζεται στους παρθενοκαρπικούς καρπούς στο στάδιο του ώριμου πράσινου και κατά την αλλαγή χρώματος μπορούν να συσχετιστούν με την υδρόλυση του αμύλου.

- Η παρουσία του ενζύμου στις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες φαίνεται να σχετίζεται με τη σύνθεση σακχαρόζης στον ιστό αυτό.

- Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του εμβρύου η SPS εντοπίζεται σε όλα τα όργανά του. Στα τελευταία όμως στάδια, η SPS δεν εντοπίστηκε στον κεντρικό κύλινδρο του εμβρυακού ριζιδίου.

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

Alabadí D, Aguero MS, Pérez-Amador MA, Carbonell J (1996) Arginase, arginine decarboxylase, ornithine decarboxylase, and polyamines in tomato ovaries: changes in unpollinated ovaries and parthenocarpic fruits induced by auxin and gibberellin. Plant Physiol **112**: 1237-1244

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

Anderson LE, Goldhaber IM, Li D, Tang X, Xiang M, Prakash N (1995). Αναφορά από **Winter H, Huber SC** (2000)

Archbold DD, Jr Dennis FG, Fiore JA (1982) Accumulation of ^{14}C labelled material from foliar-applied ^{14}C sucrose by tomato ovaries during fruit set and initial development. J Am Soc Hort Sci **107**: 19-23

Asahira T, Hosoki T, Shinya K (1982) Regulation of low temperature-induced malformation of tomato fruit by plant growth regulators. J Jpn Soc Hort Sci **50**: 468-474

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

Asahira T, Takeda Y, Nishio T, Hirabayashi M, Tsukamoto Y (1967). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005)

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

Avigad G, Dey PM (1997) Carbohydrate metabolism: Storage carbohydrates. In: Plant biochemistry (ed. Dey PM & Harborne JB). Academic Press. pp. 143–204

Babb VM, Haigler CH (2001) Sucrose phosphate synthase activity rises in correlation with high-rate cellulose synthesis in three heterotrophic systems. Plant Physiol **127**: 1234-1242

Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. Plant Cell **12**: 1153–1164

Basra AS (2006) Handbook of seed science and technology. The Haworth press. New York. pp. 141-143

Baxter CJ, Foyer CH, Rolfe SA, Quick WP (2001) A comparison of the carbohydrate composition and kinetic properties of sucrose phosphate synthase (SPS) in transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves expressing maize SPS protein with untransformed controls. Ann Appl Biol **138**: 47-55

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

Bianchi A, Soressi GP (1969). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005)

Blazquez MA, Green R, Nilsson O, Sussman MR, Weigel D (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. Plant Cell **10**: 791-800

Bohner J, Bangerth F (1988a). Αναφορά από Gillaspy **G, Ben-David H, Gruissem W** (1993)

Bruneau JM, Worrell AC, Cambou B, Lando D, Voelker TA (1991) Sucrose phosphate synthase, a key enzyme for sucrose biosynthesis in plants. Plant Physiol **96**: 473-478

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

Cakmak I, Hengeler C, Marschner H (1994) Changes in phloem export of sucrose in leaves in response to phosphorus, potassium and magnesium deficiency in bean plants. J Exp Bot **45**: 1251-1257

Castleden CK, Aoki N, Gillespie VJ, MacRae EA, Quick WP, Buchner P, Foyer CH, Furbank RT, Lunn JE (2004) Evolution and function of the sucrose-phosphate synthase gene families in wheat and other grasses. Plant Physiol **135**: 1–12

Castrillo, M (1992) Sucrose metabolism in bean plants under water deficit. J Exp Botany **43**:1557-1561

Cheng WH, Chourey PS (1999) Genetic evidence that invertase mediated release of hexoses is critical for appropriate carbon. Theor Appl Genet **98**: 485–495

Cheng WH, Im KH, Chourey PS (1996) Sucrose-phosphate synthase expression at the cell and tissue level is coordinated with sucrose sink-to-source transition in maize leaf. Plant Physiol **111**: 1021-1029

Chua TK, Bujnicki JM, Tan TC, Huynh F, Patel BK, Sivaramana J (2008) The structure of sucrose phosphate synthase from *Halothermothrix orenii* reveals its mechanism of action and binding mode. Plant Cell **20**: 1059-1072

Ciereszko I, Johansson H, Kleczkowski LA (2001) 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

Clegg JS (1992) Cellular infrastructure and metabolic organization. Cell Regul **33**: 3–14

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

Crookes PR, Grierson D (1983) Ultrastructure of tomato fruit ripening and the role of polygalacturonase isoenzymes in cell wall degradation. Plant Physiol **l72**: 1088-1093

Dali N, Michaud D, Yelle S (1992) Evidence for the involvement of sucrose phosphate synthase in the pathway of sugar accumulation in sucrose-accumulating tomato fruits. Plant Physiol **99**: 434–438

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

Davoren JD, Nykiforuk CL, Laroche A, Weselake RJ (2002) Sucrose-induced changes in the transcriptome of cell suspension cultures of oilseed rape reveal genes associated with lipid biosynthesis. Plant Physiol Biochem **40**: 719-725

Dinar M, Stevens MA (1981) The relationship between starch accumulation and soluble solids content of tomato fruits. J Am Soc Hort Sci **106** : 415-41

Doehlert DC, Huber SC (1985) The role of sulfhydryl groups in the regulation of spinach leaf sucrose phosphate synthase. Biochim Biophys Acta **830**: 267-273

Douglas P, Pigaglio E, Ferrer A, Halford NG, MacKintosh C (1996) Three spinach leaf nitrate reductase/3-hydroxy-3-methylglutarylCoA reductase kinases that are regulated by reversible phosphorylation and/or calcium ions. Biochem J **325**: 101-109

Echeverria E, Salvucci ME, Gonzalez P, Paris G, Salerno G (1997) Physical and kinetic evidence for an association between sucrose phosphate synthase and sucrose-phosphate phosphatase. Plant Physiol **115**: 223–227

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

Fos M, Nuez F, Garcia-Martinez JL (2000) The gene *pat-2*, which induces natural parthenocarpy, alters the gibberellin content in unpollinated tomato ovaries. Plant Physiol **122**: 471-479

Fos M, Proano K, Alabadí D, Nuez F, Carbonell J, García-Martínez JL (2003) Polyamine metabolism is altered in unpollinated parthenocarpic *pat-2* tomato ovaries. Plant Physiol **131**: 359-366

Fos M, Proano K, Nuez F, Garcia-Martinez JL (2001) Role of gibberellins in parthenocarpic fruit development induced by the genetic system *pat-3/pat-4* in tomato. Physiol Plantarum **111**: 545-550

Gaertner FH (1978) Unique catalytic properties of enzyme clusters. Trends Biochem Sci **3**: 63–65

Galtier N, Foyer CH, Huber J, Voelker TA, Huber SC (1993) Effects of elevated sucrose phosphate synthase activity on photosynthesis, assimilate partitioning and growth in tomato (*Lycopersicon esculentum* var. UC82B). Plant Physiol **101**: 535-543

Galtier N, Foyer CH, Murkie E, Alred R, Quick P, Voelker TA, Thepenier C, Lasceve G, Betsche T (1995) Effects of light and atmospheric carbon dioxide enrichment on photosynthesis and carbon partitioning in the leaves of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) plants overexpressing sucrose phosphate synthase. J Exp Botany **46**: 1335-1344

Gaudin V, Lunness PA, Fobert PR, Towers M, Riou-Khamlichi C, Murray JAH, Coen E, Doonan JH (2000) The expression of D-cyclin genes defines distinct developmental zones in snapdragon apical meristems and is locally regulated by the Cycloidea gene. Plant Physiol **122**: 1137-1148

Gear ML, McPhillips ML, Patrick JW, McCurdy DW (2000) Hexose transporters of tomato: molecular cloning, expression analysis and functional characterization. Plant Mol Biol **44**: 687–697

Geigenberger P, Krause KP, Hill LM, Reimholz R, MacRae E, Quick P, Sonnewald U, Stitt M Eds. (1995). The regulation of sucrose synthesis in leaves and tubers of potato plants. In: Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology. Rockville, MD, American Society of Plant Physiologists.

George W, Scott J, Spilttstoesser W (1984) Parthenocarpy in tomato. Hort Rev **6**: 65-84

Geromel C, Ferreira LP, Guerreiro SMC, Cavalari AA, Pot D, Pereira LFP, Leroy T, Vieira LGE, Mazzafera P, Marraccini P (2006) Biochemical and genomic analysis of sucrose metabolism during coffee (*Coffea arabica*) fruit development. J Exp Bot **57**: 3243-3258

Gibson RP, Lloyd RM, Charnock SJ, Davies GJ (2002) Characterization of *Escherichia coli* OtsA, a trehalose-6-phosphate synthase from glycosyltransferase family 20. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **58**: 349-351

Giegenberger P, Geiger M., Stitt M (1998). Αναφορά από **Winter H, Huber SC** (2000)

Gifford RM, Evans LT (1981) Photosynthesis, carbon partitioning and yield. Annu Rev Plant Physiol **32**: 485-509

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

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

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

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

Groot SPC, Bruinsma J, Karssen CM (1987) The role of endogenous gibberellin in seed and fruit development of tomato: Studies with a gibberellin-deficient mutant. Physiol Plantarum **71**: 184-190

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

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

Guy CL, Huber JL, Huber SC (1992) Sucrose phosphate synthase and sucrose accumulation at low temperature. Plant Physiol **100**: 502-508

Haigler CH, Hequet EF, Holaday AS, Krieg DR, Strauss RE, Wyatt BG, Gannaway JG, Jividen GM (2001) Update on the performance of transgenic cotton with over expressing sucrose-phosphate synthase. Proc Beltwide Cotton Conf **2**: 1416-1417

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

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)

Hendrix DL, Huber SC (1986) Diurnal fluctuations in cotton leaf carbon export, carbohydrate content, and sucrose synthesizing enzymes. Plant Physiol **81**: 584-586

Ho LC (1996) Tomato. In: Photoassimilate distribution in plants and crops, source-sink relationships. (ed. Zamski E, Shaffer AA). Marcel Dekker, Inc, New York. pp. 709-728

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

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

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

Holaday AS, Martindale W, Alred R, Brooks A, Leegood RC (1992) Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. Plant Physiol **98**: 1105-1114

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

Hubbard NL, Huber SC, Pharr DM (1989) Sucrose phosphate synthase and acid invertase as determinants of sucrose concentration in developing muskmelon (*Cucumis melo* L.) fruits. Plant Physiol 91: 1527-1534

Hubbard NL, Pharr DM, Huber SC (1990) Role of sucrose phosphate synthase in sucrose biosynthesis in ripening bananas and its relationship to the respiratory climacteric. Plant Physiol 94: 201-208

Huber JL, Huber SC (1992a) Site-specific serine phosphorylation of spinach leaf sucrose-phosphate synthase. Biochem J **283**: 877-882

Huber SC, Huber JL (1996) Role and regulation of sucrose-phosphate synthase in higher plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **47**: 431-444

Huber SC, Huber JL, Hanson DR (1990) Regulation of the partitioning of products of photosynthesis. In: Perspectives in Biochemical and Genetic Regulation of Photosynthesis. (ed. Zelitch I, Liss AR). New York. pp. 85-101

Huber SC, Huber JL, Kaiser WM (1994a) Differential response of nitrate reductase and sucrose-phosphate synthase-activation to inorganic and organic salts, *in vitro* and *in situ*. Plant Physiol **92**: 302-310

Huber SC, Kerr PS, Kalt-Torres W (1985) Regulation of sucrose formation and movement. In: Regulation of Carbohydrate Partitioning in Photosynthetic Tissue. (ed. Preiss J & Heath R).Waverly Press, Baltimore, MD. pp. 199-214

Huber SC, McMichael RW, Jr. Bachmann M, Huber JL, Shannon JC, Kang KK, Paul M (1996) Regulation of leaf sucrose phosphate synthase and nitrate reductase by reversible protein phosphorylation. In: Protein Phosphorylation in Plants. (ed. Shewry PR, Halford NG, Hooley R). Clarendon Press, Oxford. pp. 19-34

Iraqi D, Tremblay FM (2001) Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. J Exp Bot **52**: 2301-2311

Iyer S, Caplan A (1998) Products of praline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. Plant Physiol **116**: 203-211

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

Jeong R, Housley TL (1990). Αναφορά από **Winter H, Huber SC** (2000)

Jones TL, Ort DR (1997) Circadian regulation of sucrose phosphate synthase activity in tomato by protein phosphorylation activity. Plant Physiol **113**: 1167-1175

Jones TL, Tucker DE, Ort DR (1998) Chilling delays circadian pattern of sucrose phosphate synthase and nitrate reductase activity in tomato. Plant Physiol **118**: 149-158

Junwei C, Jianjun F, Qiaoping Q, Xiaokun L, Jiang W, Ming X (2006) Characteristics of sugar metabolism and accumulation in GA_3 induced parthenocarpic white flesh loquat'Ninghai Bai'fruit. Acta Hort Sinica **33**: 471-476

Kataoka K, Uemachi A, Nonaka M, Yazawa S (2004) Effect of endogenous gibberellins in the early stages of fruit growth and development of the *'Severianin'* tomato. J Hort Sci Biot **79**: 54-58

Kataoka K, Uemachi A, Yazawa S (2003) Fruit growth and pseudoembryo development affected by uniconazole, an inhibitor of gibberellin biosynthesis, in *pat-2* and auxin-induced parthenocarpic tomato fruits. Sci Hort **98**: 9-16

Kaurin A, Junttila O, Hansen J (1981). Αναφορά από **Winter H, Huber SC** (2000)

Kerr PS, Huber SC (1987) Coordinate control of sucrose formation in soybean leaves by sucrose-phosphate synthase and fructose-2,6bisphosphate. Planta **170**: 197-204

Kerr PS, Jr Rufty TW, Huber SC (1985) Endogenous rhythm s in photo synthesis, sucrose phosphate synthase activity, and stomatal resistance in leaves of soybean (*Glycine max* L. Merr.). Plant Physiol **77**: 275-280

King RW, Ben-Tal Y (2001) A florigenic effect of sucrose in *Fuschia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. Plant Physiol **125**: 488-496

Klein RR, Crafts-Brandner SJ, Salvucci ME (1993) Cloning and developmental expression of the sucrose-phosphate synthase gene from spinach. Planta **190**: 498–510

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

Komatsu A, Takanokura Y, Omura M, Akihama T (1996) Cloning and molecular analysis of cDNAs encoding three sucrose phosphate synthase isoforms from a citrus fruit (*Citrus unshiu* Marc.). Mol Gen Genet **252**: 346–351

Krause KP (1994). Αναφορά από **Winter H, Huber SC** (2000)

Krause KP, Hill L, Reimholz R, Nielsen TH, Sonnewald U, Stitt M (1998) Sucrose metabolism in cold-stored potato tubers with decreased expression of sucrose phosphate synthase. Plant Cell Environ **21**: 285-299

Langenkämper G, Fung RWM, Newcomb RD, Atkinson RG, Gardner RC, MacRae EA (2002) Sucrose phosphate synthase genes in plants belong to three different families. J Mol Evol **54**: 322–332

Laporte MM, Galagan JA, Prasch AL, Vanderveer PJ, Hanson DT, Shewmaker CK, Sharkey TD (2001) Promoter strength and tissue specificity effects on growth of tomato plants transformed with maize sucrose-phosphate synthase. Planta **212**: 817-822

Laval-Martin D, Farineau J, Diamond J (1977) Light versus dark carbon metabolism in cherry tomato fruits. I. Occurrence of photosynthesis. Study of the intermediates. Plant Physiol **60**: 872-876

Lehmann U, Wienkoop S, Tschoep H, Weckwerth W (2008) If the antibody fails – a mass Western approach. The Plant J **55**: 1039 - 1046

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

Lingle S, Dunlap JR (1987) Sucrose metabolism in netted muskmelon fruit during development. Plant Physiol **84**: 386-389

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki Y, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, *DREBI* and *DREB2*, with an *EREBP/AP2* DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought-and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. Plant Cell **10**: 1391-1406

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

Lunn JE, Furbank RT (1997) Localisation of sucrose-phosphate synthase and starch in leaves of C_4 plants. Planta **202**: 106–111

Lunn JE, Furbank RT (1999) Sucrose biosynthesis in C_4 plants. New Phytol **143**: 221-237

Lunn JE, Gillespie VJ, Furbank RT (2003) Expression of a cyanobacterial sucrose phosphate synthase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 in transgenic plants. J Exp Bot **54**: 1-15

Lunn JE, MacRae EA (2003) New complexities in the synthesis of sucrose. Curr Opin Plant Biol **6**: 208–214

Lukyanenko AN (1991) Parthenocarpy in tomato. In: Genetic improvement of tomato (ed. Kalloo G). Monographs on Theor Appl Genet Springer-Verlag, Berlin. pp. 167-177

Mapelli S, Frova C, Torti G, Soressi GP (1978) Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. Plant Cell Physiol **19**: 1281-1288

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

McMichael RW, Jr. Klein RR, Salvucci ME, Huber SC (1993) Identification of the major regulatory phosphorylation site in sucrose-phosphate synthase. Arch Biochem Biophys **307**: 248-252

McMichael RW, Jr. Kochansky J, Klein RR, Huber SC (1995) Characterization of the substrate specificity of sucrose-phosphate synthase protein kinase. Arch Biochem Biophys **321**: 71-75

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

Micallef BJ, Haskins KA, Vanderveer PJ, Roh KS, Shewmaker CK, Sharkey TD (1995) Altered photosynthesis, flowering, and fruiting in transgenic tomato plants that have an increased capacity for sucrose synthesis. Planta **196**: 327-334

Miron D, Schaffer AA (1991) Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in developing fruit 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

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

Nguyen-Quoc B, N'Tchobo H, Foyer C, Yelle S (1999) Overexpression of sucrose phosphate synthase increases sucrose unloading in transformed tomato fruit. J Exp Bot **50**: 785-791

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)

N'tchobo H, Dali N, Nguyen-Quoc B, Foyer C, Yelle S (1999) Starch synthesis in tomato remains constant throughout fruit development and is dependent on sucrose supply and sucrose synthase activity J Exp Bot **50**: 1457-1463

Nuez F, Costa J, Cuartero J (1986) Genetics of the parthenocarpy for tomato varieties *'Sub-Artic Plenty'*, '75/59' and *'Severianin'*. Z Pflanzenzucht **96**: 200-206

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

Ohto M, Onai K, Furkawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. Plant Physiol **127**: 252-261

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

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

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

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

Pagnussat G, Curatti L, Salerno G (2000) Rice sucrose-phosphate synthase: Identification of an isoform specific for heterotrophic tissues with distinct metabolite regulation from the mature leaf enzyme. Physiol Plantarum **108**: 337-344

Park JY, Canam T, Kang KY, Ellis DD, Mansfield SD (2008) Over-expression of an *Arabidopsis* family A sucrose phosphate synthase (SPS) gene alters plant growth and fibre development. Transgenic Res **17**: 181-92

Pecaut P and Philouze J (1978) A *sha-pat* line obtained by natural mutation. Tomato Genet Coop Rep **28**: 12

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

Philouze J (1983b) Natural parthenocarpy in tomato. I. Bibliographical review. Agronomie **3**: 611-620

Philouze J (1985). Αναφορά από **Gorguet B, van Heusden AW, Lindhout P** (2005)

Philouze J (1989) Natural parthenocarpy in tomato. IV. A study of the polygenic control of parthenocarpy in line *75/59*. Agronomie **9**: 63-75

Philouze J, Maisonneuve B (1978) Heredity of the natural ability to set parthenocarpic fruits in the Soviet variety *Severianin*. Tomato Genet Coop Rep **28**: 12-13

Philouze J, Pecaut P (1986) Natural parthenocarpy in tomato. III. Study of the parthenocarpy due to the gene *pat* (parthenocarpic fruit) in the line *Montfavet 191*. Agronomie **6**: 243-248

Piechulla B, Glick RE, Bahl H, Melis A, Gruissem W (1987) Changes in photosynthetic capacity and photosynthetic protein pattern during tomato fruit ripening. Plant Physiol **84**: 911-917

Pischa DH (1987) Sugar and organic acid content of cherry tomato fruit at different ripening stages. Hortscience **22**: 94-96

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

Quick P, Siegl G, Neuhaus HE, Feil R, Stitt M (1989) Short-term water stress leads to a stimulation of sucrose synthesis by activating sucrose-phosphate synthase. Planta **177**: 536-546

Quiros CF (1974). Αναφορά από **Warnock SJ** (1988) A review of taxonomy and phylogeny of the genus Lycopersicon. Hortscience **23**: 669-673

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

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

Reimholz R, Geigenberger P, Stitt M (1994) Sucrose phosphate synthase is regulated, via metabolites and protein phosphorylation, in potato tubers, in a manner analogous to the enzyme in leaves. Planta **192**: 480-488

Reimholz R, Geiger M, Haake V, Deiting V, Krause KP, Sonnewald V, Stitt M (1997) Potato plants contain multiple forms of sucrose-phosphate synthase, which differ in their tissue distributions, their levels during development, and their responses to low temperature. Plant Cell Environ **20**: 291-305

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

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

Rook F, Corke F, Card R, Munz G, Smith C, Bevan MW (2001) Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signalling. Plant J **26**: 421-433

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

Ross JJ, O'Neill DP, Smith JJ, Huub L, Kerckhoffs J, Elliott RC (2000) Evidence that auxin promotes gibberellin A_1 biosynthesis in pea. Plant J **21**: 547-552

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

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

Rufty TW, Jr Kerr PS, Huber SC (1983) Characterization of diurnal changes in activities of enzymes involved in sucrose biosynthesis. Plant Physiol **73**: 428-433

Sadka A, DeWald DB, May GD, Park WD, Mullet JE (1994) Phosphate modulates transcription of soybean *VspB* and other sugar-inducible genes. Plant Cell **6**: 737–749

Salerno GL, Echeverria E, Pontis HG (1996) Activation of sucrose phosphate synthase by a protein factor/sucrose-phosphate phosphatase. Cell Mol Biol **42**: 665–672

Salvucci ME, van de Loo FJ, Klein RR (1995) The structure of sucrose phosphate synthase. In: Sucrose Metabolism, Biochemistry, Physiology and Molecular Biology. (ed. Pontis HG, Salerno GL, Echeverria E). American Society of Plant Physiologists, Rockville. pp.1-10

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

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

Siegl G, MacKintosh C, Stitt M (1990) Sucrose-phosphate synthase is dephosphorylated by protein phosphatase 2A in spinach leaves. FEBS Lett **270**: 198 202

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

Smillie RM, Hetherington SE, Davies WJ (1999) Photosynthetic activity of the calyx, green shoulder, pericarp and locular parenchyma of tomato fruit. J Exp Bot **50**: 707-718

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

Sonnewald U, Quick WP, MacRae E, Krause KP, Stitt M (1993) Purification, cloning and expression of spinach leaf sucrose-phosphate synthase in *Escherichia coli*. Planta **189**: 174–181

Sonnewald U, Willmitzer L (1992) Molecular approaches to sink-source interactions. Plant Physiol **99**: 1267-1270

Srere PA (1987) Complexes of sequential metabolic enzymes. Annu Rev Biochem **56**: 89–124

Stommel JR (1992) Enzymic components of sucrose accumulation in the wild tomato species *Lycopersicon peruvianum*. Plant Physiol **99**: 324-328

Strand A, Foyer CH, Gustafsson P, Gardeström P, Hurry V (2003) Altering flux through the sucrose biosynthesis pathway in transgenic *Arabidopsis thaliana* modifies photosynthetic acclimation at low temperatures and the development of freezing tolerance. Plant Cell Environ **26**: 523-535

Stenzel I, Hause B, Maucher H, Pitzschke A, Miersch O, Ziegler J, Ryan CA, Wasternack C (2003) Allene oxide cyclase dependence of the wound response and vascular bundle-specific generation of jasmonates in tomato: amplification in wound signalling. Plant J **33**: 577–589

Steponkus PL, Lanphear FO (1968). Αναφορά από **Winter H, Huber SC** (2000)

Stitt M (1990) Fructose 2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **41**:153–185

Stitt M, Huber S, Kerr P (1987) Control of photosynthetic sucrose formation. In: The Biochemistry of Plants. A Compreshensive Treatise. (ed. Hatch MD, Boardman NK). Academic Press, New York. pp. 327-409

Stitt M, Muller C, Matt P, Gibon Y, Carillo P, Morcuende R, Scheible WR, Krapp A (2002) Steps towards an integrated view of nitrogen metabolism. J Exp Bot **53**: 959-970

Stitt M, Wilke J, Feil R, Heldt HW (1988) Coarse control of sucrose-phosphate synthase in leaves: alterations of the kinetic properties in response to the rate of photosynthesis and the accumulation of sucrose. Planta **174**: 217-230

Sugiharto B, Sakakibara H, Sumadi, Sugiyama T (1997) Differential expression of two genes for sucrose-phosphate synthase in sugarcane: molecular cloning of the cDNAs and comparative analysis of gene expression. Plant Cell Physiol **38**: 961–965

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

Theodorou ME, Cornel FA, Duff SMG, Plaxton WC (1992) Phosphate starvation-inducible synthesis of the alpha-subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. J Biol Chem **267**:21901–21905

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

Tognetti JA, Salerno GL, Crespi MD, Pontis HG (1990). Αναφορά από **Winter H, Huber SC** (2000)

Toroser D, Huber SC (1997) Protein phosphorylation as a mechanism for osmotic-stress activation of sucrose-phosphate synthase. Plant Physiol **114**:947-955

Toroser D, McMichael RW, Jr. Krause KP, Kurreck J, Sonnewald U, Stitt M, Huber, SC (1999) Site-directed mutagenesis of serine demonstrates its role in spinach leaf sucrose-phosphate synthase modulation. Plant J **17**: 407-413

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

Uggla C, Magel E, Moritz T, Sundberg B (2001) Function and dynamics of auxin and carbohydrates during earlywood/latewood transition in Scots pine. Plant Physiol **125**: 2029-2039

Urao T, Katagiri T, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Hayashida N, Shinozaki K (1994) Two genes that encode Ca^{+2}-dependent protein kinases are induced by drought and high-salt stresses in Arabidopsis thaliana. Mol Gen Genet **244**: 331-340

Usuda H and Shimogawara K (1993) Phosphate deficiency in maize. IV. Changes in amounts of sucrose phosphate synthase during the course of phosphate deprivation. Plant Cell Physiology **34**:767-770

Valdez-Alarcon JJ, Ferrando M, Salerno G, Jimenez-Moraila B, Herrera-Estrella L (1996) Characterization of a rice sucrose-phosphate synthase encoding gene. Gene **170**: 217–222

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. Tends Biotechnol **18**: 233-242

Vassey TL, Sharkey TD (1989) Mild water stress of *Phaseolus vulgaris* plants leads to reduced starch synthesis and extractable sucrose phosphate synthase activity. Plant Physiol **89**: 1066-1070

Vaughn MW, Harrington GN, Bush DR (2002) Sucrose-mediated transcriptional regulation of sucrose symporter activity in the phloem. Proc Natl Acad Sci USA **99**: 10876-10880

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

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

Walker JL, Huber SC (1989) Regulation of sucrose-phosphate synthase activity in spinach leaves by protein level and covalent modification. Planta **177**: 116-120

Wang F, Smith AG, Brenner ML (1994) Temporal and spatial expression pattern of sucrose synthase during tomato fruit development. Plant Physiol **104**: 535-540

Weber H, Borisjuk L, Wobus U (1997) Sugar import and metabolism during seed development. Trends in Plant Science **2**: 169-174

Weiner H, Jr McMichael R W, Huber SC (1992) Identification of factors regulating the phosphorylation status of sucrose-phosphate synthase *in vivo*. Plant Physiol **99**: 1435-1442

Weiner H, Weiner H, Stitt M (1993) Sucrose phosphate synthase phosphatase, a type 2A protein phosphatase, changes its sensitivity toward inhibition by inorganic phosphate in spinach leaves. FEBS Lett **33**: 159-164

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 Biochem Mol Biol **35**: 253-289

Worrell AC, Bruneau JM, Summerfelt K, Boersig M, Voelker TA (1991) Expression of maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. Plant Cell **3**: 1121–1130

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

Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q (2001) Activities of starch hydrolytic enzymes and sucrose-phosphate synthase in the stems of rice subjected to water stress during grain filling. J Exp Bot **52**: 2169-2179

Yelle S, Chetelat RT, Dorais M, DeVerna JW, Bennett AB (1991) Sink metabolism in tomato fruit. IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation. Plant Physiol **95**: 1026-1035

Yelle S, Hewitt JD, Robinson NL, Damon S, Bennett AB (1988) Sink metabolism in tomato fruit. III. Analysis of carbohydrate assimilation in a wild species. Plant Physiol **87**: 737-740

Zourelidou M, de Torres-Zabala M, Smith C, Bevan MW (2002) Storekeeper defines a new class of plant-specific DNA-binding proteins and is a putative regulator of patatin expression. Plant J **30**: 489-497

Zrenner R, Stitt M (1991) Comparison of the effect of rapidly and gradually developing water stress on carbohydrate metabolism in spinach leaves. Plant Cell Environ **14**: 939-946