

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

ΘΕΜΑ:

«Μεταβολισμός των υδατανθράκων κατά την ωρίμανση
ένσπερμων και άσπερμων καρπών τομάτας τύπου cherry».

Μεταπτυχιακή Μελέτη
Γρηγορίου Φωτεινή

Εξεταστική Επιτροπή:
Χ. Κ. Πάσσαμ, Καθηγητής (Επιβλέπων)
Γ. Αϊβαλάκις, Αναπλ. Καθηγητής
Κ. Ακουμιανάκης, Αναπλ. Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2011

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Χ. Κ. Πάσσαμ για την ανάθεση του θέματος και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά την πραγματοποίηση του πειράματος και τη συγγραφή της μελέτης. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω ειλικρινά τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Γ. Αϊβαλάκι για την καθοδήγηση και συμβολή του στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, καθώς και τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Κ. Ακουμιανάκη για τις συμβουλές του κατά τη συγγραφή της παρούσας μελέτης. Ευχαριστώ επίσης τον υποψήφιο διδάκτορα Γ. Τσανικλίδη για την πολύτιμη βοήθειά του στις μοριακές τεχνικές, τους φοιτητές Κ. Χριστόπουλο και Ν. Φλωρό για τη βοήθειά τους στη καλλιέργεια και τις μετρήσεις στο εργαστήριο. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Δρ. Ιωάννη Καραπάνο για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράστασή του κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Σελ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Η ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών της τομάτας	1
1.2. Μεταβολές υδατανθράκων κατά την ωρίμανση	3
1.3. Μεταβολές οξέων κατά την ωρίμανση	7
1.4. Μεταβολές στα ολικά διαλυτά στερεά κατά την ωρίμανση	9
1.5. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις και τη σύνθεση των υδατανθράκων και των οξέων κατά την αποθήκευση καρπών τομάτας	11
1.6. Επίδραση του σταδίου ωριμότητας κατά τη συγκομιδή στην ποιότητα των καρπών τομάτας	13
1.7. Μεταβολισμός των υδατανθράκων στον καρπό της τομάτας κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση	15
1.8. Εφαρμογή ορμονών και παρθενοκαρπία	21
1.9. Ορμονική ρύθμιση της ανάπτυξης των καρπών	26
1.10. Σκοπός της εργασίας	27
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	29
2.1. Καλλιέργεια φυτών cherry τομάτας και συλλογή πειραματικού υλικού	29
2.1.1. Σπορά	29
2.1.2. Εγκατάσταση στο θερμοκήπιο	29
2.1.3. Επεμβάσεις καρπόδεσης	30
2.1.4. Συλλογή και μεταχείριση του πειραματικού υλικού	31
2.2. Προσδιορισμός περιεκτικότητας των καρπών σε σάκχαρα, άμυλο, διαλυτά στερεά και οξύτητα	32
2.2.1. Προσδιορισμός ολικών διαλυτών στερεών	33
2.2.2. Προσδιορισμός τιτλοδοτούμενης οξύτητας	33
2.2.3. Προσδιορισμός σακχάρων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)	33
2.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός αμύλου	35
2.3. Στατιστική επεξεργασία	36
2.4. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και του πλήθους των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου στην τομάτα	37
2.4.1 Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς	37
2.4.2. Διαδικασία	38
2.4.3. Υδρόλυση DNA των δειγμάτων	39
2.4.4. Έλεγχος της ποιότητας του παραλαμβανόμενου RNA μέσω ηλεκτροφόρησης TAE σε πηκτή αγαρόζης 1,5% με φορμαμίδιο.	40
2.4.5. Παρασκευή cDNA	40

2.5. Προσδιορισμός του πλήθους των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου	41
2.5.1. Ενίσχυση ακολουθιών DNA με τη χρήση της τεχνικής PCR	41
2.5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time-PCR)	42
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	44
3.1. Μεταβολές σακχάρων, αμύλου, ολικών διαλυτών στερεών και τιτλοδοτούμενης οξύτητας των καρπών τομάτας κατά την ωρίμανση	44
3.1.1. Περιεκτικότητα των καρπών σε φρουκτόζη σε διάφορα στάδια ωρίμανσης	44
3.1.2. Περιεκτικότητα των καρπών σε γλυκόζη σε διάφορα στάδια ωρίμανσης	45
3.1.3. Περιεκτικότητα των καρπών σε σακχαρόζη σε διάφορα στάδια ωρίμανσης	46
3.1.4. Περιεκτικότητα των καρπών σε άμυλο σε διάφορα στάδια ωρίμανσης	47
3.1.5. Ολικά διαλυτά στερεά καρπών σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης	49
3.1.6. Τιτλοδοτούμενη οξύτητα καρπών σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης	50
3.2. Μεταβολές σακχάρων, αμύλου, ολικών διαλυτών στερεών και τιτλοδοτούμενης οξύτητας των καρπών τομάτας κατά την αποθήκευση	51
3.2.1. Περιεκτικότητα των καρπών σε φρουκτόζη κατά την αποθήκευση	51
3.2.2. Περιεκτικότητα των καρπών σε γλυκόζη κατά την αποθήκευση	52
3.2.3. Περιεκτικότητα των καρπών σε σακχαρόζη κατά την αποθήκευση	53
3.2.4. Ολικά διαλυτά στερεά των καρπών κατά την αποθήκευση	53
3.2.5. Τιτλοδοτούμενη οξύτητα καρπών κατά την αποθήκευση	54
3.2.6. Σύγκριση μεταξύ των ολικών διαλυτών στερεών και των ολικών σακχάρων	55
3.2.7. Σχηματική απεικόνιση των μεταβολών των υδατανθράκων και οξέων κατά την ανάπτυξη, ωρίμανση και αποθήκευση των καρπών	57
3.3. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου στην τομάτα	58
3.4. Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου στα διάφορα στάδια ανάπτυξης παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας.	64
3.4.1. Προσδιορισμός μέσω ημιποσοτικής PCR	64
3.4.2. Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση μέσω RT-PCR	66

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	68
4.1. Μεταβολές σακχάρων και οξέων σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς κατά την ωρίμανση	68
4.2. Διαφορές στο περιεχόμενο των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών σε υδατάνθρακες και οξέα	71
4.3. Μετασυλλεκτικές μεταβολές στο περιεχόμενο των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών σε υδατάνθρακες και οξέα	74
4.4. Η εμπλοκή της φωσφορυλάσης του αμύλου στο μεταβολισμό του αμύλου κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών cherry τομάτας	76
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	79

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών καλλιεργήθηκαν από τα τέλη Οκτώβρη του 2009 έως και τα τέλη Μάρτη του 2010 τα υβρίδια cherry τομάτας Conchita και Cherelino. Παρήχθησαν ένσπερμοι καρποί από φυσιολογική γονιμοποίηση των ανθέων και παρθενοκαρπικοί (άσπερμοι) καρποί με χρήση της ορμόνης β-NOA. Σκοπός ήταν να προσδιοριστεί η επίδραση της παρουσίας ή απουσίας των σπερμάτων στο περιεχόμενο των καρπών σε σάκχαρα (φρουκτόζη, γλυκόζη και σακχαρόζη), άμυλο, ολικά διαλυτά στερεά και στην τιτλοδοτούμενη οξύτητα σε διάφορα στάδια της ανάπτυξης των καρπών (διαμέτρου 15mm, φυσιολογικά ώριμου πράσινου, «σπασίματος» του χρώματος και στο ώριμο κόκκινο στάδιο) όπως και μετά από αποθήκευση ώριμων κόκκινων καρπών για 10 και 20 ημέρες στους 15°C και την παραμονή τους για 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου (22°C). Παράλληλα, έγινε προσπάθεια προσδιορισμού της δράσης της φωσφολυλάσης του αμύλου, ενζύμου που εμπλέκεται στην αποδόμηση του αμύλου, στα προαναφερθέντα στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσης.

Από τα αποτελέσματα του πειράματος προκύπτει ότι οι παρθενοκαρπικοί καρποί και των δύο υβριδίων στα τελικά στάδια ανάπτυξης υπερτερούν σε ολικά διαλυτά στερεά και σε εξόζες, υστερούν στο περιεχόμενό τους σε οξέα, εμφανίζουν νωρίτερα συσσώρευση των σακχάρων κατά την ωρίμανση και εντονότερη μείωση στην οξύτητα κατά το ώριμο κόκκινο στάδιο σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς. Η αποδόμηση του αμύλου κατά την ωρίμανση επηρεάστηκε από την παρουσία ή όχι σπόρου, αλλά ανάλογα με το γονότυπο. Κατά την αποθήκευση τα διαλυτά στερεά των καρπών αυξάνονται και η τιτλοδοτούμενη οξύτητα μειώνεται σε τέτοιο βαθμό ώστε να διατηρούνται οι διαφορές μεταξύ των ένσπερμων και των παρθενοκαρπικών καρπών. Οι μεταβολές είναι εντονότερες στο υβρίδιο Cherelino σχετιζόμενες και με τη μειωμένη μετασυλλεκτική ζωή σε σχέση με την Cherelino. Η καλή οπτική ποιότητα και οι όχι πολύ μεγάλες διαφορές στη σύσταση των παρθενοκαρπικών καρπών έναντι των ένσπερμων, συνηγορούν στην καλή ποιότητα των επαγόμενων από ορμόνες παρθενοκαρπικών cherry καρπών τομάτας.

Επιπρόσθετα, προσδιορίστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου που κωδικοποιεί την φωσφορυλάση του αμύλου και η συσσώρευση των μεταγραφημάτων στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης και ωρίμανσης. Σε αντίθεση με τα βιβλιογραφικά δεδομένα σε μεγαλόκαρπους γονότυπους, από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης προκύπτει

ότι η εισφορά της φωσφορυλάσης του αμύλου στην αποδόμηση του αμύλου στους καρπούς της cherry τομάτας δεν είναι κυρίαρχη, ενώ περαιτέρω έρευνα σχετικά με την αμυλολυτική δραστηριότητα στους καρπούς της τομάτας πρέπει να πραγματοποιηθεί.

ABSTRACT

Two cherry tomato hybrids (Conchita F1 and Cherelino F1) were cultivated in the glasshouse of the Laboratory of Vegetable Production from late October 2009 until March 2010 for the production of seeded and seedless fruits (parthenocarpic fruits by spraying open flower with the auxin β -NOA). The aim of this study was to evaluate the effect of the presence or absence of seeds within the fruit on the fruit content in sugars (fructose, glucose and sucrose), starch, total soluble solids and on the titratable acidity of fruits, at various stages of growth and ripening (15 mm diameter, mature green stage, breaker stage and red ripe stage) and after the storage of red ripe fruits for 10 and 20 days at 15°C plus shelf life for 3 days (at 22°C). In addition an effort was made to determine the activity of starch phosphorylase, an enzyme which is implicated in the breakdown of starch in ripening fruits, at all ripening stages.

Based on the data on the present study, seedless fruits of both hybrids were found to have higher content in total soluble solids and hexoses, and less acid content than seeded fruits. However, parthenocarpic fruits showed an earlier accumulation of sugars during ripening and their acid content declined more during the later stages of ripening. Starch breakdown during ripening was affected by the presence of seeds but in relation to the genotype tested. During storage, total soluble solids increased and titratable acidity decreased in such a way that did not affect the differences between seeded and seedless fruits observed in the red ripe stage. These differences were more obvious in the fruits of the Cherelino hybrid which have a less postharvest life compared to the Conchita fruits. In addition, parthenocarpic cherry tomatoes of both hybrids did not show visual defects and their quality characteristics were comparable to those of the seeded fruits.

The nucleotide sequencing of the gene which encodes the starch phosphorylase enzyme was specified and the transcript accumulation was determined at the stages of ripening. Contrasting to the current knowledge on the activity of starch phosphorylase on tomato fruits during ripening, our data suggest that in cherry tomato fruits the contribution of starch phosphorylase on the total amylolytic activity may not be dominant. Therefore, more research is needed to clarify the amylolytic activity in ripening tomato fruits.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

τομάτα, παρθενοκαρπία, άσπερμοι καρποί, ωρίμανση, αποθήκευση, υδατάνθρακες, ολικά διαλυτά στερεά, οξύτητα, φωσφορυλάση αμύλου

KEYWORDS

tomato, parthenocarpy, seedless fruits, ripening, storage, carbohydrates, total soluble solids, acidity, starch phosphorylase

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Η ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών της τομάτας

Ο χρόνος που απαιτείται από μία γονιμοποιημένη ωοθήκη να μετατραπεί σε ώριμο κόκκινο καρπό τομάτας κυμαίνεται στις 7-9 εβδομάδες, ανάλογα με την ποικιλία, τη θέση του καρπού πάνω στην ταξιανθία και τις συνθήκες του περιβάλλοντος (Ho and Hewitt, 1986). Αν και ο ρυθμός ανάπτυξης διαφέρει σημαντικά μεταξύ των καρπών των διαφόρων γονότυπων τομάτας, ο αθροιστικός ρυθμός ανάπτυξης μπορεί να περιγραφεί από μία σιγμοειδή καμπύλη που χωρίζεται σε δύο περιόδους. Αρχικά, για 2-3 εβδομάδες έως ότου ο καρπός φτάσει στο 10% του τελικού του βάρους η ανάπτυξη είναι αργή, με συνεχή αύξηση στην ημερήσια συσσώρευση ξηράς ουσίας από τα 30mg στα 150mg (Ho *et al.*, 1983). Ακολουθεί μία περίοδος ταχείας ανάπτυξης για 3-5 εβδομάδες, στο μέσο της οποίας (20-25 ημέρες μετά την άνθηση-HMA) παρατηρείται ο μέγιστος ημερήσιος ρυθμός αύξησης του νωπού βάρους (Mapelli *et al.*, 1978), του ξηρού βάρους (Ho *et al.*, 1983) και του όγκου (Varga and Bruinsma, 1976) του καρπού. Από το στάδιο του ώριμου-πράσινου (mature green stage) όπου ο καρπός έχει σχεδόν αποκτήσει το τελικό του μέγεθος, ακολουθεί μία περίοδος αργής ανάπτυξης για 2 εβδομάδες, όπου παρατηρείται μεν μικρή αύξηση στο νωπό βάρος, αλλά σημαντικές μεταβολικές αλλαγές. Η πρώτη αλλαγή στο χρώμα του καρπού (στάδιο «σπασίματος» χρώματος - breaker stage) εμφανίζεται 2-3 ημέρες μετά το στάδιο του ώριμου-πράσινου και προοδευτικά μεταβάλλεται από το κίτρινο στο πορτοκαλί και στο κόκκινο (Ho and Hewitt, 1986).

Η αρχική αργή ανάπτυξη προέρχεται από την διαίρεση των κυττάρων και την αρχική διεύρυνσή τους, ενώ η ακόλουθη έντονη ανάπτυξη προέρχεται αποκλειστικά από την διεύρυνση των κυττάρων. Όμως, αν και ο απόλυτος ρυθμός ανάπτυξης αρχικά είναι μικρός, ο σχετικός ρυθμός ανάπτυξης των καρπών αυξάνεται έντονα κατά το τέλος της πρώτης εβδομάδας και μετά μειώνεται λογαριθμικά όσο διαρκεί η ανάπτυξη του καρπού (Monselise *et al.*, 1978). Αντίστοιχα, μειώνεται και ο ημερήσιος ρυθμός εισροής άνθρακα στον καρπό από τα 140mg στο μισό, όταν το περιεχόμενο του καρπού σε άνθρακα αυξηθεί από το 20% στο 90% (Walker and Ho, 1977). Επιπρόσθετα, περίπου 10 ημέρες μετά το στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος παύει η εισροή μεταβολιτών εντός του καρπού,

λόγω σχηματισμού αφοριστικού ιστού μεταξύ του κάλυκα και του καρπού (McCollum and Skok, 1960).

Κατά την ανάπτυξη του καρπού η περιεκτικότητα σε ξηρά ουσία (ως ποσοστό επί του νωπού βάρους) μειώνεται, καθώς αυξάνεται το περιεχόμενό του σε νερό, από το 10% κατά την 10^η ΗΜΑ στο 5-7% κατά την 20^η ΗΜΑ, ποσοστό που διατηρείται έως και το ώριμο-κόκκινο στάδιο (red-ripe stage) (Gustafson, 1936). Όμως, το περιεχόμενο του καρπού σε άνθρακα εκφρασμένο ως ποσοστό της ξηράς ουσίας δεν μεταβάλλεται σημαντικά και παραμένει περίπου στο 39% σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης (Ho *et al.*, 1983). Αν και η ωρίμανση των καρπών μετά το ώριμο-πράσινο στάδιο δεν συνεισφέρει σημαντικά στη συσσώρευση ξηράς ουσίας στον καρπό, παρουσιάζει όμως έντονες μεταβολικές διεργασίες που οδηγούν σε σημαντικές μεταβολές στη χημική σύσταση του καρπού. Κατά την πορεία της ωρίμανσης παρατηρούνται μεταβολές σε όλα τα χαρακτηριστικά του καρπού. Πιο συγκεκριμένα, μεταβάλλεται το χρώμα λόγω αποδόμησης της χλωροφύλλης και οι χλωροπλάστες μετατρέπονται σε χρωμοπλάστες όπου και συσσωρεύονται οι χρωστικές β-καροτένιο και λυκοπένιο. Παράλληλα, μειώνεται το περιεχόμενο των κυτταρικών τοιχωμάτων σε γαλακτάνες, αραβινάνες και πολυουρονικά, διαλυτοποιούνται τα σύμπλοκα των πηκτινών με το ασβέστιο, αυξάνονται οι διαλυτές πηκτίνες και αποπολυμερίζονται τα πολυουρονικά, οδηγώντας σε σημαντικές αλλαγές στην υφή του καρπού, σε μαλάκωμα και απώλεια συνεκτικότητας. Ως προς το περιεχόμενο των καρπών σε σάκχαρα και οξέα, τα συστατικά δηλαδή που καθορίζουν τη γεύση των καρπών, το άμυλο αποδομείται οδηγώντας στην παραγωγή εξοζών (φρουκτόζης και γλυκόζης) και αυξάνεται η αναλογία των οξέων κιτρικό/μηλικό. Επίσης, αποδομούνται τα τοξικά αλκαλοειδή όπως η α-τοματίνη, αυξάνεται το γλουταμινικό οξύ, μειώνεται το περιεχόμενο σε πολυφαινόλες, πολυαμίνες και φωσφολιπίδια και αυξάνεται ο αριθμός και η ποσότητα των πτητικών ουσιών που προσδίδουν το άρωμα του καρπού (Grierson and Kader 1986; Hobson and Grierson, 1993).

Ο καρπός της τομάτας θεωρείται ως «πρότυπο» κλιμακτηριακού καρπού και έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές έρευνες σχετικά με τις βιοχημικές μεταβολές κατά την ωρίμανση των κλιμακτηριακών καρπών και τους μοριακούς μηχανισμούς που τις ρυθμίζουν. Το πρώτο προσδιορισμένο σημάδι έναρξης της ωρίμανσης είναι η αύξηση της παραγωγής του αιθυλενίου, δύο ημέρες πριν οποιαδήποτε ορατή αλλαγή στο χρώμα του καρπού. Η αύξηση της αναπνοής που παρατηρείται, φαίνεται πως αποτελεί αντίδραση στην αυξημένη σύνθεση του αιθυλενίου. Το τι προκαλεί τα γεγονότα αυτά είναι αδιευκρίνιστο, αλλά όταν αρχίσουν, επάγουν μία σειρά μεταβολών που οδηγούν στην

ωρίμανση (Hobson and Grierson, 1993). Στενά συνδεδεμένα με την αύξηση της αναπνοής είναι η αύξηση των επιπέδων του ATP, η απότομη αύξηση της πρωτεϊνοσύνθεσης και μία πρόσκαιρη αύξηση στο ρυθμό ενσωμάτωσης των προδρόμων ουσιών στις πρωτεΐνες (Brady, 1987).

Στον Πίνακα 1.1 και στο Σχήμα 1.1. παρουσιάζονται μερικές από τις μεταβολές στη σύσταση του καρπού της τομάτας και σε φυσιολογικές διεργασίες κατά την πορεία της ωρίμανσης.

Πίνακας 1.1. Μεταβολές στη σύσταση του καρπού τομάτας σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης (Από: Salunkhe *et al.*, 1974).

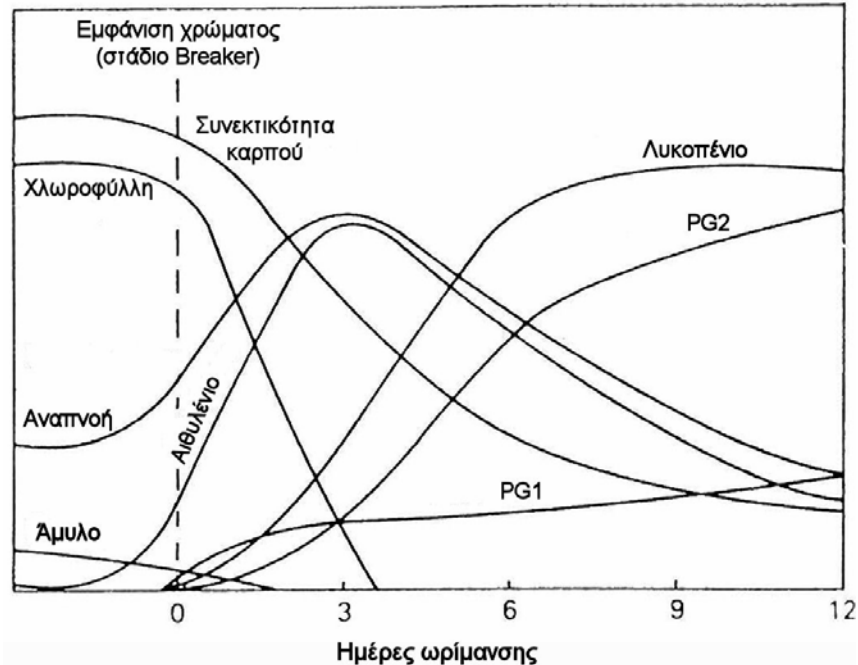
Συστατικό	Στάδιο ωριμότητας				
	Ωριμο πράσινο	Σπασίματος χρώματος	Ροζ	Κόκκινο	Ωριμο κόκκινο
Ξηρά ουσία (%)*	6,4	6,2	5,81	5,8	6,2
Τιτλοδ. οξύτητα (%)	0,285	0,31	0,295	0,27	0,285
Οργανικά οξέα (%)	0,058	0,127	0,144	0,166	0,194
Ασκορβικό οξύ (mg %)	14,5	17	21	23	22
Χλωροφύλλη (mg %)	45	25	9	0	0
β-καροτένιο (mg %)	50	242	443	10	0
Λυκοπένιο (mg %)	8	124	230	374	412
Αναγωγικά σάκχαρα (%)	2,4	2,9	3,1	3,45	3,65
Πηκτίνες (%)	2,34	2,2	1,9	1,74	1,62
Αμυλο (%)	0,61	0,14	0,136	0,18	0,07
Πτητικές ουσίες (ppb)	17	17,9	22,3	24,6	31,2
Πτητικές αναγωγικές ουσίες (μεq.%)	248	290	251	278	400
Αμινοξέα (μmol %)	-	2358	3259	2941	2723
N πρωτεϊνών (mg N/g ξ.β.)	9,44	10	10,27	10,27	6,94

*Με εξαίρεση το N πρωτεϊνών, τα % των συστατικών υπολογίζονται βάσει του ν.β.

1.2. Μεταβολές υδατανθράκων κατά την ωρίμανση

Στους ώριμους καρπούς της τομάτας τα σάκχαρα αποτελούν περίπου το 50% της συνολικής ξηράς ουσίας και το 53-65% των ολικών διαλυτών στερεών. Μεταξύ των διαφόρων εμπορικών ποικιλιών το περιεχόμενο των καρπών σε σάκχαρα ποικίλλει από 1,7% έως 4% του νωπού βάρους του καρπού και τα ολικά διαλυτά στερεά μεταξύ 4-9% (Stevens, 1972; Davies and Kempton, 1975; Davies and Hobson 1981). Η περιεκτικότητα των καρπών σε αναγωγικά σάκχαρα αυξάνεται από το 0,1% κατά την καρπόδεση στο 2% του νωπού βάρους μετά δύο εβδομάδες (Marre and Murneek, 1953). Στις εμπορικές

ποικιλίες τομάτας τα διαλυτά σάκχαρα είναι σχεδόν αποκλειστικά αναγωγικά σάκχαρα με τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη να επικρατούν, ενώ απαντώνται μικρές ποσότητες σακχαρόζης και μυοϊνοσιτόλης (Davies and Kempton, 1975).



Σχήμα 1.1. Μεταβολές στο μεταβολισμό και τη σύσταση του καρπού της τομάτας κατά την ωρίμανσή του (PG: πολυγαλακτουρονάση) (Από: McGlasson, 1993).

Κατά την πορεία της ωρίμανσης, τα ολικά σάκχαρα αυξάνονται προοδευτικά από το στάδιο του ώριμου πράσινου έως την πλήρη ωρίμανση (Winsor *et al.*, 1962a), με την εμφάνιση του κίτρινου χρώματος να σηματοδοτεί την έντονη αύξηση της συσσώρευσης των σακχάρων στον καρπό. Αν και στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης ο καρπός περιέχει περίπου διπλάσια ποσά γλυκόζης σε σχέση με τη φρουκτόζη, βαθμιαία παρατηρείται αύξηση της φρουκτόζης, έτσι ώστε κατά την ωρίμανση τα δύο σάκχαρα να είναι ισοδύναμα και κατά την ολοκλήρωση της ωρίμανσης να παρατηρείται ελαφρά επικράτηση της φρουκτόζης, με την γλυκόζη να μην παρουσιάζει ιδιαίτερη αύξηση μετά το στάδιο του ώριμου πράσινου (Πίνακας 1.2) (Dalal *et al.*, 1966; Davies and Kempton, 1975; Stevens *et al.*, 1977).

Η σακχαρόζη συναντάται σε μικρές ποσότητες, αποτελώντας το 1% του ξηρού βάρους ή το 0,1-0,2% του νεπού βάρους του ώριμου καρπού (Dalal *et al.*, 1966; Simandle *et al.*, 1966). Σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του καρπού η συγκέντρωση της σακχαρόζης

παραμένει χαμηλή, από το 1% του νωπού βάρους της ωοθήκης στο 0,2% του νωπού βάρους του καρπού εντός 8 ημερών από την καρπόδεση (Marree and Murneek, 1953), με περαιτέρω μείωση κατά την ωρίμανση του καρπού (Davies and Kempton, 1975). Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με το ότι η σακχαρόζη εισέρχεται στον αναπτυσσόμενο καρπό από τα φύλλα, αποτελεί το κεντρικό στοιχείο του μεταβολισμού των υδατανθράκων στον καρπό της τομάτας και ο ρυθμός της υδρόλυσής της στον καρπό θεωρείται ως ο κύριος ρυθμιστής του δυναμικού εισροής μεταβολικών στοιχείων στον αναπτυσσόμενο καρπό (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). Αντίθετα, σε μερικά άγρια είδη του γένους *Lycopersicon* συγγενή της τομάτας, όπως τα *Lycopersicon peruvianum*, *Lycopersicon hirsutum* (Manning and Maw, 1975; Miron and Schaffer, 1991) και *Lycopersicon chmielewskii* (Yelle *et al.*, 1988; Sun *et al.*, 1992), παρατηρείται συσσώρευση σακχαρόζης αντί εξοζών κατά την ωρίμανση του καρπού.

Σημαντικές είναι οι διαφορές στο περιεχόμενο των διαφόρων τμημάτων του καρπού της τομάτας σε σάκχαρα, με το περικάρπιο να περιέχει περισσότερα σάκχαρα σε σχέση με το ζελατινώδες παρέγχυμα (Janes, 1941; Winsor *et al.*, 1962). Όμως, σύμφωνα με τους Davies and Kempton (1975) και Stevens *et al.* (1977), σε ώριμους καρπούς τομάτας αν και η συγκέντρωση της γλυκόζης στο περικάρπιο ήταν υψηλότερη σε σχέση με το ζελατινώδες παρέγχυμα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συγκέντρωση της φρουκτόζης (Πίνακας 1.2.).

Πίνακας 1.2. Περιεκτικότητα σε γλυκόζη και φρουκτόζη (% νωπού βάρους) στο περικάρπιο και στο ζελατινώδες παρέγχυμα καρπών τομάτας κατά την πορεία της ωρίμανσης (Από: Davies and Kempton, 1975).

Στάδια ωριμότητας	Γλυκόζη (% v.β.)	Φρουκτόζη (% v.β.)	Γλυκόζη + Φρουκτόζη	Αναλογία Γλυκ./Φρουκ.
<u>Περικάρπιο</u>				
Ώριμο πράσινο	1,61	1,68	3,29	0,96
Πράσινο-Κίτρινο	1,71	1,87	3,58	0,92
Κίτρινο-Πορτοκαλί	1,74	1,87	3,61	0,87
Πορτοκαλί	1,69	1,68	3,37	0,96
Κόκκινο	1,62	1,70	3,32	0,90
<u>Ζελατινώδες παρέγχυμα</u>				
Ώριμο πράσινο	1,05	1,26	2,31	0,86
Πράσινο-Κίτρινο	1,25	1,55	2,80	0,79
Κίτρινο-Πορτοκαλί	1,21	1,56	2,77	0,79
Πορτοκαλί	1,23	1,59	2,82	0,77
Κόκκινο	1,22	1,60	2,82	0,75

Στη μικρόκαρπη ποικιλία μικρού βιολογικού κύκλου “Micro-Tom” η συγκέντρωση της σακχαρόζης ήταν υψηλότερη στους ιστούς του πλακούντα σε σχέση με το περικάρπιο σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης, ενώ ως προς την αναλογία της γλυκόζης και φρουκτόζης αν και στο περικάρπιο παρατηρήθηκε η προαναφερθείσα μεταβολή, στον πλακούντα στο διάστημα 20-45 ημερών μετά την άνθηση (HMA) η φρουκτόζη παρέμεινε σταθερή, ενώ η γλυκόζη μειώθηκε ελαφρά, αλλά μετά τις 45 HMA και η φρουκτόζη και η γλυκόζη αυξήθηκαν (Obiadalla-Ali *et al.*, 2004).

Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των καρπών το άμυλο συσσωρεύεται σε σχετικά υψηλά επίπεδα φθάνοντας το 1% του νωπού βάρους ή στο 20% της ξηράς ουσίας, 25-30 ημέρες μετά την άνθηση (Tanaka *et al.*, 1974a, Ho *et al.*, 1983; Varga and Bruinsma, 1985). Ο ρυθμός της συσσώρευσης του αμύλου μεγιστοποιείται 20 HMA, με το 30% της ημερήσιας συσσώρευσης διαλυτών στερεών να αντιστοιχεί στο άμυλο (Ho *et al.*, 1983). Αν και σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης του καρπού παρατηρείται ταυτόχρονα σύνθεση και αποδόμηση του αμύλου, έως και το ώριμο πράσινο στάδιο όπου ο καρπός έχει σχεδόν αποκτήσει το μέγιστο μέγεθος παρατηρείται συσσώρευση αμύλου, ενώ από το ώριμο πράσινο στάδιο η περιεκτικότητα σε άμυλο μειώνεται για να φτάσει στο ώριμο κόκκινο στάδιο σε πολύ χαμηλά επίπεδα (<0,1% του νωπού βάρους) (Hobson, 1967). Έχει παρατηρηθεί στενή συσχέτιση της περιεκτικότητας των ώριμων πράσινων καρπών σε άμυλο, με το περιεχόμενο των ώριμων κόκκινων καρπών σε ολικά διαλυτά στερεά, καθώς μέρος του αμύλου που αποδομείται κατά την ωρίμανση μετατρέπεται σε αναγωγικά σάκχαρα, τα οποία συμβάλουν σε μεγάλο ποσοστό στα ολικά διαλυτά στερεά (Dinar and Stevens, 1981; Ho *et al.*, 1983).

Υψηλότερες συγκεντρώσεις αμύλου έχουν μετρηθεί στον παρεγχυματικό ιστό και στον πλακούντα σε σχέση με το περικάρπιο (Janes, 1941). Αυτό, σε συνδυασμό με το διαφορετικό περιεχόμενο των ιστών αυτών σε σάκχαρα υποδηλώνουν διαφορές στο μεταβολισμό των υδατανθράκων μεταξύ των διαφορετικών ιστών του καρπού της τομάτας. Αν και η συσσώρευση του αμύλου στο περικάρπιο και στον πλακούντα των καρπών της ποικιλίας “Micro-Tom” ήταν όμοια 20 HMA, στο περικάρπιο το άμυλο αποδομήθηκε γρηγορότερα σε σχέση με τον πλακούντα, πιθανά λόγω του ρόλου του πλακούντα ως ιστού μεταφοράς θρεπτικών στοιχείων (π.χ. σακχάρων) στα αναπτυσσόμενα σπέρματα, όταν ο ρόλος του περικαρπίου περιορίζεται στο να προστατεύει τα σπέρματα εντός του καρπού. Το αποθησαυρισμένο άμυλο στον πλακούντα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την τροφοδοσία των σπερμάτων σε περίπτωση που η εισροή της σακχαρόζης από τα φύλλα διακοπεί, ενώ στο περικάρπιο η συσσώρευση των σακχάρων στην οποία συμβάλλει

η αποδόμηση του αμύλου, συντείνει στην ελκυστικότητα του καρπού ώστε να καταναλωθεί από τα ζώα με απώτερο σκοπό την διασπορά των σπόρων (Obiadalla-Ali *et al.*, 2004).

Το περιεχόμενο των καρπών της τομάτας σε διαλυτά στερεά και σάκχαρα ποικίλλει σημαντικά με την ποικιλία και το είδος του καρπού και κυμαίνεται μεταξύ 4-9% και 1,7-4% επί του νωπού βάρους αντίστοιχα (Davies and Hobson, 1981). Οι cherry τομάτες φέρουν υψηλότερα αναγωγικά σάκχαρα, ογκομετρούμενη οξύτητα και κιτρικό οξύ σε σχέση με τις μεγαλόκαρπες, στο ώριμο κόκκινο στάδιο (Kader *et al.*, 1977; Stevens *et al.*, 1977 a,b). Όπως και στις μεγαλόκαρπες ποικιλίες, σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των καρπών η φρουκτόζη και η γλυκόζη αποτελούν τα κυριότερα σάκχαρα, με την πρώτη να εμφανίζει υψηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ η σακχαρόζη εμφανίζεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με την υψηλότερη τιμή να παρατηρείται στο ώριμο πράσινο-στάδιο (Picha, 1987; Islam, 2001). Τα συνολικά σάκχαρα στους καρπούς της cherry τομάτας αυξάνονται κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης ακόμα και έως το ώριμο κόκκινο στάδιο (Picha, 1987; Islam, 2001), γεγονός που σύμφωνα με τις περισσότερες αναφορές συμβαίνει και στους μεγαλόκαρπους γονότυπους (Winsor *et al.*, 1962a; Dalal *et al.*, 1966; Salunkhe *et al.*, 1974; Robinson *et al.*, 1988), αν και σύμφωνα με τους Davies and Kempton (1975) παρατηρήθηκε αύξηση της γλυκόζης και φρουκτόζης έως το κίτρινο - πορτοκαλί στάδιο και μετέπειτα μείωση έως το ώριμο-κόκκινο. Επομένως, το γενικό πρότυπο μεταβολής των σακχάρων στις cherry και στις μεγαλόκαρπες τομάτες είναι όμοιο, αν και διαφέρει σε κάποια σημεία. Η χρήση των καρπών cherry τομάτας για ερευνητικούς σκοπούς φαίνεται να πλεονεκτεί, γιατί οι cherry καρποί είναι ομοιόμορφοι σε μέγεθος, μικροί και παράγονται σε αφθονία από τα φυτά (Picha, 1987; Islam, 2001). Οι μεταβολές των κυριότερων σακχάρων στους καρπούς δύο ποικιλιών cherry τομάτας σε διάφορα στάδια ωρίμανσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.3.

1.3. Μεταβολές οξέων κατά την ωρίμανση

Τα οργανικά οξέα αποτελούν ένα σημαντικό συστατικό των καρπών της τομάτας, συμβάλλοντας ιδιαίτερα στη γεύση ενώ αποτελούν και σημαντική πηγή αναπνευστικών υποστρωμάτων κυρίως κατά την περίοδο της κλιμακτηρίου όπου παρατηρείται έντονη αναπνευστική δραστηριότητα των καρπών. Αν και τα οργανικά οξέα αποτελούν μόνο το 0,4% του νωπού βάρους, οι διαφορές στο περιεχόμενο των καρπών σε οξέα μεταξύ των

διαφόρων ποικιλιών έχει σημαντικότερη επίδραση στη γεύση των καρπών σε σχέση με τις διαφορές μεταξύ του περιεχομένου σε σάκχαρα (Saltveit, 2005).

Πίνακας 1.3. Συγκέντρωση σακχάρων (% ν.β.) σε διάφορα στάδια ωρίμανσης καρπών cherry τομάτας των ποικιλιών Large Red Cherry και Small Fry (Από: Picha, 1987).

Στάδιο ωρίμανσης	ανώριμος πράσινος	ώριμος πράσινος	ροζ	ελαφρά κόκκινος	ώριμος κόκκινος
<i>Large Red Cherry</i>					
φρουκτόζη	1,26	1,31	1,67	1,89	2,00
γλυκόζη	0,97	1,02	1,32	1,50	1,67
σακχαρόζη	0,05	0,05	0,05	0,05	0,03
<i>Small Fry</i>					
φρουκτόζη	1,08	1,25	1,33	1,45	1,77
γλυκόζη	0,85	0,88	0,95	0,96	1,40
σακχαρόζη	0,05	0,04	0,03	0,03	0,03

Η συγκέντρωση των οργανικών οξέων στους καρπούς της τομάτας αυξάνεται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης έως και το στάδιο εμφάνισης του ροζ χρωματισμού, φτάνοντας σε περισσότερο από το 10% της ξηράς ουσίας των καρπών και συνεχή μείωση έκτοτε, έως την πλήρη ωρίμανση (Winsor *et al.*, 1962a; Dalal *et al.* 1966; Davies and Hobson, 1981). Σύμφωνα με τους Winsor *et al.* (1962b) η συγκέντρωση των οξέων του περικαρπίου αυξανόταν συνεχώς κατά την ανάπτυξη των καρπών, έλαβε μέγιστη τιμή στο στάδιο του ροζ χρώματος και δεν μεταβλήθηκε περαιτέρω κατά την ολοκλήρωση της ωρίμανσης. Αντίθετα, η οξύτητα του ζελατινώδους παρεγχύματος του καρπού που ήταν μέγιστη στο στάδιο του ώριμου-πράσινου, εμφάνισε συνεχή μείωση κατά την ωρίμανση, αλλά πάντα ήταν πολύ υψηλότερη εκείνης του περικαρπίου.

Τα επικρατέστερα οξέα που απαντώνται στους καρπούς της τομάτας είναι το κιτρικό και το μηλικό (Stevens, 1972; Sakiyama and Stevens, 1976), με την αναλογία τους να μεταβάλλεται κατά την ανάπτυξη των καρπών. Έτσι, το μηλικό οξύ είναι επικρατέστερο σε σχέση με το κιτρικό στους ανώριμους καρπούς έως και την έναρξη της ωρίμανσης (στάδιο ώριμου πράσινου) και μετέπειτα η συγκέντρωσή του μειώνεται απότομα στο περικάρπιο και ακόμη περισσότερο στο εσωτερικό του καρπού. Αντίθετα, το κιτρικό οξύ αυξάνεται κατά την φυσιολογική ωρίμανση των καρπών, αποτελώντας το κυριότερο οξύ των ώριμων κόκκινων καρπών, υπεύθυνο για το 40-90% της ολικής οξύτητας των καρπών διαφόρων ποικιλιών (Davies, 1966; Stevens, 1972; Davies and

Hobson, 1981). Δικαιολογώντας τις μεταβολές αυτές, οι Davies and Maw (1972) αναφέρουν ότι η οξειδωση και ο μεταβολισμός του κιτρικού και του μηλικού οξέος πραγματοποιούνται με όμοια ένταση στο στάδιο του ώριμου-πράσινου καρπού, σε αντίθεση με την εντονότερη οξειδωση του μηλικού οξέος στο ώριμο-κόκκινο στάδιο.

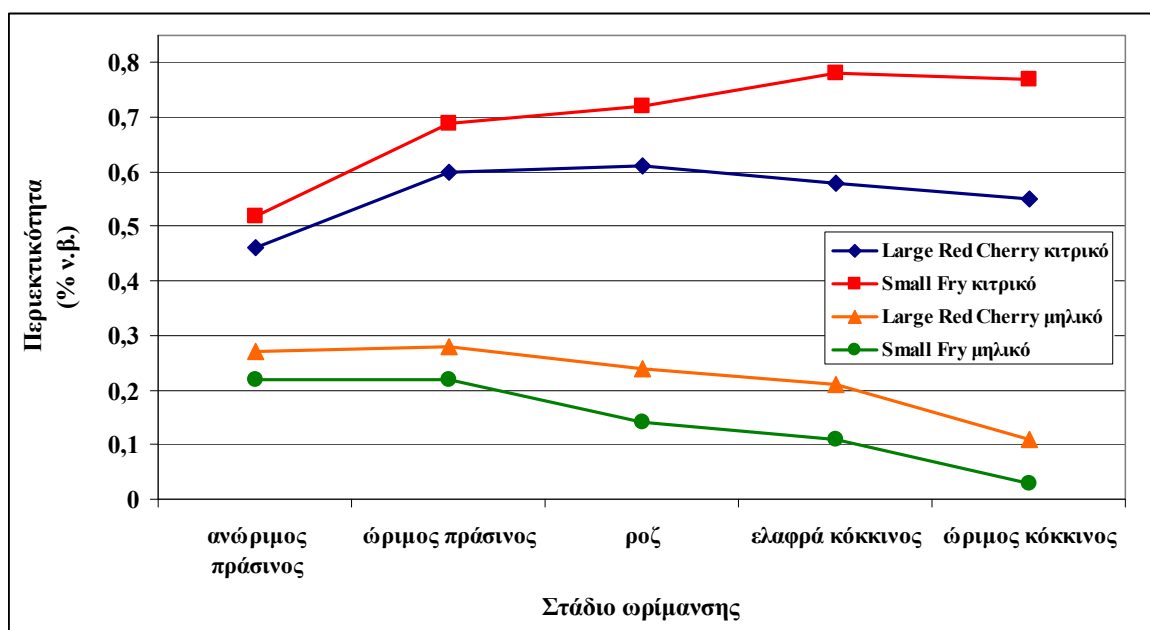
Οι μεταβολές αυτές αντανακλώνονται στις τιμές της ογκομετρούμενης οξύτητας των καρπών στα διάφορα στάδια της ανάπτυξής τους, που αυξάνεται έως το στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος (breaker stage) και έκτοτε μειώνεται (Winsor *et al.*, 1962a; Dalal *et al.*, 1966; Stevens, 1972), αν και κιτρικό οξύ φαίνεται να συσχετίζεται στενά με την ογκομετρούμενη οξύτητα των καρπών, σε αντίθεση με το μηλικό οξύ που δεν παρουσιάζει πάντα καλή συσχέτιση (Davies and Hobson, 1981). Η μέτρηση του pH των καρπών παρουσιάζει τις μεταβολές στο περιεχόμενό τους σε οξέα, με το pH να αυξάνεται κατά την ωρίμανση των καρπών, και να έχει χαμηλότερες τιμές στο ζελατινώδες παρέγχυμα σε σχέση με το περικάρπιο (Brecht *et al.*, 1976; Sapers *et al.*, 1978). Παρόλαυτά η συσχέτιση του pH και της ογκομετρούμενης οξύτητας των καρπών είναι συνήθως χαμηλή (Sapers *et al.*, 1978).

Αν και στους καρπούς της cherry τομάτας τόσο η ογκομετρούμενη οξύτητα όσο και η περιεκτικότητα στα κυριότερα οξέα, κιτρικό και μηλικό είναι υψηλότερα στο ώριμο κόκκινο στάδιο σε σχέση με τις μεγαλόκαρες ποικιλίες (Kader *et al.*, 1977; Stevens *et al.*, 1977a,b), το πρότυπο της μεταβολής της συνολικής οξύτητας και των μεμονωμένων οξέων (κιτρικό και μηλικό) κατά την ωρίμανση των καρπών ήταν όμοια με την προαναφερθείσα των μεγαλόκαρων ποικιλιών, όπως παρουσιάζεται για 2 ποικιλίες cherry τομάτας (“Large Red Cherry” και “Small Fry”) στο Σχήμα 1.2 (Picha, 1987).

1.4. Μεταβολές στα ολικά διαλυτά στερεά κατά την ωρίμανση

Τα ολικά διαλυτά στερεά στους ώριμους καρπούς τομάτας κυμαίνονται μεταξύ 4% και 9% επί του ξηρού βάρους ανάλογα με την ποικιλία (Davies and Hobson, 1981). Η περιεκτικότητα του καρπού σε συνολικά διαλυτά στερεά είναι αντιστρόφως ανάλογη με τη συνολική παραγωγή του φυτού (Stevens and Rudich, 1978), ενώ είναι ανάλογη με τον λόγο της φυλλικής επιφάνειας προς τον αριθμό των καρπών (Hewitt and Stevens, 1981), παράγοντες που καθορίζουν τον ρυθμό εξαγωγής των μεταβολιτών από τα φύλλα, και το δυναμικό απορρόφησης των μεταβολικών στοιχείων από τον καρπό (sink-strength) (Hewitt *et al.*, 1982). Η συγκέντρωση των ολικών διαλυτών στερεών στους ώριμους-

κόκκινους καρπούς εμφανίζει θετική συσχέτιση με τη συγκέντρωση του αμύλου, στις 28 ημέρες μετά την άνθηση (Young *et al.*, 1993).



Σχήμα 1.2. Μεταβολή των συγκεντρώσεων του κίτρικού και μηλικού οξέος κατά την ωρίμανση καρπών τομάτας τύπου cherry των ποικιλιών “Large Red Cherry” και “Small Fry” (Από: Picha, 1987).

Αν και τα ολικά διαλυτά στερεά των καρπών θεωρούνται ως δείκτης του περιεχομένου τους σε σάκχαρα λόγω της στενής θετικής συσχέτισης του περιεχομένου σε αναγωγικά σάκχαρα με τα διαλυτά στερεά (Jones and Scott, 1984, Malundo *et al.*, 1995), τα αναγωγικά σάκχαρα δεν ευθύνονται αποκλειστικά για το περιεχόμενο των καρπών τομάτας σε διαλυτά στερεά. Τα ολικά διαλυτά στερεά στον καρπό της τομάτας αποτελούνται από αναγωγικά σάκχαρα (φρουκτόζη -25% ξ.β. στον ώριμο κόκκινο καρπό και γλυκόζη-22%), οξέα (κίτρικό-9% και μηλικό -4%), δικαρβοξυλικά αμινοξέα (2%), λιπίδια (2%) και μεταλλικά στοιχεία (8%) (Davies and Hobson 1981). Επομένως, το περιεχόμενο των καρπών και σε άλλα υδατοδιαλυτά συστατικά πλην των σακχάρων, όπως τα οργανικά οξέα, οι διαλυτές πηκτίνες και το διαλυτό άμυλο συμβάλλουν σημαντικά στα ολικά διαλυτά στερεά των καρπών (Young *et al.*, 1993; Saltveit, 2005). Για το λόγο αυτό, σύμφωνα με τους Young *et al.* (1993) μία διαφορά κατά 44% στα ολικά διαλυτά στερεά μεταξύ δύο ποικιλιών τομάτας οφείλεται μόνο κατά 41% σε διαφορές στα αναγωγικά σάκχαρα και κατά 59% σε άλλα υδατοδιαλυτά στοιχεία, ενώ οι Cantwell *et al.* (2009)

παρατήρησαν αύξηση στα διαλυτά στερεά κατά την αποθήκευση καρπών τομάτας χωρίς να υπάρχει κάποια αύξηση στα σάκχαρα.

Τα διαλυτά στερεά (περιεχόμενο επί του νωπού βάρους του καρπού) αυξάνονται κατά την πορεία της ανάπτυξης και ωρίμανσης των καρπών της τομάτας, με μέγιστο ρυθμό κατά την έναρξη εμφάνισης του κίτρινου χρωματισμού (Winsor *et al.*, 1962a), παρά το γεγονός ότι η αναλογία της ξηράς ουσίας των καρπών μειώνεται με την ωρίμανση, λόγω αύξησης της απορρόφησης νερού από τους καρπούς (Young *et al.*, 1993).

Πίνακας 1.4. Σχέση μεταξύ του περιεχομένου νωπών καρπών τομάτας σε σάκχαρα και οξέα με την γεύση και το άρωμά τους (Από: Kader *et al.*, 1978).

Τιτλοδοτούμενη οξύτητα	Σάκχαρα (διαλυτά στερεά)	
	Υψηλά	Χαμηλά
Υψηλή	Καλή	Δριμεία
Χαμηλή	Ήπια	Άνοστη

Τα διαλυτά στερεά και η τιτλοδοτούμενη οξύτητα αποτελούν τα κυριότερα συστατικά της γεύσης των καρπών. Στη γεύση σημασία δεν έχει μόνο η περιεκτικότητα των καρπών σε διαλυτά στερεά και οξέα (περίπου 50% του ξηρού βάρους αναλογεί στα διαλυτά στερεά και 12% στα οξέα), αλλά και η αναλογία τους (Saltveit 2005). Καρποί με υψηλό περιεχόμενο σε σάκχαρα και οξέα έχουν άριστη γεύση, ενώ καρποί με χαμηλά σάκχαρα έχουν δριμεία γεύση και με χαμηλή οξύτητα «ήπια» γεύση (Πίνακας 1.4. - Kader *et al.*, 1978). Στα βελτιωτικά προγράμματα για την τομάτα, ιδιαίτερη προσπάθεια καταβάλλεται για την αύξηση του περιεχομένου των καρπών σε διαλυτά στερεά, με χρήση γονότυπων τομάτας που παρουσιάζουν υψηλά διαλυτά στερεά, όπως οι μικρόκαρπες (π.χ. cherry ή plum) ή οι υπαίθριες βιομηχανικές τομάτες.

1.5. Μεταβολές στις συγκεντρώσεις και τη σύνθεση των υδατανθράκων και των οξέων κατά την αποθήκευση καρπών τομάτας

Η μεταβολή των σακχάρων κατά την αποθήκευση των καρπών της τομάτας φαίνεται πως εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης κατά την συγκομιδή, την έναρξη της

αποθήκευσης και τη μέθοδο αποθήκευσης, δηλαδή τη διάρκεια, τη θερμοκρασία και την ατμόσφαιρα στην οποία έχουν αποθηκευτεί οι καρποί. Σε αυτούς τους παράγοντες θα πρέπει να συνυπολογιστεί και ο γονότυπος. Επομένως, τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με την επίδραση της αποθήκευσης στα επίπεδα σακχάρων των καρπών τομάτας είναι πολλές φορές αντιφατικά.

Έτσι, αν και οι Winsor *et al.* (1962a), αναφέρουν μείωση στη συγκέντρωση των σακχάρων κατά την συντήρηση καρπών τομάτας στο στάδιο του πορτοκαλί-κόκκινου χρώματος σε θερμοκρασία δωματίου (22°C), η συντήρηση σε ελεγχόμενες ατμόσφαιρες (2,5% O₂, 4% CO₂) περιόρισε την απώλεια σακχάρων σε ώριμους καρπούς και αύξησε τη συγκέντρωση των σακχάρων σε ανώριμους καρπούς (Goodenough *et al.*, 1982). Φαίνεται πως η αποθήκευση ανώριμων καρπών τομάτας σε συνθήκες που ευνοούν την ωρίμανση (υψηλές θερμοκρασίες και μη ελεγχόμενες ατμόσφαιρες) αυξάνουν το περιεχόμενο σε σάκχαρα, σε αντίθεση με την αποθήκευση κόκκινων ώριμων καρπών.

Η θερμοκρασία αποθήκευσης επηρεάζει σημαντικά τη μεταβολή των σακχάρων κατά την αποθήκευση, αλλά πάλι τα δεδομένα είναι αντιφατικά. Οι Maul *et al.* (2000) βρήκαν πως οι ελαφρά κόκκινοι καρποί της ποικιλίας “BHN-189” που αποθηκεύτηκαν στους 20°C για 8 ημέρες είχαν χαμηλότερα σάκχαρα και ολικά διαλυτά στερεά απ’ ότι στους 10°C, σε αντίθεση με τους de Leon-Sanchez *et al.* (2009) που παρατήρησαν το αντίθετο (ελαφρά αύξηση στους 20°C και μείωση στους 10°C) κατά την αποθήκευση ελαφρά κόκκινων καρπών της ποικιλίας “Saladette”. Αντίστοιχα, οι Gomez *et al.* (2009), κατά την αποθήκευση ώριμων καρπών cherry τομάτας της ποικιλίας “Micro-Tom” στους 20°C, παρατήρησαν αύξηση στα επίπεδα των αναγωγικών σακχάρων, όταν στους 6°C η αύξηση ήταν πολύ χαμηλότερη. Τέλος, οι Auerswald *et al.* (1999) και Krumbeln *et al.* (2004) μετά από σύντομης διάρκειας αποθήκευση ώριμων κόκκινων καρπών στους 20°C δεν παρατήρησαν σημαντικές διαφοροποιήσεις στα επίπεδα των αναγωγικών σακχάρων.

Αντίστοιχα, η οξύτητα των καρπών μεταβάλλεται μετά τη συγκομιδή των καρπών ανάλογα με το στάδιο ωριμότητας κατά τη συλλογή και τις συνθήκες συντήρησης. Οι υψηλότερες θερμοκρασίες συντήρησης (π.χ. 20°C) προκαλούν σημαντική μείωση στην οξύτητα των καρπών, ενώ σε χαμηλότερες θερμοκρασίες 8°-19°C η οξύτητα μειώνεται ανάλογα με τη θερμοκρασία αποθήκευσης (Jones and Scott, 1984; Maul *et al.*, 2000). Οι αναφορές για την επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών (<7°C) είναι αντιφατικές με το περιεχόμενο σε οξέα να είναι υψηλότερο ή ίσο (Maul *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2009) ή και χαμηλότερο (Toor and Savage, 2006; Cantwell *et al.*, 2009 Gomez *et al.*, 2009) σε σχέση με των καρπών που αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου, αλλά η μείωση είναι

πάντα πολύ χαμηλότερη σε σχέση με αυτή που προκαλούν οι υψηλότερες θερμοκρασίες. Έτσι, σύμφωνα με τους Maul *et al.* (2000) η αποθήκευση των καρπών σε χαμηλές θερμοκρασίες προκαλεί υποβάθμιση της γεύσης τους, και λόγω της διατήρησης υψηλών επιπέδων οξύτητας που προσδίδουν στο καρπό ανεπιθύμητα ξινή γεύση. Κατά την αποθήκευση τομάτας τύπου "cherry" για 1 και 2 εβδομάδες, η τιτλοδοτούμενη οξύτητα μειώθηκε στους 20°C ανεξάρτητα από το στάδιο ωρίμανσης, ενώ στους 10°C διατηρήθηκε (Jimenez *et al.*, 1996). Λόγω της ευαισθησίας του καρπού της τομάτας σε κρυοτραυματισμούς σε θερμοκρασίες αποθήκευσης κάτω των 10°C, οι χαμηλές θερμοκρασίες αποθήκευσης (π.χ. 7°C) επηρεάζουν τις μεταβολικές διαδικασίες κατά την ωρίμανση, όπως για παράδειγμα το μεταβολισμό των υδατανθράκων και των οξέων. Επιπρόσθετα, οι καρποί πριν τη κλιμακτήριο παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη ευαισθησία σε κρυοτραυματισμούς, επομένως η επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών στη μεταβολή των υδατανθράκων και οξέων της τομάτας κατά την αποθήκευσή της εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη διάρκεια της έκθεσης των καρπών στις θερμοκρασίες αυτές, το στάδιο ωρίμανσης κατά την έναρξη της αποθήκευσης και τον ευαισθησία του γονότυπου σε κρυοτραυματισμούς (Maul *et al.*, 2000; Gomez *et al.*, 2009).

1.6. Επίδραση του σταδίου ωριμότητας κατά τη συγκομιδή στην ποιότητα των καρπών τομάτας

Η ανάπτυξη των καρπών της τομάτας εξαρτάται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την εισαγωγή των προϊόντων της φωτοσύνθεσης από τα φύλλα στους καρπούς. Αν και οι πράσινοι καρποί της τομάτας φωτοσυνθέτουν, ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης είναι χαμηλός, αφού ακόμα και σε κορεσμό φωτός (>200W/m²), φτάνει μόνο στα 0,064 mg CO₂/g f.w./h, για τους νεαρούς καρπούς, ενώ δεν παρατηρείται φωτοσύνθεση σε πιο ανεπτυγμένους καρπούς, ή σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού (<40W/m²) (Tanaka *et al.*, 1974b). Επίσης, αν και παρατηρείται αφομοίωση του παραγόμενου CO₂ από την αναπνοή (dark fixation) με την εμπλοκή της καρβοξυλάσης του φωσφοροενολοπυροσταφυλικού στο περικάρπιο και στο ζελατινώδες παρέγχυμα (Laval-Martin *et al.*, 1977), το συνολικό ποσό του άνθρακα που αφομοιώνεται από τη φωτοσύνθεση του καρπού και από το dark fixation, αποτελεί κατά μέγιστο το 10-15% του άνθρακα που συσσωρεύεται στους καρπούς κατά την ανάπτυξή τους. Πιθανά η κυριότερη συνεισφορά της αφομοίωσης του CO₂ στους καρπούς είναι η διατήρηση εντός του καρπού του άνθρακα που εκλύεται από την αναπνοή ώστε να

χρησιμοποιηθεί στη σύνθεση πρωτεϊνών και χρωστικών κατά την ωρίμανση (Raymundo *et al.*, 1976).

Λόγω της τροφοδοσίας των αναπτυσσόμενων καρπών της τομάτας με μεταβολικά στοιχεία ακόμα και κατά τα πρώιμα στάδια της ωρίμανσής τους (π.χ. ώριμο-πράσινο στάδιο ή στάδιο σπασίματος του χρώματος), η συγκομιδή των καρπών σε αυτά τα στάδια επιδρά στα ποιοτικά τους χαρακτηριστικά σε σχέση με τους καρπούς που αφέθηκαν να ωριμάσουν πλήρως πάνω στα φυτά. Σύμφωνα με τους Betancourt *et al.* (1977), καρποί τομάτας δύο ποικιλιών (Ace 55 και Rick High Sugar) που αφέθηκαν να ωριμάσουν επάνω στο φυτό παρουσιάζουν ψηλότερες συγκεντρώσεις ολικών στερεών (κατά 9-15%), διαλυτών στερεών και αναγωγικών σακχάρων (κατά 18-23%) σε σχέση με καρπούς οι οποίοι συλλέχθηκαν στο στάδιο του σπασίματος του χρώματος (breaker stage) και αφέθηκαν να ωριμάσουν αποκομμένοι από το μητρικό φυτό. Οι καρποί που συλλέχθηκαν στο στάδιο σπασίματος του χρώματος είχαν συσσωρεύσει το 92,8% στην ποικιλία “Ace 55” και το 79,6% στην ποικιλία “Rick High Sugar”, των αναγωγικών σακχάρων που έφεραν οι καρποί στην πλήρη τους ωριμότητα, υποδηλώνοντας διαφορετικό ρυθμό συσσώρευσης σακχάρων στους καρπούς της τομάτας μεταξύ διαφορετικών γονότυπων, γεγονός που μπορεί να αποδίδεται εν μέρει και στον τρόπο ανάπτυξης του φυτού, όπως για παράδειγμα την αναλογία του φορτίου των καρπών και της φυλλικής επιφάνειας. Οι καρποί που συγκομίστηκαν στο στάδιο του σπασίματος του χρώματος και αφέθηκαν να ωριμάσουν εκτός του φυτού, παρουσίασαν στο ώριμο κόκκινο στάδιο μείωση στα διαλυτά στερεά και αναγωγικά σάκχαρα (ως και 12,9% και 10,7% αντίστοιχα), σε σχέση με τους καρπούς στο στάδιο του σπασίματος του χρώματος.

Αντίθετα, σύμφωνα με τους Pék *et al.* (2010) καρποί που συλλέχθηκαν πιο αργά, στο στάδιο αλλαγής χρώματος (turning stage) και παρέμειναν στους 15 ή 30°C στο σκοτάδι σε γενικές γραμμές δεν παρουσίασαν σημαντική υποβάθμιση των ποιοτικών τους χαρακτηριστικών (περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά, ολικά σάκχαρα, ολικά οργανικά οξέα, ολικές πολυφαινόλες), αν και είχαν χαμηλότερο περιεχόμενο σε βιταμίνη C και λυκοπένιο σε σχέση με καρπούς που ωρίμασαν πάνω στα φυτά. Όμοια, κατά τους Bisogni *et al.* (1976) οι καρποί που ωρίμασαν πάνω στα φυτά ήταν πιο αρωματικοί και είχαν καλύτερη συνολική ποιότητα, αλλά όχι σημαντικές διαφορές στα ολικά διαλυτά στερεά και στην τιτλοδοτούμενη οξύτητα σε σχέση με τους καρπούς που αποκόπηκαν και ωρίμασαν εκτός του φυτού.

Φαίνεται πως η επίδραση της ωρίμανσης των καρπών εκτός του φυτού στα ποιοτικά του χαρακτηριστικά εξαρτάται από το στάδιο ωρίμανσης στο οποίο ο καρπός συγκομίζεται,

γεγονός όμως που αλληλεπιδρά σημαντικά με τον γονότυπο. Έτσι, η συγκομιδή του καρπού σε πρώιμο στάδιο (π.χ. ώριμου πράσινου ή σπασίματος του χρώματος) για ωρίμανσή του εκτός του φυτού επιδρά αρνητικά στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του (μειωμένο περιεχόμενο σε σάκχαρα, οξέα και άρωμα) καθώς και σε άλλα ποιοτικά χαρακτηριστικά, όπως το χρώμα και το περιεχόμενο σε αντιοξειδωτικά (χαμηλότερο περιεχόμενο σε λυκοπένιο και βιταμίνη C), σε πολλές ποικιλίες τομάτας, συμπεριλαμβανομένης της cherry τομάτας (Betancourt *et al.*, 1977; Kader *et al.*, 1977; Picha, 1986; Stevens, 1986; Arias *et al.*, 2000).

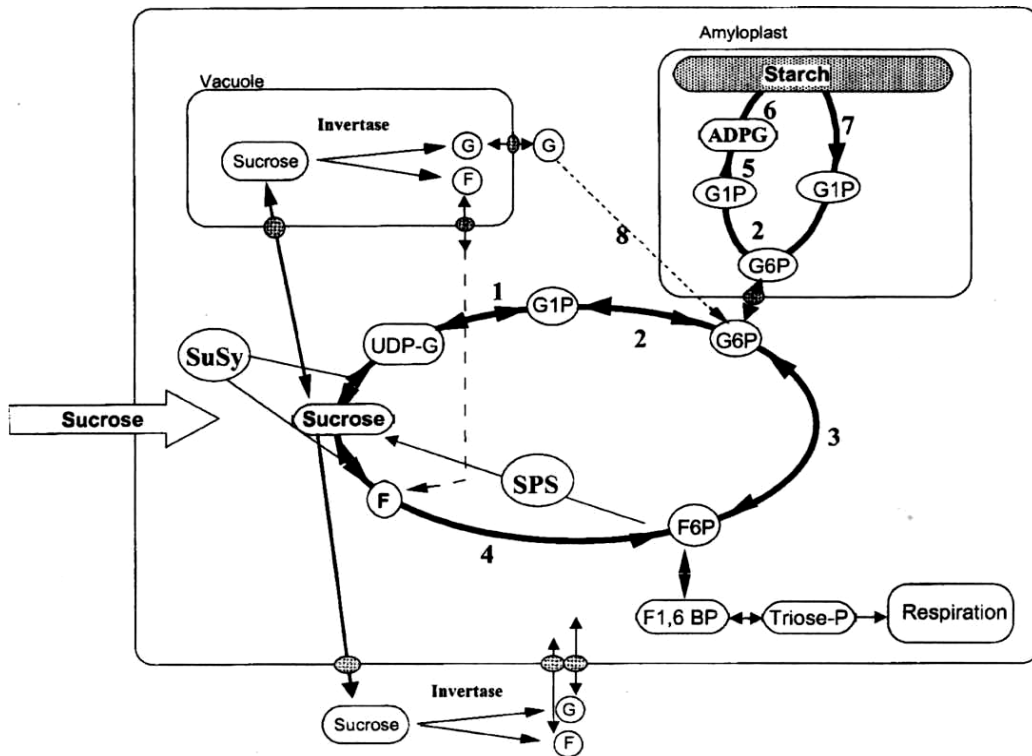
1.7. Μεταβολισμός των υδατανθράκων στον καρπό της τομάτας κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση

Εντός του φυτού της τομάτας, όπως και στα περισσότερα ανώτερα φυτά, η σακχαρόζη αποτελεί το κυριότερο μέσο μεταφοράς του άνθρακα. Οι αναπτυσσόμενοι καρποί, ως ισχυροί πόλοι έλξης θρεπτικών συστατικών, δέχονται κυρίως σακχαρόζη από τα φύλλα, την οποία και μεταβολίζουν. Σύμφωνα με τη σύγχρονη αντίληψη ως προς τη ρύθμιση του sink strength και του μεταβολισμού των υδατανθράκων στον καρπό της τομάτας, τα ένζυμα συνθετάση της σακχαρόζης (sucrose synthase - SuSy), συνθετάση της φωσφοροσακχαρόζης (sucrose phosphate synthase-SPS) και ιμπερτάση συμμετέχουν σε τέσσερις τουλάχιστον αλληλοκαλυπτόμενους ‘futile cycles’ (ανώφελους κύκλους) που σχετίζονται με την είσοδο της σακχαρόζης και τον μετέπειτα μεταβολισμό των υδατανθράκων εντός του καρπού, με τη σακχαρόζη να αποτελεί το κεντρικό μόριο του κύκλων αυτών (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001) (Σχήμα 1.3). Αν και το γενικό αυτό σχήμα του μεταβολισμού των υδατανθράκων στους καρπούς της τομάτας έχει προέλθει από έρευνα κυρίως σε μεγαλόκαρπους γονότυπους, φαίνεται πως ισχύει και στις cherry τομάτες (Islam, 2001).

1ος κύκλος: αποδόμηση και ανασύνθεση της σακχαρόζης στο κυτταρόπλασμα

Ο ρυθμός εισόδου της σακχαρόζης στον καρπό της τομάτας εξαρτάται από το στάδιο της ανάπτυξης. Έτσι, κατά τα πρώτα στάδια (έως 30-35 ημέρες μετά την άνθηση - HMA) που η ανάπτυξη είναι ταχεία, παρατηρείται έντονη εισροή σακχαρόζης συμπλασμικά (Dali *et al.*, 1992; N'tchobo *et al.*, 1999). Εντός των κυττάρων η SuSy υπό την παρουσία ουριδινοδιφωσφορικών μορίων (UDP) μετατρέπει τη σακχαρόζη σε UDP-

γλυκόζη και φρουκτόζη για να καλύψει την έντονη σύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων και αμύλου, όπως υποδεικνύει η στενή συσχέτιση μεταξύ της ενεργότητας της SuSy και του υψηλού ρυθμού ανάπτυξης του καρπού και συσσώρευσης του αμύλου (Yelle *et al.*, 1988). Παράλληλα, μικρή ποσότητα σακχαρόζης εξάγεται από το κυτταρόπλασμα στους μεσοκυττάριους χώρους, υδρολύεται από τις αποπλαστικές ιμβερτάσες και επιστρέφει εντός του κυτταροπλάσματος ως εξόζες μέσω του 3^{ου} κύκλου που περιγράφεται ακολούθως (N'tchobo *et al.*, 1998). Γενικότερα, η εισροή της σακχαρόζης στον αναπτυσσόμενο καρπό γίνεται κυρίως συμπλασματικά και φαίνεται πως ελέγχεται από τη δραστηριότητα της SuSy, η οποία φαίνεται πως καθορίζει και την ένταση της εισροής στους καρπούς των μεταβολιτών που παράγονται από τα όργανα-πηγές (sink strength).



Σχήμα 1.3. Οι τέσσερις κυριότεροι κύκλοι που μετέχουν στο μεταβολισμό της σακχαρόζης στον καρπό της τομάτας (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001).

Ο πρώτος κύκλος αφορά την αποδόμηση της σακχαρόζης στο κυτταρόπλασμα μέσω της SuSy και την ανασύνθεσή της από την SPS. Ο δεύτερος κύκλος περιλαμβάνει την αποδόμηση της σακχαρόζης στο χυμοτόπιο από την ιμβερτάση και την ανασύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα από την SPS ή τη SuSy. Ο τρίτος κύκλος αφορά την αποδόμηση της σακχαρόζης αποπλαστικά από την ιμβερτάση, και την ανασύνθεσή της από την SPS ή τη SuSy στο κυτταρόπλασμα. Ο τέταρτος κύκλος αφορά την ταυτόχρονη σύνθεση και αποδόμηση του αμύλου στους αμυλοπλάστες και τη σύνδεση με το κυτταρόπλασμα μέσω της G6P. Ένζυμα: (1) πυροφωσφορυλάση της UDP-γλυκόζης, (2) φωσφογλυκομουτάση (3) ισομεράσης της φωσφορογλυκόζης, (4) φρουκτοκινάση και εξοκινάση, (5) πυροφωσφορυλάση της ADP-γλυκόζης, (6) συνθετάση του αμύλου, (7) φωσφορυλάση του αμύλου και αμυλάση, (8) γλυκοκινάση και εξοκινάση

Αν και η SuSy σχετίζεται κυρίως με την αποδόμηση της σακχαρόζης, συμμετέχει επίσης στην ανασύνθεσή της εντός του κυτταροπλάσματος μαζί με την SPS (Geigenberger and Stitt, 1993; Viola, 1996). Όμως, ο ρυθμός ανασύνθεσης της σακχαρόζης είναι σταθερός ανεξάρτητα από την ηλικία και το στάδιο ανάπτυξης του καρπού (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001).

2^{ος} κύκλος: υδρόλυση της σακχαρόζης στα χυμοτόπια και ανασύνθεση στο κυτταρόπλασμα

Από τις 30-35 ΗΜΑ (ο καρπός πλησιάζει στο φυσιολογικά ώριμο πράσινο στάδιο) έως και την πλήρη ωρίμανση, ο ρυθμός ανάπτυξης των καρπών μειώνεται και ελάχιστη ξηρά ουσία συσσωρεύεται επιπρόσθετα. Στα στάδια αυτά παρατηρείται κυρίως υδρόλυση της σακχαρόζης σε μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, φρουκτόζη) εντός των χυμοτοπίων μέσω της δράσης της διαλυτής όξινης ιμπερτάσης (υδρολάση) (Ruan και Patrick, 1995; Husain *et al.*, 1999). Οι παραγόμενες εξόζες κυρίως συσσωρεύονται εντός των χυμοτοπίων, αν και ένα μέρος τους επιστρέφει στο κυτταρόπλασμα. Αν και η ιμπερτάση έχει εντοπιστεί επίσης στα κυτταρικά τοιχώματα και στους μεσοκυττάριους χώρους η δράση της στα χυμοτόπια φαίνεται να είναι εντονότερη (Sato *et al.*, 1993). Η ιμπερτάση επίσης συμμετέχει στην υδρόλυση της ραφφινόζης, την υδρόλυση και τη σύνθεση φρουκτανών (Pollock, 1986) ή τη σύνθεση σακχαρόζης από ραφφινόζη και γλυκόζη, γεγονότα όμως ήσσονος σημασίας (Nadkarni *et al.*, 1992). Αν και στα φωτοσυνθετικά κύτταρα το “futile cycle” μεταξύ της σακχαρόζης και των εξοζών είναι περιορισμένο σε ένταση λόγω της σημασίας στη σύνθεση σακχαρόζης, στους καρπούς της τομάτας η υψηλή συγκέντρωση των εξοζών στα χυμοτόπια και η ταχεία ανασύνθεση και αποδόμηση της σακχαρόζης στο κυτταρόπλασμα υποδεικνύουν την ύπαρξη ενός περισσότερο ενεργού “futile cycle” αλληλομετατροπής της σακχαρόζης σε εξόζες και αντίστροφα. Η συσσώρευση εξοζών στο χυμοτόπιο πιθανά αποσκοπεί στην αποτελεσματικότερη αποθήκευση των σακχάρων και στη χρήση τους για την ανάπτυξη των κυττάρων του καρπού σε περιόδους εξάντλησης των μεταβολιτών από τα φύλλα (π.χ. νυχτερινή περίοδος), στην αύξηση του ωσμωτικού δυναμικού των κυττάρων και στην βελτίωση στην εισροή των θρεπτικών συστατικών (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). Έτσι, μεταλλάξεις τομάτας με χαμηλή δράση ιμπερτάσης παράγουν σχετικά λιγότερους καρπούς υπό συνθήκες μικρής φωτοπεριόδου, χαμηλών θερμοκρασιών ή περιορισμένου φωτισμού, σε σχέση με καλλιεργούμενα φυτά, όταν υπό κανονικές συνθήκες η παραγωγή τους είναι ικανοποιητική (Klann *et al.*, 1996).

3^{ος} κύκλος: υδρόλυση της σακχαρόζης αποπλαστικά και ανασύνθεσή της στο κυτταρόπλασμα

Κατά τα στάδια της ωρίμανσης του καρπού (από τις 30-35 HMA και μετά), η εισροή της σακχαρόζης στον καρπό μειώνεται και γίνεται κυρίως αποπλαστικά υπό μορφή εξοζών μετά την υδρόλυσή της από την αποπλαστική όξινη ιμβερτάση (Walker *et al.*, 1978), η οποία απαντάται σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης των καρπών (Sato *et al.*, 1993). Οι εισερχόμενες εξόζες μετατρέπονται ξανά σε σακχαρόζη στο κυτταρόπλασμα συμμετέχοντας έτσι σε ένα νέο κύκλο αποδόμησης και ανασύνθεσης της σακχαρόζης. Αντίθετα, κατά τα στάδια της ταχείας ανάπτυξης του νεαρού καρπού η δράση της αποπλαστικής ιμβερτάσης είναι άγνωστη. Θεωρείται ότι η αποπλαστική υδρόλυση της σακχαρόζης αλληλοσυνδέεται με τον 2^ο κύκλο (αποδόμηση σακχαρόζης στα χυμοτόπια), έτσι ώστε η συγκέντρωση των εξοζών στα κύτταρα να εξαρτάται μόνο από τη δράση των ιμβερτασών, ανεξάρτητα με την περιοχή δράσης τους (αποπλαστικά ή στα χυμοτόπια) (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001).

4ος κύκλος: σύνθεση και αποδόμηση του αμύλου στους αμυλοπλάστες

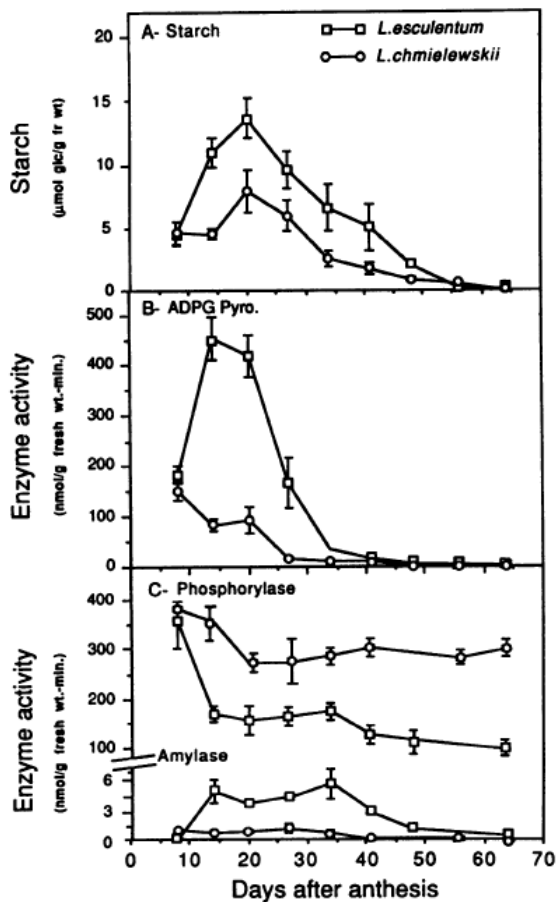
Στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των καρπών (0-20 HMA) πραγματοποιείται κυρίως σύνθεση αμύλου, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο της ανάπτυξης (20-35 HMA) και κατά την περαιτέρω ωρίμανση των καρπών παρατηρείται αποδόμηση του αμύλου. Παρόλαυτά, σύνθεση και αποδόμηση αμύλου παρατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, συνιστώντας ένα ακόμα “futile cycle” (N'tchobo *et al.*, 1999; D' Aoust *et al.*, 1999). Το φαινόμενο της ταυτόχρονης σύνθεσης και αποδόμησης του αμύλου στους αμυλοπλάστες έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη, όπως είναι η μπανάνα (Hill and ap Rees, 1994) και η πατάτα (Viola 1996; Sweetlove *et al.*, 1996, 1999).

Οι εξόζες που προέρχονται από τη σακχαρόζη φωσφορυλώνονται από την εξοκινάση και τη φρουκτοκινάση ώστε να χρησιμοποιηθούν σε άλλες μεταβολικές οδούς, όπως είναι η γλυκόλυση και η σύνθεση του αμύλου. Από τους δύο αλληλόμορφους που ελέγχουν την έκφραση της φρουκτοκινάσης (Frk1 και Frk2) στα φυτά της τομάτας, μόνο το Frk2 συμμετέχει στη σύνθεση του αμύλου στον καρπό (Kanayama and Odanaka, 2000). Η συσσώρευση του αμύλου θεωρείται ότι ελέγχεται από την πυροφωσφορυλάση της ADP-γλυκόζης, λόγω της στενής συσχέτισης της ενεργότητας του ενζύμου αυτού, της ποσότητας της ADP-γλυκόζης και της ποσότητας του αμύλου στους καρπούς της τομάτας (Yelle *et al.*, 1988) και άλλων ειδών (Okita, 1992; Preiss, 1991). Παρόλα αυτά, η σύνθεση του αμύλου δεν εξαρτάται αποκλειστικά και μόνο από τη δράση της πυροφωσφορυλάσης

της ADP-γλυκόζης γιατί αν και η παρεμπόδιση της δράσης της με μετάλλαξη ή antisense transformation στην πατάτα, τον αραβόσιτο και το *Arabidopsis* περιόρισε την συσσώρευση του αμύλου, αύξηση της δράσης της δεν οδήγησε σε αυξημένη σύνθεση αμύλου (Sweetlove *et al.*, 1996).

Ως προς την αποδόμηση του αμύλου στους καρπούς της τομάτας λίγα βιβλιογραφικά δεδομένα υπάρχουν, γεγονός που είναι μάλλον αξιοπερίεργο γιατί ιδιαίτερα μεγάλος αριθμός ερευνητικών εργασιών έχει δημοσιευτεί τα τελευταία 20 χρόνια σχετικά με το μεταβολισμό των υδατανθράκων στους καρπούς της τομάτας. Σύμφωνα με τους Yelle *et al.* (1988) και Robinson *et al.* (1988), η ενεργότητα της αμυλάσης είναι πολύ χαμηλή ενώ η φωσφορυλάση του αμύλου (starch phosphorylase), αποτελεί το κυριότερο ένζυμο που ευθύνεται για την αποδόμηση του αμύλου στους καρπούς της τομάτας. Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, οι ενεργότητες και των δύο ενζύμων μεταβάλλονται ελάχιστα κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού (Σχήμα 1.4), με συνέπεια ο ρυθμός της αποδόμησης του αμύλου να θεωρείται μάλλον σταθερός, ενώ ο ρυθμός της σύνθεσης να μεταβάλλεται στα διάφορα στάδια της ανάπτυξης και ωρίμανσης.

Σε αντίθεση με τους καρπούς της τομάτας, η αποδόμηση του αμύλου κατά την ωρίμανση έχει μελετηθεί εκτενώς στους καρπούς της μπανάνας, όπου παρατηρείται εξάντληση των αποθεμάτων αμύλου από το 25% του συνολικού νεπού βάρους στην προκλιμακτηριακή περίοδο σε λιγότερο από 1% κατά τη διάρκεια της κλιμακτηριακής περιόδου, με συνέπεια την έντονη αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης και των εξοζών (Cordenunsi and Lajolo, 1995). Τα ένζυμα που σχετίζονται με την αποδόμηση του αμύλου δρουν απευθείας στα ευθύγραμμα μόρια γλυκόζης που αποτελούν την αμυλόζη, αλλά δεν μπορούν να σπάσουν τους $\alpha(1-6)$ δεσμούς της αμυλοπηκτίνης (Tucker, 1993). Η φωσφορυλάση του αμύλου υδρολύει τον τελικό $\alpha(1-4)$ δεσμό για να δώσει 1-φωσφορογλυκόζη, οι αμυλάσες δίνουν μαλτόζη, που με τη σειρά της μετατρέπεται σε γλυκόζη με τη δράση των $\alpha-1,4-$ και $\alpha-1,6-$ γλυκοσιδασών (Garcia and Lajolo, 1988). Η γλυκόζη και η 1-φωσφορογλυκόζη μετατρέπονται εντός των αμυλοπλαστών σε 6-φωσφορογλυκόζη (G6P), από τη δράση της εξοκινάσης και της φωσφογλυκομουτάσης αντίστοιχα. Η 6-φωσφορογλυκόζη εξάγεται στο κυτταρόπλασμα και είτε συμμετέχει στη γλυκόλυση για αναπνοή, είτε μετατρέπεται ξανά σε φρουκτόζη και φωσφορογλυκόζη για τη σύνθεση σακχαρόζης.

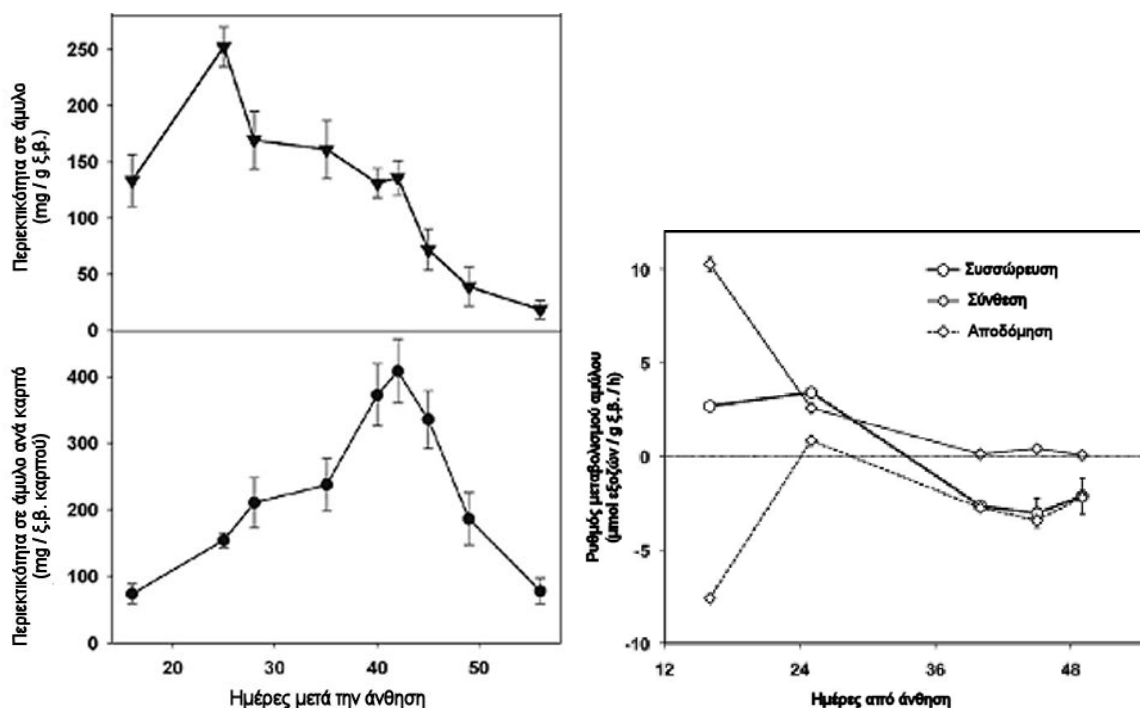


Σχήμα 1.4. Επίπεδα του αμύλου (A), της πυροφωσφορυλάσης της ADP-γλυκόζης (B), της φωσφορυλάσης του αμύλου και της αμυλάσης (C) κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των καρπών της καλλιεργούμενης τομάτας (*L. esculentum*) και του συγγενούς είδους *L. chmielewskii* (Από: Yelle *et al.*, 1988).

Φαίνεται πάντως πως ανεξάρτητα από τα αμυλολυτικά ένζυμα των οποίων η δράση δεν έχει μελετηθεί εκτενώς, οι υπόλοιπες διεργασίες εξαγωγής των προϊόντων της αποδόμησης του αμύλου στο κυτταρόπλασμα ή χρήσης τους για την σύνθεση του αμύλου εντός των αμυλοπλαστών ισχύουν και στην περίπτωση των καρπών της τομάτας. Έτσι, οι σχετικοί ρυθμοί της αποδόμησης ή σύνθεσης του αμύλου σε κάθε στάδιο ανάπτυξης φαίνεται πως εξαρτώνται από τη συγκέντρωση της 6-φωσφορογλυκόζης στον αμυλοπλάστη που ρυθμίζεται από την μεταφορά της διαμέσου της μεμβράνης του αμυλοπλάστη και σε κάποιο βαθμό, από τη δράση της SuSy στο κυτταρόπλασμα (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001).

Πρόσφατες έρευνες (Luengwilai and Beckles, 2009), έδειξαν ότι η βιοσύνθεση αλλά και η αποδόμηση του αμύλου στους αναπτυσσόμενους καρπούς της ποικιλίας “Moneymaker” συνυπάρχουν και παρουσιάζουν μέγιστο στα πολύ πρώιμα στάδια της ανάπτυξης (10-16 HMA). Αν και ο ρυθμός της αποδόμησης του αμύλου σχεδόν μηδενίζεται στις 28 HMA με το ρυθμό σύνθεσης να είναι μέγιστος οδηγώντας σε συσσώρευση αμύλου, αυξάνεται ξανά στις 40 περίπου HMA (στο φυσιολογικά ώριμο πράσινο στάδιο), χωρίς όμως να φτάσει στα επίπεδα των 10-16 HMA, παρά το γεγονός ότι

από το στάδιο αυτό και μέχρι την ολοκλήρωση της ωρίμανσης πραγματοποιείται η πλήρης αποδόμηση του αμύλου (Σχήμα 1.5). Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, η αποδόμηση του αμύλου διαφέρει ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του καρπού. Έτσι, στους νεαρούς καρπούς (10-16 ΗΜΑ) όπου παρατηρείται ενεργή αποδόμηση και ανασύνθεση του αμύλου στην ίδια περιοχή του αμυλοπλάστη που περιορίζεται με την ανάπτυξη του καρπού, οι αμυλόκοκκοι αποδομούνται από την περιφέρεια προς το κέντρο οδηγώντας στη συσσώρευση πολυάριθμων μικρών αμυλόκοκκων. Αντίθετα, μετά το ώριμο-πράσινο στάδιο παρατηρείται έντονη απώλεια αμύλου είτε από το εσωτερικό των μεγάλων αμυλόκοκκων των οποίων όμως η περιφέρεια μπορεί να αυξάνεται λόγω απόθεσης αμύλου, είτε από την πλήρη αποδόμηση μικρών αμυλόκοκκων.



Σχήμα 1.5. Περιεκτικότητα σε άμυλο ανά γρ. ξηρού βάρους και ανά καρπό, και ρυθμός σύνθεσης, αποδόμησης και συσσώρευσης του αμύλου στους καρπούς τομάτας κατά την ανάπτυξή τους (Από: Luengwilai and Beckles, 2009).

1.8. Εφαρμογή ορμονών και παρθενοκαρπία

Η τομάτα είναι κυρίως αυτογονιμοποιούμενο φυτό, αν και κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να σταυρογονιμοποιηθεί. Όταν οι συνθήκες είναι δυσμενείς για φυσική καρπόδεση (χαμηλή ή υψηλή υγρασία, χαμηλές ή υψηλές θερμοκρασίες, χαμηλή ένταση

φωτισμού και δυνατοί άνεμοι) (George *et al.*, 1984), η ανάπτυξη των καρπών μπορεί να πραγματοποιηθεί παρθενοκαρπικά με την εφαρμογή εξωγενώς ορμονών, με την επαγωγή της τεχνητής παρθενοκαρπίας (Ολύμπιος, 2001). Αν και η ύπαρξη γενετικής παρθενοκαρπίας έχει αναφερθεί σε αρκετούς γονότυπους τομάτας (π.χ. στις ποικιλίες “Severianin”, “75/59”, “Bubjekosoko”, Sub-Arctic Plenty”), δεν υπάρχουν εμπορικές ποικιλίες ή υβρίδια που να δίνουν ικανοποιητική παραγωγή παρθενοκαρπικά (Philouze, 1983).

Οι πιο συνηθισμένες μέθοδοι τεχνητής παρθενοκαρπίας που εφαρμόζονται στη γεωργία βασίζονται στην χρήση φυτορμονών (αυξίνες, γιββερελλίνες) και άλλων παρόμοιων ουσιών (Schwabe and Mills, 1981) και προέρχονται από πειράματα του Gustafson (1936), όπου με την εφαρμογή εξωγενώς αυξίνης σε άνθη τομάτας έδωσε το ερέθισμα για την παραγωγή και ανάπτυξη παρθενοκαρπικών καρπών χωρίς να προηγηθεί επικονίαση και γονιμοποίηση. Η κυριότερη φυσική αυξίνη είναι το ινδολοξικό οξύ (indole-3-acetic acid, IAA) και συνήθως παράγεται από το μόριο της τρυπτοφάνης (Pandolfini *et al.*, 2009). Όμως, πολλές συνθετικές ενώσεις - ρυθμιστές ανάπτυξης όπως τα β-NAA (naphthaleneacetic acid), 4-CPA (4-chlorophenoxyacetic acid), 2,4D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) κ.ά. χρησιμοποιούνται ως «καρποδετικές ορμόνες» για την παρθενοκαρπική παραγωγή καρπών στην τομάτα (Ολύμπιος, 2001).

Είτε στη γενετική είτε στην τεχνητή παρθενοκαρπία, η καρπόδεση επάγεται εξαιτίας της απορρύθμισης της ισορροπίας των ορμονών στην ωοθήκη του άνθους. Έτσι, στη τομάτα έχει παρατηρηθεί στενή σχέση μεταξύ της γενετικής παρθενοκαρπίας και των αυξημένων επιπέδων αυξινών και γιββερελλινών στην ωοθήκη πριν την γονιμοποίηση (Nitsch *et al.*, 1960; Mapelli *et al.*, 1979). Επιπλέον, η εφαρμογή αυξινών στο εξωτερικό της ωοθήκης πριν την γονιμοποίηση ή η παρεμπόδιση της εξόδου των αυξινών ή των γιββερελλινών από τις ωοθήκες οδηγούν σε συσσώρευσή τους στην ωοθήκη σε συγκεντρώσεις ικανές να προκαλέσουν καρπόδεση και να ενεργοποιήσουν κυτταροδιαρρέσεις υπό την έλλειψη γονιμοποίησης (Gillaspy *et al.*, 1993).

Ο καρπός είναι μια ειδική κατασκευή, ρόλος της οποίας είναι να παρέχει τα κατάλληλα περιβάλλον για την ανάπτυξη των σπόρων και κατ' επέκταση των εμβρύων κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης και μετά την ωρίμανση των εμβρύων συμβάλλει στη διασπορά τους. Αν και αποτελεί μία σπάνια περίπτωση στη φύση, η παρθενοκαρπία στην αγροτική πρακτική θεωρείται ως θετικό χαρακτηριστικό, γιατί το ύψος της παραγωγής εξαρτάται σε μικρότερο βαθμό από τις περιβαλλοντικές συνθήκες που επιδρούν αρνητικά στις διαδικασίες της επικονίασης και γονιμοποίησης, φαινόμενο πολύ συνηθισμένο στη

καλλιέργεια της τομάτας, ιδιαίτερα εκτός εποχής. Παράλληλα, η απουσία σπερμάτων από τους παρθενοκαρπικούς καρπούς είναι συχνά επιθυμητή, όπως στην περίπτωση παρθενοκαρπικών καρπών τομάτας που προορίζονται για τοματοχυμό ή καρπών μελιτζάνας, μπανάνας, σταφυλιών και εσπεριδοειδών για νωπή κατανάλωση, όπου η απουσία σπόρου θεωρείται χαρακτηριστικό ανώτερης ποιότητας (Varoquaux *et al.*, 2000; Pandolfini *et al.*, 2009).

Το ενδιαφέρον των ερευνητών για την ποιότητα των παρθενοκαρπικών καρπών σε σχέση με τους φυσιολογικά γονιμοποιούμενους καρπούς εντοπίζεται πριν από τα 1900 (Sturtevant, 1889). Ο Ewert (1910) αναφέρει ότι οι παρθενοκαρπικοί καρποί αχλαδιών εμφανίζουν χαμηλότερη οξύτητα και υψηλότερη συγκέντρωση σακχάρων σε σχέση με φυσιολογικά γονιμοποιούμενους καρπούς. Ο Condit (1920) αναφέρει ότι σε ορισμένες ποικιλίες συκιάς οι παρθενοκαρπικοί καρποί περιείχαν στη σύστασή τους υψηλότερο ξηρό βάρος και σάκχαρα σε σχέση με τους φυσιολογικά γονιμοποιούμενους (ένσπερους) καρπούς.

Οι Cano-Medrano and Darnell (1997) παρατήρησαν ότι οι παρθενοκαρπικοί καρποί του μπλούμπερι (*Vaccinium ashei*) που καρπόδεσαν με εφαρμογή γιββερελλικού οξέος (GA₃) καθυστέρησαν κατά 15 ημέρες την ανάπτυξή τους σε σχέση με τους φυσιολογικά γονιμοποιούμενους καρπούς και παρουσίασαν μικρότερο μέγεθος, λόγω μικρότερων κυττάρων, όταν στον αριθμό των κυττάρων δεν εμφανίστηκαν διαφορές. Αντίστοιχα, χαμηλότερη ήταν η συσσώρευση της ξηράς ουσίας στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, που πιθανά οφείλεται στην περιορισμένη εισροή άνθρακα, λόγω μειωμένης sink-strength σε σχέση με τους ένσπερους καρπούς. Αντίθετα, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη συγκέντρωση των εξοζών στους ώριμους καρπούς και στη δραστηριότητα των ενζύμων που μεταβολίζουν τη σακχαρόζη (SuSy, SPS, όξινη διαλυτή ιμπερτάση) στους άσπερους και ένσπερους καρπούς, υποδεικνύοντας ότι η ανάπτυξη των παρθενοκαρπικών καρπών δεν παρεμποδίζεται από τη συσσώρευση ή το μεταβολισμό της σακχαρόζης, αλλά μάλλον λόγω μείωσης του sink-strength.

Όμοια παρθενοκαρπικοί καρποί πεπονιού μέσω της εφαρμογής της τεχνητής κυτοκινίνης CPPU [Phenyl-N'-(2-chloro-4-pyridyl)urea] αν και κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξής τους (έως 15 HMA) παρουσίασαν ταχύτερη αρχική ανάπτυξη και υψηλότερη δράση της όξινης ιμπερτάσης, ακολούθως εμφάνισαν μειωμένη ανάπτυξη και δράση της ιμπερτάσης σε σχέση με καρπούς που καρπόδεσαν φυσιολογικά, υποδεικνύοντας ότι το CPPU επηρεάζει την ορμονική ισορροπία κατά την άνθηση και στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των νεαρών καρπών (Hayata *et al.*, 2000).

Η εφαρμογή ρυθμιστών ανάπτυξης για την υποβοήθηση της καρπόδεσης στην καλλιέργεια της τομάτας, ιδιαίτερα εκτός εποχής σε θερμοκήπια εφαρμόζεται ευρύτατα, και αν και εξασφαλίζει την απόδοση της καλλιέργειας όταν οι συνθήκες δεν είναι κατάλληλες για καρπόδεση, στις περισσότερες περιπτώσεις υποβαθμίζει την ποιότητα (Picken, 1984). Η υποβάθμιση της ποιότητας των άσπερων καρπών αναφέρεται στην εξωτερική τους εμφάνιση και στο σχήμα όπου παρουσιάζεται ασυμμετρία. Ο καρπός εμφανίζεται πολυγωνικός με εξόγκωμα στο αντίθετο του ποδίσκου άκρο και το χρώμα είναι συχνά φτωχό, ενώ εσωτερικά παρουσιάζει κενά (κούφιοι καρποί), λόγω της απουσίας σπερμάτων και του ζελατινώδους παρεγχύματος. Η γεύση αλλοιώνεται, μειώνεται η μηχανική αντοχή του καρπού, γίνεται πιο μαλακός (υδαρής) και μειώνεται η διατηρησιμότητά του μετά τη συγκομιδή. Τα μειονεκτήματα αυτά είναι λιγότερο ή περισσότερο έντονα, ανάλογα με τις συνθήκες που επικρατούν στο θερμοκήπιο και την εφαρμοζόμενη συγκέντρωση της καρποδετικής ορμόνης (υπερβολικές συγκεντρώσεις προκαλούν τοξικότητες και δυσμορφίες στους καρπούς), καθώς και με την ποικιλία, με τους καρπούς από μεγαλόκαρπους γονότυπους να εμφανίζουν μεγαλύτερη παραμόρφωση σε σχέση με τους μικρόκαρπους (Abad and Monteiro, 1989; Ολύμπιος, 2001).

Οι παρθενοκαρπικοί καρποί της τομάτας συνήθως υπολείπονται σε μέγεθος έναντι των ένσπερων καρπών, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ανάπτυξη των καρπών σχετίζεται με την ανάπτυξη των σπόρων/εμβρύων (Pandolfini *et al.*, 2009). Αντίστοιχα, σύμφωνα με τον Janes (1941) οι παρθενοκαρπικοί καρποί που παράγονται με την χρήση IBA (indole-3-butyric acid) εμφανίζουν μικρότερο μέγεθος σε σχέση με αυτούς από την εφαρμογή IAA, ενώ και στις δύο περιπτώσεις είναι μικρότεροι από τους καρπούς που προέρχονται από φυσιολογική γονιμοποίηση. Η επίδραση της εφαρμογής καρποδετικών ορμονών στο μέγεθος των καρπών της τομάτας, φαίνεται πως εξαρτάται από τις συνθήκες που επικρατούν κατά την ανάπτυξη της καλλιέργειας και την καρπόδεση, μέσω της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών στην παραγωγή βιώσιμης γύρης και την αποτελεσματικότητα της επικονίασης και της γονιμοποίησης.

Έτσι, οι Picken και Grimmitt (1986) εφαρμόζοντας 4-CPA και β-NOA (β-naphthoxy acetic acid) σε δύο ποικιλίες τομάτας υπό συνθήκες περιορισμένου φωτός σε χειμερινή θερμοκηπιακή καλλιέργεια, παρατήρησαν αύξηση της συνολικής παραγωγής τόσο λόγω της αύξησης του αριθμού των καρπών (βελτίωση καρπόδεσης μέσω της παραγωγής καρπών παρθενοκαρπικά) όσο και λόγω αύξησης του μεγέθους των καρπών, υποδηλώνοντας ότι η φυσιολογική γονιμοποίηση δεν προκάλεσε επαρκή παραγωγή σπερμάτων ώστε οι καρποί να αποκτήσουν ικανοποιητικό μέγεθος. Παρατηρήθηκαν όμως

διαφορές στην αποτελεσματικότητα των καρποδετικών ορμονών, με το 4-CPA να δίνει υψηλότερη παραγωγή σε σχέση με το β-NOA, αλλά να μειώνει έναντι των ένσπερμων το περιεχόμενο των άσπερμων καρπών σε σάκχαρα και οξέα, όταν το β-NOA δεν επηρέασε αρνητικά την ποιότητα των καρπών (Picken and Grimmett, 1986). Αντίθετα, οι Rotino *et al.* (2005) αναφέρουν ότι οι γενετικά τροποποιημένοι παρθενοκαρπικοί καρποί τομάτας είτε είχαν παρόμοια ποιοτικά χαρακτηριστικά με τους ένσπερμους καρπούς είτε υπερτερούσαν.

Ο Janes (1941) αναφέρει ότι σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης το ποσοστό του αμύλου είναι υψηλότερο στους παρθενοκαρπικούς (επαγόμενους από καρποδετικές ορμόνες καρπούς) σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς σε αντίθεση με την τιτλοδοτούμενη οξύτητα η οποία δεν διέφερε. Το ποσοστό των σακχάρων στο ξηρό βάρος κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης είναι όμοιο και για τα δύο είδη καρπών, ενώ κατά το ώριμο στάδιο το ποσοστό των σακχάρων στους παρθενοκαρπικούς παρουσίασε ταχύτερη αύξηση σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς, έτσι ώστε στο ώριμο-κόκκινο στάδιο τα σάκχαρα των παρθενοκαρπικών καρπών να είναι ψηλότερα από των ένσπερμων.

Άλλοι ερευνητές αναφέρουν ότι οι άσπερμοι καρποί τομάτας είναι περισσότερο γευστικοί από τους αντίστοιχους ένσπερμους καρπούς γιατί περιέχουν περισσότερη ξηρά ουσία έως και 1%, περιέχουν περισσότερα σάκχαρα, λιγότερα οξέα, λιγότερη σελλουλόζη (Lukyanenko, 1991) και έχουν περισσότερα διαλυτά στερεά (Vagoquaux *et al.*, 2000).

Οι αντιφατικές απόψεις που αφορούν στην επίδραση της χρήσης καρποδετικών ορμονών στην ποιότητα των καρπών της τομάτας πιθανά να σχετίζονται με τις ποικιλίες που μελετώνται, το είδος των ρυθμιστών ανάπτυξης και τις διάφορες πρακτικές επικονίασης που εφαρμόζονται, τη θρεπτική κατάσταση των φυτών, τις ελάχιστες θερμοκρασίες που επικρατούν κατά την άνθηση και καρπόδεση, τον χρόνο εφαρμογής και τη συγκέντρωση των καρποδετικών ορμονών (Picken, 1984; Picken και Grimmett, 1986; Abad and Monteiro, 1989).

Αντίθετα με τα όσα αναφέρονται στην περιορισμένη μετασυλλεκτική ζωή των άσπερμων καρπών έναντι των ένσπερμων, οι Vagoquaux *et al.* (2000) και οι Pandolfini *et al.* (2009) αντιτείνουν ότι η μετασυλλεκτική ζωή των άσπερμων καρπών τομάτας είναι μεγαλύτερη σε σχέση με τους άσπερμους καρπούς γιατί η παρουσία των σπόρων επάγει την παραγωγή ορμονών που προάγουν την υπερωρίμανση, γήρανση και αποδόμηση των καρπών.

1.9. Ορμονική ρύθμιση της ανάπτυξης των καρπών

Είναι γενικά αποδεκτό ότι στην κανονική ανάπτυξη των καρπών τα αναπτυσσόμενα έμβρυα ή σπέρματα ρυθμίζουν το ρυθμό και τη διατήρηση των κυττροδιαιρέσεων στους περιβάλλοντες ιστούς του καρπού (Gillaspy *et al.*, 1993). Αυτό βασίζεται στο ότι ο αριθμός των γονιμοποιημένων ωοθηκών καθορίζει το ρυθμό των κυτταροδιαιρέσεων και κατά συνέπεια τον αρχικό ρυθμό ανάπτυξης της ωοθήκης (Varga and Bruinsma, 1986). Εάν η γονιμοποίηση είναι ατελής, ώστε να μην παραχθούν σπέρματα σε ένα μέρος του καρπού, οι καρποί είναι ασύμμετροι, με τα μέρη όπου είναι κανονική και μειωμένη η ανάπτυξη του καρπού να συμπίπτουν με τις περιοχές παρουσίας και απουσίας σπερμάτων αντίστοιχα (Roberts, 1946; Nitsch *et al.*, 1960). Αντίστοιχα, υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του αριθμού των αναπτυσσόμενων σπερμάτων και της διατήρησης της ανάπτυξης του καρπού (Gustafson, 1939; Hobson and Davies, 1970), καθώς και με το τελικό βάρος του καρπού της τομάτας (Imanishi and Hiura, 1977; Maisonneuve and Philouze, 1982). Όμως, αν και η σχέση μεταξύ αριθμού σπερμάτων και βάρους καρπού είναι σημαντική εντός μιας ποικιλίας, είναι διαφορετική μεταξύ διαφορετικών ταξιανθιών της ίδιας καλλιέργειας, ή σε διάφορες συνθήκες περιβάλλοντος (Rylski, 1979). Επομένως, σε ένα βαθμό, οι γενετικές παράμετροι που καθορίζουν το τελικό μέγεθος και βάρος του καρπού μπορεί να επηρεαστούν από τον αριθμό των αναπτυσσόμενων σπερμάτων (Nitsch, 1970).

Οι αυξίνες θεωρούνται ως οι κυρίως υπεύθυνες για την διόγκωση των κυττάρων στους ιστούς του καρπού, αν και στους περισσότερους καρπούς η συγκέντρωση των αυξινών στα σπέρματα είναι υψηλότερη από τους περιβάλλοντες ιστούς. Οι αυξίνες πιθανά συμβάλλουν στην επεκτασιμότητα των κυτταρικών τοιχωμάτων και επάγουν την απορρόφηση και δέσμευση του νερού και των διαλυτών συστατικών από τα κύτταρα (Gillaspy *et al.*, 1993). Το περιεχόμενο των καρπών τομάτας σε αυξίνες παρουσιάζει δύο μέγιστα κατά την ανάπτυξη των καρπών. Η πρώτη εμφανίζεται περίπου 10 HMA και συνδέεται με την έναρξη της διεύρυνσης των κυττάρων (Iwahori, 1967). Η διόγκωση των κυττάρων μπορεί να μην οφείλεται στην επίδραση των αυξινών των σπερμάτων, αλλά στην αύξηση της sink-strength των καρπών λόγω των αναπτυσσόμενων σπερμάτων. Για παράδειγμα, η διεύρυνση των κυττάρων στους παρθενοκαρπικούς καρπούς ή σε καρπούς με μικρό αριθμό σπερμάτων ήταν μειωμένη και οι εξωγενώς εφαρμοζόμενες αυξίνες δεν ήταν ικανές να αντικαταστήσουν το ρόλο των αναπτυσσόμενων σπερμάτων στη διεύρυνση των κυττάρων και στην ανάπτυξη των καρπών *in vitro* (Asahira and Hosoki, 1977). Παράλληλα, αρκετές θεωρίες έχουν διατυπωθεί σχετικά με το ότι τα σπέρματα ελέγχουν

τη διεύρυνση και τη sink-strength των γειτονικών τους κυττάρων όχι λόγω παραγωγής αυξινών, αλλά μέσω της παραγωγής μορίων-δεικτών (signal molecules) ή μέσω ρυθμιστικών μορίων εκτός των αυξινών, τα οποία διέρχονται με διάχυση ή μέσω των πλασμοδεσμάτων στα κύτταρα του περικαρπίου, του πλακούντα και του ζελατινώδους παρεγχύματος. Το δεύτερο μέγιστο της συσσώρευσης αυξινών στους καρπούς της τομάτας παρατηρείται αργά κατά την ωρίμανσή τους, συμπίπτει με την ολοκλήρωση της ανάπτυξης του εμβρύου και οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στις αυξίνες των σπερμάτων, αφού δεν εντοπίζονται στο περικάρπιο. Δεν φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη και στο sink-strength των καρπών, αλλά σχετίζεται με την ταχεία ανάπτυξη του εμβρύου και δεν εντοπίζεται επίσης στους παρθενοκαρπικούς καρπούς (Mapelli *et al.*, 1978), επιβεβαιώνοντας την αποκλειστική παρουσία των αυξινών στα σπέρματα στο στάδιο αυτό (Gillaspy *et al.*, 1993).

Ο ρόλος των γιββερελλινών στην ανάπτυξη των καρπών δεν είναι επαρκώς γνωστός, αλλά γενικά θεωρείται ότι είναι απαραίτητες για την επαγωγή των κυτταροδιαιρέσεων και τη διατήρηση της διεύρυνσης των κυττάρων. Όμοια, δύο μέγιστα παρατηρούνται στη συσσώρευση των γιββερελλινών στους καρπούς της τομάτας, που σχετίζονται με την ενεργοποίηση των κυτταροδιαιρέσεων κατά τα αρχικά στάδια της ανάπτυξης και με την ακόλουθη διεύρυνση των κυττάρων, όταν ο ρυθμός αύξησης του καρπού είναι μέγιστος και τα επίπεδα των αυξινών έχουν μειωθεί. Φαίνεται πως η επαγόμενη από τις αυξίνες σύνθεση και συσσώρευση γιββερελλινών είναι απαραίτητη για την περαιτέρω διεύρυνση και την διατήρηση της sink-strength των κυττάρων του καρπού. Οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσιάζουν πολλαπλάσια συσσώρευση γιββερελλινών στα αρχικά στάδια ανάπτυξης σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς (Ho and Hewitt, 1986), γεγονός που σχετίζεται με την διεύρυνση των κυττάρων τους σε αυτό το αρχικό στάδιο, κάτι που δεν παρατηρείται στους ένσπερμους καρπούς. Αντίθετα, η δεύτερη αύξηση του επιπέδου των γιββερελλινών δεν είναι τόσο έντονη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς όσο τους ένσπερμους, γεγονός που μπορεί να ερμηνεύσει το μειωμένο ρυθμό ανάπτυξής τους στο στάδιο αυτό (Mapelli *et al.*, 1978).

1.10. Σκοπός της εργασίας

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η μεταβολή της τιτλοδοτούμενης οξύτητας, η συσσώρευση των κυριότερων σακχάρων που απαντούν στους καρπούς της τομάτας (γλυκόζη, φρουκτόζη και σακχαρόζη), του αμύλου, και των ολικών διαλυτών στερεών σε

τέσσερα στάδια της ανάπτυξης και της ωρίμανσης (διάμετρος 15mm, στάδιο ώριμου-πράσινου, στάδιο «σπασίματος» χρώματος και ώριμο κόκκινο στάδιο) ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών δύο υβριδίων cherry τομάτας, καθώς και μετά την αποθήκευσή τους στο στάδιο του ώριμου κόκκινου χρώματος για 10 και 20 ημέρες στους 15°C και την παραμονή τους για 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου (22°C). Σκοπός ήταν να προσδιοριστεί η επίδραση της παρουσίας ή απουσίας των σπερμάτων στο περιεχόμενο των καρπών της cherry τομάτας σε υδατάνθρακες και οξέα κατά την ωρίμανση και τη μετασυλλεκτική τους ζωή και στο μεταβολισμό των υδατανθράκων, μέσω του προσδιορισμού της δράσης της φωσφορυλάσης του αμύλου, ενός ενζύμου που συμβάλλει στην αποδόμηση του αμύλου κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών και κατά συνέπεια στο περιεχόμενο των καρπών σε άμυλο και αναγωγικά σάκχαρα στα διάφορα στάδια που μελετήθηκαν.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Καλλιέργεια φυτών cherry τομάτας και συλλογή πειραματικού υλικού

Η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου των Κηπευτικών Καλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (Γ.Π.Α) από τα τέλη Οκτώβρη του 2009 έως και τα τέλη Μάρτη του 2010.

2.1.1. Σπορά

Χρησιμοποιήθηκαν τα υβρίδια cherry τομάτας Cherelino F₁ και Conchita F₁ (De Ruiter Seeds, Bergschenhoek, Netherlands), με χαρακτηριστικό την υψηλή μετασυλλεκτική διάρκεια, ιδίως στην περίπτωση των καρπών της Conchita F₁ οι οποίοι συγκομίζονται σε «τσαμπί», σε αντίθεση με αυτούς της Cherelino F₁ που συγκομίζονται μεμονωμένοι.

Στις 19-10-2009, 40 σπόροι από το κάθε υβρίδιο τοποθετήθηκαν για προβλάστηση σε τριβλία Petri, κλεισμένα με parafilm σε θάλαμο ελεγχόμενης θερμοκρασίας (25°C).

2.1.2. Εγκατάσταση στο θερμοκήπιο

Στις 22-10-2009 οι προβλαστημένοι σπόροι φυτεύτηκαν σε ατομικά πλαστικά γλαστράκια χωρητικότητας 0,5l που περιείχαν τύρφη (Klasmann TS-1, pH:5,5 χωρίς βασική λίπανση) ως εδαφικό υπόστρωμα και μία εβδομάδα αργότερα έγινε η τελική μεταφύτευση των φυταρίων σε γλάστρες χωρητικότητας 10l, με μίγμα τύρφης-περλίτη αναλογία 1:1 κ.ό.

Τα φυτά τοποθετήθηκαν σε σειρές, σε αποστάσεις 50cm επί της γραμμής και 1m μεταξύ των γραμμών. Τα φυτά μορφώθηκαν σε διστέλεχο σύστημα και υποστυλώθηκαν με τη χρήση πλαστικού σπάγκου, προσδένοντάς τα σε μεταλλικά σύρματα παράλληλα με τις γραμμές φύτευσης. Οι καλλιεργητικές επεμβάσεις πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συνήθειες τεχνικές καλλιέργειας της τομάτας στο θερμοκήπιο. Η άρδευση και λίπανση των φυτών γινόταν παράλληλα με τη χρήση πυκνών διαλυμάτων όπου περιέχονταν τα απαραίτητα μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία που απαιτεί η καλλιέργεια. Κατά την αρχική ανάπτυξη της καλλιέργειας (έως την άνθηση) η διάλυση των πυκνών διαλυμάτων στο διάλυμα της υδρολίπανσης ήταν 1:300 και μετέπειτα αυξήθηκε στο 1:200.

Πίνακας 2.1. Σύσταση πυκνών διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την λίπανση των φυτών.

ΛΙΠΑΝΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (στα 200 l)
KNO ₃	23 kg
NH ₄ NO ₃	6,1 kg
MgSO ₄ .7H ₂ O	6,2 kg
Φωσφορικό οξύ (80%)	2 l
H ₃ BO ₄	190 g
ZnSO ₄	30 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂ .4H ₂ O	3,42 g
MnSO ₄ .H ₂ O	118,75 g
CuSO ₄ .5H ₂ O	15,2 g
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	16,6 kg
EDTA Fe	63 g

Στο θερμοκήπιο εφαρμόστηκε θέρμανση στο επίπεδο των 15°C και εξαερισμός όταν η θερμοκρασία ξεπερνούσε τους 28°C, ενώ αν και η καλλιέργεια πραγματοποιήθηκε το χειμώνα δεν παρατηρήθηκε έλλειψη φωτισμού (το θερμοκήπιο είναι υαλόφρακτο με υψηλή περατότητα σε φως), η ανάπτυξη των φυτών ήταν ικανοποιητική με επαρκή φυλλική επιφάνεια, ενώ για την αποφυγή έντονου ανταγωνισμού που μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανάπτυξη των καρπών πραγματοποιήθηκε αραίωμα καρπών από τις ταξιανθίες ώστε να μην αναπτύσσονται περισσότεροι από 5-8 καρποί ανά ταξιανθία.

2.1.3. Επεμβάσεις καρπόδεσης

Για τη διεξαγωγή του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν ένσπερμοι και άσπερμοι καρποί των υβιδίων Conchita και Chelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης. Οι ένσπερμοι καρποί προέρχονται από φυσιολογική γονιμοποίηση των ανθέων, ενώ οι παρθενοκαρπικοί καρποί προέρχονται από την τεχνητή γονιμοποίηση των ανθέων της τομάτας, με τη χρήση της ορμόνης β-NOA, υπό τη μορφή του σκευάσματος Ortomone 5 EC (5% β-NOA) (Σπύρου Α.Ε., Αθήνα).

Αρχικά για τη δημιουργία παρθενοκαρπικών καρπών πραγματοποιείται ο ευνουχισμός των ανθέων. Με τη χρήση καθαρής λαβίδας αφαιρείται με προσοχή ο κώνος των ανθέρων, λίγο πριν ανοίξει το άνθος, στάδιο που προσδιορίστηκε οπτικά από τη μεταβολή του χρώματος (πιο ανοικτό) των κλειστών σεπάλων και την ελαφρά διόγκωση του άνθους σε σχέση με τα νεότερα σε ηλικία κλειστά άνθη. Μετά τον ευνουχισμό, το θηλυκό μέρος του άνθους ψεκάζεται με την ορμόνη β-NOA σε συγκέντρωση 50ppm και

το άνθος σημαίνεται με καρτελάκι, όπου αναγράφεται η ημερομηνία εφαρμογής της ορμόνης. Τα άνθη αυτά δεν καλύφθηκαν γιατί η πιθανότητα σταυρεπικονίασης ήταν μηδαμινή. Στο εργαστήριο μετά τον τεμαχισμό των καρπών για την πραγματοποίηση των μετρήσεων, επιβεβαιώθηκε η επιτυχία της ορμόνης στη τεχνητή γονιμοποίηση των ανθέων. Οι παρθενοκαρπικοί καρποί που προκύπτουν δεν περιέχουν σπόρους, σε αντίθεση με τους καρπούς που προήλθαν από φυσιολογική γονιμοποίηση και η ύπαρξη σπόρων στο ζελατινώδες παρέγχυμα, είναι εμφανής.

2.1.4. Συλλογή και μεταχείριση του πειραματικού υλικού

Για τις ανάγκες του πειράματος, τόσο οι ένσπερμοι όσο και οι παρθενοκαρπικοί καρποί συγκομίζονταν στα ακόλουθα τέσσερα στάδια ανάπτυξης (Εικόνα 2.1):

1. Ανώριμοι πράσινοι καρποί μεγέθους 15mm.
2. Καρποί στο ώριμο πράσινο στάδιο (mature green, MG). Στο στάδιο αυτό ο καρπός της τομάτας έχει αποκτήσει το τελικό του μέγεθος, αλλά είναι εντελώς πράσινος.
3. Καρποί στο στάδιο του 'σπασίματος του χρώματος' (breaker - BR). Στο στάδιο αυτό, κιτρινωπό χρώμα κάνει την εμφάνισή του όχι πάνω από το 10% της επιφάνειας του καρπού.
4. Καρποί στο ώριμο κόκκινο στάδιο (red ripe - RR) που συμπίπτει με την εμπορική ωρίμανση.

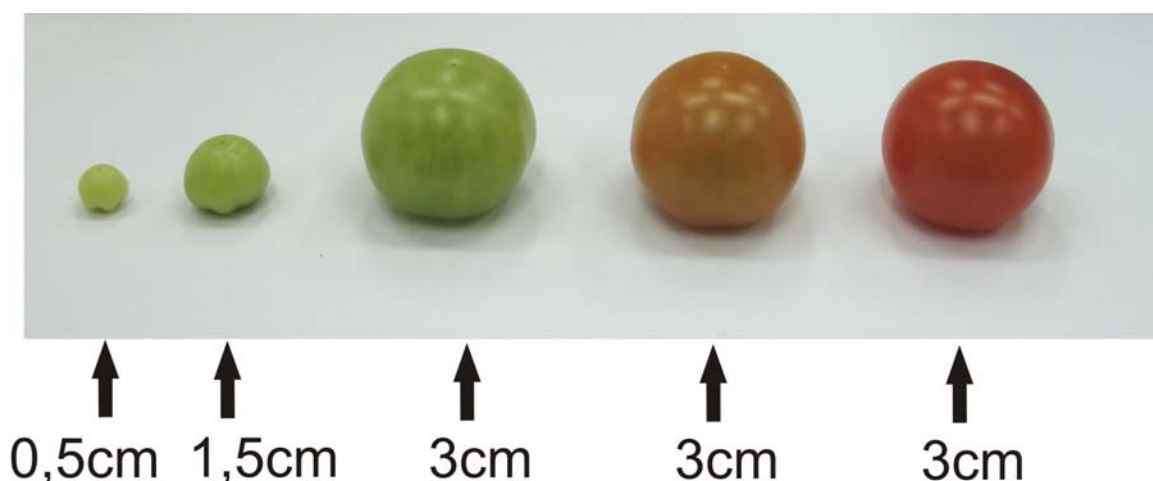
Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν ανώριμοι καρποί μεγέθους 5mm του υβριδίου Conchita για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό του πλήθους των μεταγραφημάτων της φωσφορυλάσης του αμύλου με τη χρήση PCR.

Τα στάδια 3-4 λήφθηκαν σύμφωνα με την κατάταξη των σταδίων ωρίμανσης των καρπών της τομάτας κατά USDA (USDA, 1976). Οι καρποί στο φυσιολογικά ώριμο πράσινο στάδιο συγκομίστηκαν όταν είχαν αποκτήσει το μέγιστο του μεγέθους τους και είχαν πράσινο χρώμα σε όλη την επιφάνειά τους, χωρίς σημάδια αλλαγής χρώματος. Η συγκομιδή των καρπών πραγματοποιήθηκε από τις αρχές Φεβρουαρίου έως τα τέλη του Μαρτίου του 2010.

Μετά τη συγκομιδή έγινε διαλογή στο εργαστήριο των καρπών που βρίσκονται στο επιθυμητό στάδιο ανάπτυξης ώστε να είναι ομοιόμορφοι σε μέγεθος, αφαιρέθηκε ο κάλυκας και προετοιμάστηκαν για τις μετρήσεις όπως περιγράφεται παρακάτω. Από κάθε υβρίδιο, επέμβαση καρπόδεσης (ένσπερμοι ή παρθενοκαρπικοί) και στάδιο ωρίμανσης επιλέχθηκαν πέντε τετράδες καρπών (πέντε επαναλήψεις ανά συνδυασμό επεμβάσεων). Επιπρόσθετα, πέντε τετράδες ώριμων κόκκινων καρπών από κάθε υβρίδιο και επέμβαση

καρπόδεσης τοποθετήθηκαν σε πλαστικά δοχεία όγκου 500ml, καλύφθηκαν με πλαστικό φιλμ και αποθηκεύθηκαν σε ψυκτικούς θαλάμους στους 15°C στο σκοτάδι, για 10 και 20 ημέρες, ενώ μετά την έξοδο των καρπών από τους θαλάμους απομακρύνθηκε το πλαστικό φιλμ από τις συσκευασίες και οι καρποί παρέμειναν για 3 ημέρες σε θερμοκρασία δωματίου (22°C), ώστε να προσομοιωθεί η «διατήρηση στο ράφι» των καρπών. Ως μάρτυρας θεωρούνται οι ώριμοι κόκκινοι καρποί που δεν αποθηκεύτηκαν.

Η προετοιμασία των καρπών για τις μετρήσεις πραγματοποιήθηκε ως εξής: οι καρποί αφού τεμαχίστηκαν για την επιβεβαίωση της παρουσίας ή απουσίας σπερμάτων, ψύχθηκαν ακαριαία, με τη χρήση υγρού αζώτου. Οι καρποί της κάθε τετράδας πολτοποιήθηκαν μαζί (πέντε δείγματα-επαναλήψεις ανά συνδυασμό επεμβάσεων) με οικιακό blender και αποθηκεύτηκαν στους -80°C (Kaltis Merit 499, Taipei, Taiwan) ώστε να διακοπεί οποιαδήποτε μεταβολική δραστηριότητα (Εικόνα 2.1.).



Εικόνα 2.1. Στάδια ανάπτυξης των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.

2.2. Προσδιορισμός περιεκτικότητας των καρπών σε σάκχαρα, άμυλο, διαλυτά στερεά και οξύτητα

Για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των καρπών σε σάκχαρα, άμυλο, διαλυτά στερεά και οξύτητα χρησιμοποιήθηκαν οι πολτοποιημένοι καρποί που αποθηκεύτηκαν στους -80°C.

2.2.1. Προσδιορισμός ολικών διαλυτών στερεών

Από κάθε δείγμα, λαμβάνεται ποσότητα περίπου 20g και αποψύχεται σε υδατόλουτρο στους 20°C. Με τη χρήση σπάτουλας, λαμβάνεται και μεταφέρεται μία σταγόνα χυμού στην ειδική υποδοχή ενός διαθλασίμετρου χειρός (Schmidt & Haensch HR32B), ώστε να προσδιοριστεί η συγκέντρωση των ολικών διαλυτών στερεών στο χυμό. Η ένδειξη του διαθλασίμετρου καταγράφεται με ακρίβεια 0,2 Brix. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται δύο φορές για κάθε δείγμα, ώστε να προκύπτουν δύο τιμές και να υπολογιστεί ο μέσος όρος τους. Οι μετρήσεις των ολικών διαλυτών στερεών πραγματοποιήθηκαν σε σταθερή θερμοκρασία (θερμοκρασία δωματίου 22°C), ώστε να μην επηρεάζονται από αυτή.

2.2.2. Προσδιορισμός τιτλοδοτούμενης οξύτητας

Ο προσδιορισμός της οξύτητας πραγματοποιείται με τιτλοδότηση. Από τον πολτό που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των ολικών διαλυτών στερεών λαμβάνονται 10g και μεταφέρονται σε ογκομετρικό κύλινδρο, όπου και προστίθεται απεσταγμένο νερό έως 200ml. Ακολουθεί καλή ανάδευση και διήθηση με τη χρήση πτυχωτού ηθμού (Macherey-Nagel MN 617we, Düren, Germany). Από το διήθημα, λαμβάνονται 2 δείγματα των 50ml και μεταφέρονται σε ευρύλαιμες κωνικές φιάλες. Διάλυμα NaOH (N/50) χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση της εξουδετέρωσης με τιτλοδότηση, το τέλος της οποίας προσδιορίστηκε με την αύξηση του pH του διηθήματος στο 8,1, με τη χρήση pHμετρου (Radiometer PHM250 pHmeter, Lyon, France). Τα αποτελέσματα εκφράστηκαν σε γραμμάρια κιτρικού οξέος ανά 100 g νωπού βάρους καρπού, σύμφωνα με την σχέση: $g \text{ κιτρικού οξέος} / 100 \text{ g καρπού} = \text{ml NaOH} \times 0,0512$.

2.2.3. Προσδιορισμός σακχάρων με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Ο προσδιορισμός των σακχάρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) σύμφωνα με τη μέθοδο των Piccaglia and Galletti (1988):

α. Εκχύλιση των σακχάρων:

Από τα δείγματα που διατηρήθηκαν στους -80°C λαμβάνεται ποσότητα 500mg (νωπού ιστού) και τοποθετείται σε σωλήνες φυγοκέντρωσης 15ml. Προστίθενται 5ml πετρελαϊκού αιθέρα (petroleum ether) για απομάκρυνση λιπών και χρωστικών, ακολουθεί

ανάδευση (vortex), αφήνονται σε ηρεμία για 10-20 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση (5300 x g, 15 min, 10°C) σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Sigma 4-16, Osterode am Harz, Germany). Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και προστίθενται 2ml αιθυλικής αλκοόλης (80%) στο στερεό υπόλειμμα ώστε να γίνει η πρώτη εκχύλιση των σακχάρων. Μετά από καλή ανάδευση (vortex), οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 65°C. Μετά την πάροδο 25 min ακολουθεί φυγοκέντρηση κάτω από τις προηγούμενες συνθήκες και το υπερκείμενο υγρό (αλκοόλη) μεταφέρεται σε νέους σωλήνες. Στους σωλήνες που περιέχουν το στερεό υπόλειμμα προστίθενται εκ νέου 2ml αιθυλικής αλκοόλης και επαναλαμβάνεται για 2^η φορά η εκχύλιση των σακχάρων όπως περιγράφηκε προηγουμένως. Όμοια, το υπερκείμενο υγρό (αλκοόλη) μετά τη φυγοκέντρηση προστίθεται στους σωλήνες που περιέχουν την αλκοόλη που προέκυψε από την πρώτη εκχύλιση. Οι σωλήνες με το εκχύλισμα μεταφέρονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 65°C όπου με διαβίβαση βιομηχανικού αζώτου πραγματοποιείται εξάτμιση της αλκοόλης. Το στερεό υπόλειμμα που απομένει στους σωλήνες μετά την εξάτμιση της αλκοόλης περιέχει τα προς προσδιορισμό σάκχαρα. Σε κάθε σωλήνα προστίθενται 3ml H₂O καθαρότητας HPLC και 12mg ενεργού άνθρακα (charcoal), ακολουθεί καλή ανάδευση (vortex) και φυγοκέντρηση (5300 x g για 10 min). Το υπερκείμενο υγρό φιλτράρεται με φίλτρο σύριγγας (Macherey-Nagel Chromafil PET 20/15 MS - Ø: 15mm - pore size: 0,20µm) και το διάλυμα τοποθετείται σε erpendorf σωλήνες χωρητικότητας 2ml, όπου και παρέμενε σε ψυγείο (4±1°C) έως τη μέτρηση στο HPLC για περίπου 15 ώρες.

β. προσδιορισμός των σακχάρων σε HPLC:

Η ανάλυση των σακχάρων πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας με τα εξής χαρακτηριστικά: Αντλία Varian 9010 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), στήλη Supelco Supelcosil LC-NH₂ (5µm, 25cm x 4,6mm) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), ανιχνευτή δείκτη διάθλασης (refractive index-RI) Erma ERC-7511 (Erma Inc., Tokyo, Japan), σύστημα συλλογής δεδομένων Shimadzu Prominence CBM-20A (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Η κινητή φάση αποτελείται από 80% ακετονιτρίλιο και 20% H₂O καθαρότητας HPLC (Fisher Scientific, Hampton, New Hampshire, USA). Η αντλία λειτουργούσε ισοκρατικά με ροή 1ml/min, η θερμοκρασία της στήλης διατηρήθηκε στους 30°C και 20µl δείγματος εισέρχονται στο σύστημα μέσω του εισαγωγέα (Rheodyne single mode manual injector). Η συλλογή και η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε σε H/Y με το πρόγραμμα Shimadzu LC solution (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των σακχάρων

έγινε με βάση το χρόνο έκλυσης (retention time-RT) και το ύψος της κορυφής του χρωματογραφήματος χωριστά για κάθε σάκχαρο, με βάση πρότυπα διαλύματα γνωστών συγκεντρώσεων σακχάρων (φρουκτόζης, γλυκόζης και σακχαρόζης). Ως όριο ανίχνευσης υπό τις προαναφερθείσες συνθήκες ανάλυσης προσδιορίστηκαν τα 50mg/l για τα κυριότερα σάκχαρα που προσδιορίστηκαν στα δείγματα (φρουκτόζη, γλυκόζη, σακχαρόζη). Με βάση τις τιμές των συγκεντρώσεων των σακχάρων στα δείγματα, υπολογίστηκε το περιεχόμενο των καρπών της τομάτας σε σάκχαρα ως % αναλογία του νωπού τους βάρους.

2.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός αμύλου

Ο προσδιορισμός της περιεχόμενου των καρπών σε άμυλο πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη μέθοδο των Dekker and Richards (1971) και Barham and Trinder (1972), ως εξής:

Στο στερεό υπόλειμμα που παρέμεινε στους σωλήνες φυγοκέντρησης μετά την εκχύλιση των διαλυτών σακχάρων πραγματοποιείται έκπλυση ώστε να απομακρυνθούν πλήρως τα διαλυτά σάκχαρα που έχουν πιθανά απομείνει. Προστίθενται 3ml (80%) αλκοόλης, ακολουθεί καλή ανάδευση (vortex), οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο στους 65°C για 20 min και φυγοκεντρώνται (5300 x g, 15 min, 10°C) σε ψυχόμενη φυγόκεντρο (Sigma 4-16, Osterode am Harz, Germany). Το υπερκείμενο υγρό απορρίπτεται και η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για 2 φορές ακόμη και ακολουθεί και μια τρίτη, με 5ml αιθυλικής αλκοόλης.

Στο στερεό υπόλειμμα προστίθενται 8ml διαλύματος NaOH (0,5N), ακολουθεί καλή ανάδευση (vortex) και αφήνονται σε ηρεμία σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min ώστε να ζελατινοποιηθεί το άμυλο. Για την εξουδετέρωση του NaOH προστίθενται 4,4ml CH₃COOH (2M) και ακολουθεί φυγοκέντρηση (5300 x g, 15 min, 10°C).

Από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε νέους σωλήνες 1ml και προστίθεται 1ml διαλύματος αμυλογλυκοζιδάσης (A7420 Sigma, from *Aspergillus niger*, 30-60 units/mg protein): 1,0-1,5mg ενζύμου διαλύονται σε 10ml buffer οξικού νατρίου, pH 4,5 (100ml buffer παρασκευάζονται από ανάμιξη 43ml 0,2M οξικού νατρίου και 57ml 0,2M οξικού οξέος). Το εκχύλισμα με το ένζυμο επωάζονται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 55°C για μία ώρα για τη μερική διάσπαση του αμύλου σε γλυκόζη και τελικά προστίθενται 0,4ml NaOH (1N) για την εξουδετέρωση του ενζύμου και το σταμάτημα της αντίδρασης.

0,5 ml από το διάλυμα (που περιέχει γλυκόζη), τοποθετείται σε νέους σωλήνες και προστίθενται 2ml αντιδραστηρίου GOD-POD (glucose oxidase/peroxidase) της εταιρίας Biosis (Βιοτεχνολογικές Εφαρμογές Ε.Π.Ε., Αθήνα). Μετά από καλή ανάμειξη (vortex), οι σωλήνες τοποθετούνται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 37°C για 15 min. Η απορρόφηση του παραγόμενου ερυθρού χρώματος μετρείται στα 510nm σε φασματοφωτόμετρο (Perkin-Elmer Lambda 1A, Waltham, Massachusetts, USA). Οι τιμές απορρόφησης που προκύπτουν συγκρίνονται με τις τιμές της καμπύλης αναφοράς που παρασκευάζεται παράλληλα με τα υπό μέτρηση δείγματα, με τη χρήση προτύπων διαλυμάτων αμύλου σε συγκεντρώσεις (0, 25, 50, 100, 150, 250, 500, 750 και 1000 mg^l⁻¹).

2.3. Στατιστική επεξεργασία

Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το μονοπαραγοντικό εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο, με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση της παρουσίας του σπόρου στους καρπούς (ένσπερμοι – παρθενοκαρπικοί), η επίδραση του σταδίου συγκομιδής στο περιεχόμενο τους σε σάκχαρα, άμυλο, ολικά διαλυτά στερεά και τιτλοδοτούμενη οξύτητα κατά τη πορεία της ωρίμανσης και κατά τη αποθήκευσή τους. Οι διαφορές των μέσων εκτιμήθηκαν είτε με πολλαπλές συγκρίσεις σύμφωνα με το κριτήριο της ελάχιστης σημαντικής διαφοράς (ΕΣΔ), είτε με το *t*-test (για τη σύγκριση των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών), σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Οι στατιστικές δοκιμασίες πραγματοποιήθηκαν χωριστά στα δύο υβρίδια. Ο αριθμός των επαναλήψεων σε κάθε επέμβαση είναι n=5.

Παράλληλα, εκτιμήθηκε η ύπαρξη συσχέτισης (κατά Pearson) μεταξύ των ολικών διαλυτών στερεών και των ολικών σακχάρων σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης, και μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C. Προσδιορίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης *r*, και με βάση το κριτήριο Student’s T-test εκτιμήθηκε η σημαντικότητά του.

Για όλες τις στατιστικές δοκιμασίες χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα StatGraphics 5.1.

2.4. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και του πλήθους των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου στην τομάτα

Οι εργασίες για τον προσδιορισμό της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και του πλήθους των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου στη τομάτα πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών του Γ.Π.Α.

2.4.1 Απομόνωση και καθαρισμός ολικού RNA από φυτικούς ιστούς

Για την απομόνωση του ολικού RNA από τους καρπούς της τομάτας ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται από την εταιρία Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) για την απομόνωση φυτικού RNA (RNeasy Plant Mini Kit).

Η αρχική ποσότητα του φυτικού ιστού που θα χρησιμοποιηθεί είναι σημαντικό να μην ξεπερνά τα 200mg καθώς είναι καθοριστική για τη βέλτιστη παραγωγή RNA υψηλής καθαρότητας. Αυτό συμβαίνει γιατί η RNeasy spin στήλη είναι πεπερασμένης χωρητικότητας, αλλά και γιατί το ρυθμιστικό διάλυμα RLT που χρησιμοποιείται για την παραλαβή του RNA έχει επίσης πεπερασμένη λυτική χωρητικότητα.

Οι καρποί που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση του RNA είναι είτε νωποί είτε κατεψυγμένοι στους -80°C . Στην τελευταία περίπτωση, είναι απαραίτητη η άμεση ψύξη τους, με τη χρήση υγρού αζώτου πριν από την αποθήκευση. Είναι σημαντικό να μην αποψυχτούν οι καρποί πριν από την έναρξη της διαδικασίας της απομόνωσης του RNA, ενώ όλη η διαδικασία εκτελείται άμεσα και σε θερμοκρασία δωματίου.

Στο RNeasy Plant Mini Kit δίνεται η δυνατότητα επιλογής μεταξύ δύο λυτικών αντιδραστηρίων: το ρυθμιστικό διάλυμα RLT και το ρυθμιστικό διάλυμα RLC που περιέχουν θειοκυανιδική γουανιδίνη και υδροχλωρικής γουανιδίνης αντίστοιχα. Η ύπαρξη της θειοκυανιδικής γουανιδίνης στη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος RLT, προσδίδει επιθυμητές ιδιότητες μετουσίωσης, αλλά και δίνει τη δυνατότητα καλύτερης διάρρηξης των κυττάρων, γεγονός που καθιστά το ρυθμιστικό αυτό διάλυμα προτιμότερο στη χρήση. Στις περιπτώσεις όμως, όπου το είδος και το ποσοστό των δευτερογενών μεταβολιτών (γαλακτώδες ενδοσπέρμιο αραβόσιτου) δεν επιτρέπουν τη χρήση της θειοκυανιδικής γουανιδίνης (συμπαγής δομή δείγματος που καθιστά αδύνατη την εξαγωγή του RNA), χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα RLC. Για την τομάτα χρησιμοποιείται το RLT.

Κατά την αποθήκευση του ρυθμιστικού διαλύματος RLT είναι πιθανό να δημιουργηθεί ίζημα, όπου με θέρμανση και μετά διατήρηση σε θερμοκρασία δωματίου

επαναδιαλυτοποιείται. Οι φυγοκεντρήσεις που πραγματοποιούνται γίνονται σε θερμοκρασίες μεταξύ 20-25°C και ποτέ κάτω από 20 °C σε μικροφυγόκεντρο.

Η β-μερκαπτοαιθανόλη (β-ME) προστίθεται πριν την χρήση στο ρυθμιστικό διάλυμα RLT ή RLC (100 μl β-ME/1ml ρυθμιστικού διαλύματος RLT ή RLC). Το αντιδραστήριο Buffer RPE παρέχεται σε συμπυκνωμένη μορφή. Πριν την πρώτη χρήση του προστίθενται 4 όγκοι αιθανόλης (96- 100%) για να προκύψει το τελικό διάλυμα που θα χρησιμοποιηθεί.

2.4.2. Διαδικασία

Οι καρποί του φυτού της τομάτας αμέσως μετά τη συγκομιδή τους ψύχονται με υγρό άζωτο, ώστε το RNA να προστατεύεται. Ακολουθεί λειοτριβήση των καρπών με μπλέντερ και γουδί και η σκόνη που προκύπτει αποθηκεύεται σε αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης χωρητικότητας 2ml. Οι σωλήνες μικροφυγοκέντρωσης μπορούν είτε να χρησιμοποιηθούν άμεσα για την απομόνωση του RNA από τους λειοτριβιμένους ιστούς, είτε να αποθηκευτούν στους -80°C.

Αρχικά, ζυγίζονται 200mg λειοτριβιμένου ιστού και προστίθενται 450μl ρυθμιστικού διαλύματος RLT. Ακολουθεί έντονη ανακίνηση (vortex) και επώαση στους 65°C για 1-3min για την καλύτερη διάρρηξη των κυτταρικών τοιχωμάτων των ιστών.

Οι λειοτριβιμένοι ιστοί μεταφέρονται με πιπέτα με κομμένη άκρη στην πρώτη στήλη QIAshredder spin, η οποία είναι τοποθετημένη σε ένα σωλήνα συλλογής των 2ml, ακολουθεί φυγοκέντρωση (8000 x g).

Η φυγοκέντρωση μέσω της QIAshredder στήλης αφαιρεί τα κυτταρικά υπολείμματα και ομογενοποιεί το προϊόν της λύσης των κυττάρων. Παραλαμβάνεται με προσοχή το υπερκείμενο διάλυμα της στήλης και μεταφέρεται σε ένα νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρωσης. Τα υπολείμματα που παραμένουν στο σωλήνα συλλογής δεν χρησιμοποιούνται περαιτέρω.

Στο προϊόν της λύσης των κυττάρων που είναι απαλλαγμένο από τα κυτταρικά υπολείμματα προστίθεται 0,5 όγκος αιθανόλης (96-100%) και μεταφέρεται, μαζί με το ίζημα που σχηματίζεται, στην RNeasy spin στήλη που είναι τοποθετημένη σε σωλήνα συλλογής των 2ml. Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 15sec με ταχύτητα μεγαλύτερη από 8000 x g (10000rpm) και τέλος αφαιρείται το διήθημα. Προστίθενται στη στήλη 700μl ρυθμιστικού διαλύματος RW1 και επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρωση κάτω από τις ίδιες συνθήκες, ώστε να ξεπληθεί η μεμβράνη της στήλης.

Προσθέτουμε 500μl από το ρυθμιστικό διάλυμα RPE στην στήλη RNeasy spin και ακολουθεί φυγοκέντρηση (για 15sec, >8000 x g) για να ξεπλυθεί η μεμβράνη της στήλης. Το βήμα επαναλαμβάνεται με τη φυγοκέντρηση να διαρκεί 2min, ώστε να εξατμιστούν και τα τελευταία υπολείμματα αιθανόλης που μπορεί να υπάρχουν στη μεμβράνη της στήλης.

Η στήλη RNeasy spin τοποθετείται σε νέο σωλήνα συλλογής χωρητικότητας 1,5ml και προστίθεται 30-50μl νερό που δεν έχει RNάση. Ακολουθεί φυγοκέντρηση (1min, >8000 x g) ώστε να εξαχθεί το RNA.

2.4.3. Υδρόλυση DNA των δειγμάτων

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

Για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται 2μl DNάσης, 2μl 1X Ρυθμιστικού διαλύματος DNάσης, ακολουθεί ανακίνηση (vortex) των δειγμάτων και προσθήκη 0,5 μl RNase out (παρεμποδιστής της RNάσης). Σε 15,5 μl του δείγματος με RNA προστίθεται μητρικό διάλυμα (10X Ρυθμιστικού Διαλύματος αντίδρασης που παρέχεται με αυτό το ένζυμο περιέχει 400mM Tris-HCl (pH 8,0), 100mM MgSO₄ και 10mM CaCl₂) μέχρι τελικό όγκο 20μl. Στη συνέχεια, τοποθετούνται τα δείγματα στους 37°C για 45 min και τέλος προστίθεται 1 μl DNASE Stop Solution, 180 μl dd H₂O αποστειρωμένο, 200μl φαινόλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 min.

Από τις δύο ευδιάκριτες φάσεις που προκύπτουν απομακρίνεται η υπερκείμενη φάση που περιέχει το RNA και τοποθετείται σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης. Προστίθενται 100 μl φαινόλη και 100 μl χλωροφόρμιο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 min. Από το προϊόν που προκύπτει, η υπερκείμενη φάση μεταφέρεται σε νέο αποστειρωμένο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης. Προστίθεται 200μl χλωροφόρμιο και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές για 5 min, ενώ η υπερκείμενη φάση όπως και πριν μεταφέρεται σε νέο σωλήνα μικροφυγοκέντρησης, όπου προστίθενται 500μl αιθανόλη, 10μl όξινο ανθρακικό νάτριο CHCOONa (3M, pH=5,2). Το δείγμα αφήνεται για 12h στους -20°C. Ακολουθεί φυγοκέντρηση 13000 στροφές στους 4°C για 20 min. Το RNA παραμένει ως ίζημα.

Στη συνέχεια, προστίθενται 200μl 70% αιθανόλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 13000 στροφές στους 4°C, για 20min. Το υπερκείμενο απορρίπτεται. Ακολουθεί

φυγοκέντρωση στα 15000g, για 0,5sec. Το δείγμα αφήνεται μέσα σε πάγο με ανοικτό το καπάκι του σωλήνα για 5min ώστε να εξατμιστεί η αιθανόλη. Η επαναδιαλυτοποίηση γίνεται με 20μl dd αποστειρωμένο H₂O

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

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

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

Προετοιμασία 50X Tank ρυθμιστικού διαλύματος (2M Tris-Οξικό, 50mM EDTA, pH στο 7,0).

Προετοιμασία 30ml πηκτής (30ml 1X Tank ρυθμιστικό διάλυμα, 300mg αγαρόζη, τοποθέτηση στον φούρνο μικροκυμάτων για 1 min, προσθήκη 0,75 μl βρωμιούχο αιθίδιο).

Προετοιμασία 10X ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης του δείγματος (50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 60% γλυκερόλη, 0,25% κυανούν της βρωμοφαινόλης, 1μl βρωμιούχο αιθίδιο).

Προετοιμασία διαλύματος αποδιάταξης RNA (600μl φορμαμίδιο, 2400μl dd H₂O, 100μl ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης του δείγματος).

Προετοιμασία μίγματος ηλεκτροφόρησης (5 μl δείγματος RNA, 15 μl διαλύματος αποδιάταξης RNA, θέρμανση για 5 λεπτά στους 65°C, ψύξη σε πάγο για 5 λεπτά).

Τοποθετείται η πηκτή, αφού έχει κρυώσει και όσο είναι ακόμα σε υγρή μορφή, στην συσκευή της ηλεκτροφόρησης, τοποθετείται το χτένι στην πηκτή και αφαιρείται αφού έχει πήξει το gel. Στη συνέχεια φορτώνεται το μίγμα ηλεκτροφόρησης στην πηκτή και εφαρμόζεται τάση 70V για 20min.

2.4.5. Παρασκευή cDNA

Για την παρασκευή cDNA από τα τμήματα mRNA που εξάχθηκαν από τους καρπούς της τομάτας, χρησιμοποιείται το AffinityScript Multi Temperature cDNA Synthesis Kit της εταιρείας Stratagene (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Σε σωλήνα PCR χωρητικότητας 200μl τοποθετούνται 10 μl δείγματος καθαρού RNA, 5,7 μl dd H₂O, 1 μl εκκινητή ολιγο- (dT), στη συνέχεια επωάζεται το μίγμα σε θερμοκρασία 65°C για 5 min. Μόλις το δείγμα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 2 μl 10X ρυθμιστικού διαλύματος AffinityScript RT, 0,8 μl μίγμα dNTPs, 0,5 μl παρεμποδιστή RNάσης και 1 μl αντίστροφης μεταγραφάσης. Τα δείγματα επωάζονται σε θερμοκρασία

42°C για 60min και η αντίδραση τερματίζεται σε θερμοκρασία 70°C για 15min. Το παραγόμενο cDNA φυλάσσεται σε θερμοκρασία -20°C, ενώ η ποσοτικοποίηση γίνεται με RT-PCR.

2.5. Προσδιορισμός του πλήθους των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου

2.5.1. Ενίσχυση ακολουθιών DNA με τη χρήση της τεχνικής PCR

Για τον πολλαπλασιασμό ενός επιλεγμένου τμήματος DNA χρησιμοποιείται ένα ζεύγος εκκινητών (primers), οι οποίοι έχουν συμπληρωματική αλληλουχία με τα άκρα του DNA-στόχου

Ο κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Αποδιάταξη του DNA στόχου (θέρμανση 94-95°C)
2. Σύνδεση των εκκινητών στα άκρα του DNA-στόχου
3. Επέκταση των συμπληρωματικών αλυσίδων, με τη βοήθεια του ενζύμου Taq-πολυμεράση.

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

Οι ακριβείς συνθήκες πραγματοποίησης μιας τυπικής αντίδρασης PCR προσαρμόστηκαν στις απαιτήσεις του συγκεκριμένου πειράματος. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξεως των εκκινητών (T_m). Η τυπική αντίδραση PCR πραγματοποιείται ως εξής:

Σε ειδικό σωλήνα eppendorf (500 ή 100 μ l) προστίθενται τα συστατικά:

- Μήτρα cDNA 1 μ l
- Ορθόδρομος εκκινητής 1,6 μ l (0,016nmole) (5'-ACCATTTGAACCCCGATTTGC-3')
- Οπισθόδρομος εκκινητής 1,6 μ l (0,016nmole) (5'-CCTCCTGGCCATCTTTTGTA-3').

- Μίγμα dNTPs (10mM το καθένα) 1μl
- 10X ρυθμιστικό διάλυμα PCR 5μl
- Taq DNA πολυμεράση (1u/μl) 1μl
- dH₂O 40μl

Η αντίδραση PCR αρχικά προγραμματίζεται για τα πρώτα 60sec σε θερμοκρασία 96°C. Στα τελευταία 15sec πραγματοποιείται η αποδιάταξη του DNA και σηματοδοτείται η έναρξη του πρώτου κύκλου. Στη συνέχεια η θερμοκρασία μειώνεται στους 53°C για 60sec. στο σημείο αυτό οι εκκινητές υβριδίζονται. Κατά το τέλος του πρώτου κύκλου, η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C για 30sec για την επιμήκυνση του DNA. Συνολικά πραγματοποιούνται 25- 35 κύκλοι.

2.5.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (Real Time-PCR)

Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στη Stratagene MX 3005P Real Time PCR χρησιμοποιώντας αντιδραστήρια της Kapa Biosystems (Kapa Biosystems Inc., Woburn, MA, USA). Κάθε σωλήνας περιείχε 2μl cDNA, ποσοτικοποιημένο και αραιωμένο (περίπου 100ng), ενώ προστίθενται και τα αντιδραστήρια με τις αναλογίες που προτείνονται από την εταιρία Kapa Biosystems. Κάθε σωλήνας περιείχε 6,1μl H₂O RNase free, 1μl ανοδικού (F primer) και καθοδικού εκκινητή (R primer) που προέρχονται από πυκνά διαλύματα (stock) των 10μM για τον κάθε εκκινητή 10μl Kapa RYBR qPCR Master Mix (2X), 0,4μl χρωστική (KSF Rox Low), 1,5μl cDNA που προέρχεται από πυκνό διάλυμα (stock) των 100ng/μl. Κάθε σωλήνας είχε τελικό όγκο 20μl.

Αρχικά, η θερμοκρασία αυξάνεται έως τους 95°C, όπου διατηρείται για 3min. Η αποδιάταξη του DNA λαμβάνει χώρα στους 95°C για 3sec. Στους 60°C για 30sec πραγματοποιείται ο υβριδισμός του κάθε μονόκλωνου DNA τμήματος με τους εκκινητές και λαμβάνει χώρα η επέκταση για 11sec στους 72°C. Οι παραπάνω διαδικασίες επαναλαμβάνονται 45 φορές. Τα βήματα που ακολουθούν πραγματοποιούνται για την απομάκρυνση μη εξειδικευμένων διμερών που έχουν πιθανά σχηματίσει οι εκκινητές. Η θερμοκρασία επανέρχεται στους 95°C για 1min, μειώνεται στους 55°C για 30sec, αυξάνεται ξανά στους 95°C για 30sec. Η αντίδραση ολοκληρώνεται στους 25°C για 3min. Τόσο για την ημιποσοτική όσο και για την πραγματικού χρόνου αντίδραση της πολυμεράσης, ως ένζυμο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε η Ουμπικοϊτίνη, ενώ οι εκκινητές είναι όμοιοι και για τις δύο αντιδράσεις. Η σχετική έκφραση του γονιδίου υπολογίστηκε από τον τύπο:

$$\frac{\text{Έκφρ.ΓονιδίουX}}{\text{Έκφρ.Umbi}} = \frac{\text{eff}_{\text{reacUmbi}}^{\text{CiUmbi}}}{\text{eff}_{\text{reacΓονίδιοX}}^{\text{CiΓονίδιοX}}}$$

όπου: *eff*: η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης που υπολογίζεται από τα αποτελέσματα της αντίδρασης μέσω του προγράμματος LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003). Στα αποτελέσματα της ποσοτικής PCR δεν πραγματοποιήθηκε στατιστική επεξεργασία λόγω έλλειψης επαναλήψεων.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Μεταβολές σακχάρων, αμύλου, ολικών διαλυτών στερεών και τιτλοδοτούμενης οξύτητας των καρπών τομάτας κατά την ωρίμανση

3.1.1. Περιεκτικότητα των καρπών σε φρουκτόζη σε διάφορα στάδια ωρίμανσης

Στον Πίνακα 3.1. παρουσιάζεται το περιεχόμενο σε φρουκτόζη, όπως αυτό μεταβάλλεται κατά την πορεία της ωρίμανσης, σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino.

Πίνακας 3.1. Περιεκτικότητα σε φρουκτόζη (% νωπού βάρους) σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς cherry τομάτας των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.

	15mm	MG	BR	RR
<u>Conchita</u>				
Ένσπερμοι	1,24±0,09 b (d)	1,61±0,19 a (c)	2,14±0,09 b (b)	2,40±0,17 a (a)
Παρθενοκαρπικοί	1,44±0,07 a (b)	1,49±0,04 a (b)	2,52±0,14 a (a)	2,53±0,12 a (a)
<u>Cherelino</u>				
Ένσπερμοι	1,31±0,07 a (d)	1,50±0,05 b (c)	2,22±0,12 b (b)	2,36±0,09 b (a)
Παρθενοκαρπικοί	1,30±0,09 a (c)	1,74±0,08 a (b)	2,61±0,25 a (a)	2,60±0,10 a (a)

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το T-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Το περιεχόμενο σε φρουκτόζη αν και στους ένσπερμους καρπούς του υβριδίου Conchita αυξάνεται σημαντικά σε κάθε στάδιο της ωρίμανσης που μελετήθηκε, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς της ίδιας ποικιλίας, παραμένει σταθερό στα στάδια των 15mm και του ώριμου πράσινου, αυξάνεται σημαντικά στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος και παραμένει σταθερό μέχρι το ώριμο κόκκινο στάδιο. Στα περισσότερα στάδια της ωρίμανσης, με εξαίρεση το ώριμο πράσινο στάδιο, το περιεχόμενο σε φρουκτόζη των

παρθενοκαρπικών καρπών είναι υψηλότερο σε σχέση με των ένσπερμων, αλλά μόνο στα στάδια των 15mm και του «σπασίματος» του χρώματος στατιστικά σημαντικό.

Αντίστοιχα, η περιεκτικότητα της φρουκτόζης στους ένσπερμους καρπούς του υβριδίου Cherelino παρουσιάζει σημαντική αύξηση κατά τα διάφορα στάδια ανάπτυξης. Οι παρθενοκαρπικοί καρποί του ίδιου υβριδίου παρουσιάζουν σημαντική αύξηση στο ποσοστό της φρουκτόζης μέχρι και το στάδιο το «σπασίματος» του χρώματος, όπου και σταθεροποιείται έως και το ώριμο κόκκινο στάδιο και σε όλα τα στάδια πλην των 15mm, εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά φρουκτόζης σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς .

3.1.2. Περιεκτικότητα των καρπών σε γλυκόζη σε διάφορα στάδια ωρίμανσης

Στον Πίνακα 3.2. παρουσιάζεται το περιεχόμενο σε γλυκόζη, κατά τα διάφορα στάδια ωρίμανσης, ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών cherry τομάτας των υβριδίων Conchita και Cherelino.

Πίνακας 3.2. Περιεκτικότητα σε γλυκόζη (% νωπού βάρους) σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς cherry τομάτας των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.

	15mm	MG	BR	RR
<u>Conchita</u>				
Ένσπερμοι	1,32±0,07 b (b)	1,44±0,23 a (b)	2,14±0,10 b (a)	2,36±0,14 a (a)
Παρθενοκαρπικοί	1,52±0,03 a (b)	1,48±0,07 a (b)	2,38±0,13 a (a)	2,47±0,06 a (a)
<u>Cherelino</u>				
Ένσπερμοι	1,47±0,06 a (b)	1,54±0,06 b (b)	2,21±0,09 b (a)	2,35±0,32 a (a)
Παρθενοκαρπικοί	1,42±0,10 a (c)	1,67±0,08 a (b)	2,55±0,24 a (a)	2,57±0,13 a (a)

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το T-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Το ποσοστό της γλυκόζης τόσο στους ένσπερμους των δύο υβριδίων όσο στους ένσπερμους Cherelino, παρουσιάζει σημαντική αύξηση κατά το στάδιο του «σπασίματος»

του χρώματος σε σχέση με τα προηγούμενα στάδια ανάπτυξης και παραμένει σταθερό έως και το ώριμο κόκκινο στάδιο. Οι παρθενοκαρπικοί καρποί του υβριδίου Cherelino αν και εμφανίζουν αυξανόμενη τάση καθ' όλη τη διάρκεια της ανάπτυξης, στο στάδιο των RR δε διαφέρει στατιστικά σημαντικό επίπεδο από το στάδιο BR.

Οι παρθενοκαρπικοί καρποί του υβριδίου Cherelino στα στάδια MG και BR, παρουσιάζουν υψηλότερα ποσοστά γλυκόζης σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς, όπως και στο υβρίδιο Conchita στα στάδια των 15mm και BR.

3.1.3. Περιεκτικότητα των καρπών σε σακχαρόζη σε διάφορα στάδια ωρίμανσης

Στον Πίνακα 3.3. παρουσιάζεται το ποσοστό της σακχαρόζης όπως αυτό μεταβάλλεται κατά την πορεία της ωρίμανσης, σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino.

Πίνακας 3.3. Περιεκτικότητα σε σακχαρόζη (% νωπού βάρους) σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.

	15mm	MG	BR	RR
<u>Conchita</u>				
Ένσπερμοι	0,104±0,028 a (a)	0,051±0,019 a (b)	0,037±0,008 a (b)	nd
Παρθενοκαρπικοί	0,075±0,016 a (a)	0,053±0,016 a (ab)	0,036±0,007 a (b)	nd
<u>Cherelino</u>				
Ένσπερμοι	0,092±0,005 a (a)	0,070±0,031 a (ab)	0,049±0,002 a (b)	nd
Παρθενοκαρπικοί	0,076±0,019 a (a)	0,070±0,023 a (a)	0,050±0,015 a (a)	nd

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το T-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

nd: συγκέντρωση σακχάρου κάτω από το όριο ανίχνευσης (συγκέντρωση σακχαρόζης στο δείγμα προς ανάλυση στο HPLC = 50 mg/l)

Το ποσοστό της σακχαρόζης κυμαίνεται σε χαμηλές συγκεντρώσεις κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και πρακτικά μηδενίζεται στο ώριμο κόκκινο στάδιο, στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς και των δύο υβριδίων, ενώ μεταξύ των

ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών δεν παρατηρούνται σημαντικές διαφορές ως προς την περιεκτικότητά τους στο συγκεκριμένο σάκχαρο.

Στους ένσπερμους καρπούς του υβριδίου Conchita η συγκέντρωση της σακχαρόζης μειώνεται από το στάδιο των 15mm στο ώριμο πράσινο στάδιο, το οποίο διαφέρει από το στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος, ενώ δεν ανιχνεύεται κατά το ώριμο κόκκινο στάδιο. Το ποσοστό της σακχαρόζης στους παρθενοκαρπικούς καρπούς του ίδιου υβριδίου, μειώνεται σταδιακά κατά την ωρίμανση.

Στους ένσπερμους καρπούς του υβριδίου Cherelino η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη εμφανίζει φθίνουσα πορεία καθώς προχωρά η ωρίμανση και μηδενίζεται με την ολοκλήρωση της ωρίμανσης. Αντίθετα, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς του ίδιου υβριδίου, η συγκέντρωση της σακχαρόζης παραμένει σε σταθερά χαμηλά επίπεδα έως το στάδιο της πλήρους ωρίμανσης, όπου δεν ανιχνεύεται.

3.1.4. Περιεκτικότητα των καρπών σε άμυλο σε διάφορα στάδια ωρίμανσης

Στον Πίνακα 34. παρουσιάζεται το ποσοστό του αμύλου, όπως αυτό μεταβάλλεται κατά την πορεία της ωρίμανσης, σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino.

Το ποσοστό του αμύλου στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς του υβριδίου Conchita μειώνεται σημαντικά κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, αν και στο ώριμο πράσινο στάδιο και στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος δεν εμφανίζονται στατιστικά σημαντικές διαφορές. Διαφορές ως προς την περιεκτικότητα του αμύλου μεταξύ των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών του ίδιου υβριδίου, παρατηρούνται στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος, όπου οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένη συγκέντρωση αμύλου σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς, ενώ το αντίθετο συμβαίνει στο ώριμο κόκκινο στάδιο.

Στην Εικόνα 3.1 παρουσιάζεται η σταδιακή μείωση του περιεχομένου των καρπών σε άμυλο, όπως εμφανίζεται μετά τη χρώση του αμύλου με ιώδιο σε εγκάρσιες τομές των καρπών. Σημαντική συσσώρευση αμύλου σχεδόν σε όλο τον καρπό εμφανίζεται κατά το στάδιο των 15mm, ενώ καθώς προχωρά η ωρίμανση το άμυλο αποδομείται προοδευτικά από το περικάρπιο προς τον πλακούντα.

Πίνακας 3.4. Περιεκτικότητα σε άμυλο (% νωπού βάρους) σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.

	15mm	MG	BR	RR
<u>Conchita</u>				
Ένσπερμοι	1,332±0,155 a (a)	0,674±0,022 a (b)	0,589±0,042 b (b)	0,012±0,004 a (c)
Παρθενοκαρπικοί	1,304±0,061 a (a)	0,707±0,050 a (b)	0,688±0,063 a (b)	0,005±0,002 b (c)
<u>Cherelino</u>				
Ένσπερμοι	1,374±0,303 a (a)	0,758±0,061 b (b)	0,318±0,040 a (c)	0,048±0,009 a (d)
Παρθενοκαρπικοί	1,499±0,263 a (a)	1,325±0,091 a (a)	0,159±0,029 b (b)	0,011±0,002 b (c)

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το T-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.



Εικόνα 3.1. Μεταβολή στη συσσώρευση του αμύλου σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης καρπών cherry τομάτας όπως φαίνεται μετά από χρώση με ιώδιο σε εγκάρσιες τομές.

Οι ένσπερμοι καρποί του υβριδίου Cherelino εμφανίζουν σταδιακή μείωση στην περιεκτικότητα τους σε άμυλο κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης, ενώ οι παρθενοκαρπικοί καρποί διατηρούν σταθερή την περιεκτικότητα τους σε άμυλο στα δύο πρώτα στάδια ανάπτυξης και στη συνέχεια ακολουθεί σημαντική μείωση μέχρι και το ώριμο κόκκινο στάδιο. Μεταξύ των ένσπερων και παρθενοκαρπικών καρπών του ίδιου υβριδίου, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο στάδιο του ώριμου πράσινου, όπου οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσιάζουν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά αμύλου, σε σχέση με τους ένσπερους και στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος και του ώριμου κόκκινου σταδίου, όπου οι ένσπερμοι καρποί εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερα ποσοστά αμύλου έναντι των παρθενοκαρπικών.

Αν και οι ώριμοι κόκκινοι καρποί περιέχουν ίχνη αμύλου, όμως φαίνεται πως οι ένσπερμοι καρποί και στα δύο υβρίδια διατηρούν περισσότερο άμυλο σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς.

3.1.5. Ολικά διαλυτά στερεά καρπών σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης

Στον Πίνακα 3.5. παρουσιάζεται το ποσοστό σε ολικά διαλυτά στερεά ($^{\circ}$ Brix) στους ένσπερους και άσπερους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino στα διάφορα στάδια ωρίμανσης.

Πίνακας 3.5. Ολικά διαλυτά στερεά ($^{\circ}$ Brix) σε ένσπερους και άσπερους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.

	15mm	MG	BR	RR
<u>Conchita</u>				
Ένσπερμοι	5,13±0,12 a (d)	6,20±0,16 a (c)	6,80±0,28 a (b)	7,75±0,19 b (a)
Παρθενοκαρπικοί	5,30±0,12 a (d)	5,93±0,12 a (c)	7,05±0,10 a (b)	8,13±0,12 a (a)
<u>Cherelino</u>				
Ένσπερμοι	5,16±0,17 b (d)	5,48±0,30 b (c)	6,12±0,30 b (b)	8,10±0,26 b (a)
Παρθενοκαρπικοί	5,48±0,23 a (d)	5,88±0,18 a (c)	6,76±0,17 a (b)	8,80±0,23 a (a)

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το T-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Η περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά αυξάνεται σημαντικά καθώς προχωρά η ωρίμανση στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς των υβριδίων Conchita και Cherelino.

Διαφορές στην περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών του υβριδίου Conchita παρατηρούνται στο ώριμο κόκκινο στάδιο κατά το οποίο οι παρθενοκαρπικοί καρποί εμφανίζουν σημαντικά αυξημένα ποσοστά σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς.

Το ποσοστό των ολικών διαλυτών στερεών των παρθενοκαρπικών καρπών του υβριδίου Cherelino, είναι σημαντικά αυξημένο σε σχέση με το ποσοστό των ένσπερμων καρπών καθ' όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης.

3.1.6. Τιτλοδοτούμενη οξύτητα καρπών σε διάφορα στάδια της ωρίμανσης

Στον Πίνακα 3.6. περιγράφεται η τιτλοδοτούμενη οξύτητα εκφρασμένη σε ποσοστά κιτρικού οξέος στους ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.

Πίνακας 3.6. Τιτλοδοτούμενη οξύτητα (% κιτρικό οξύ) σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.

	15mm	MG	BR	RR
<u>Conchita</u>				
Ένσπερμοι	0,338±0,016 b (c)	0,677±0,052 a (b)	0,930±0,060 a (a)	0,630±0,014 a (b)
Παρθενοκαρπικοί	0,414±0,043 a (d)	0,635±0,071 a (b)	0,873±0,057 a (a)	0,548±0,023 b (c)
<u>Cherelino</u>				
Ένσπερμοι	0,325±0,004 b (c)	0,620±0,033 a (b)	0,827±0,084 a (a)	0,605±0,024 a (b)
Παρθενοκαρπικοί	0,396±0,021 a (d)	0,641±0,017 a (b)	0,795±0,086 a (a)	0,545±0,045 b (c)

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το *T-test* σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Κατά την πορεία της ωρίμανσης, τα υβρίδια Conchita και Cherelino εμφανίζουν το ίδιο μοτίβο μεταβολής τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, δηλαδή σημαντική αύξηση στην τιτλοδοτούμενη οξύτητα μέχρι και το στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος και στη συνέχεια μειώνεται στο ώριμο κόκκινο στάδιο.

Διαφορές στην τιτλοδοτούμενη οξύτητα, μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών παρατηρούνται στο στάδιο των 15mm και στο ώριμο κόκκινο στάδιο, όμοια και για τα δύο υβρίδια. Κατά τα αρχικά στάδια ανάπτυξης οι παρθενοκαρπικοί καρποί εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές σε σχέση με τους άσπερμους καρπούς, ενώ το αντίθετο παρατηρείται στο ώριμο κόκκινο στάδιο όπου οι άσπερμοι καρποί εμφανίζουν χαμηλότερη οξύτητα σε σχέση με τους ένσπερμους.

3.2. Μεταβολές σακχάρων, αμύλου, ολικών διαλυτών στερεών και τιτλοδοτούμενης οξύτητας των καρπών τομάτας κατά την αποθήκευση

3.2.1. Περιεκτικότητα των καρπών σε φρουκτόζη κατά την αποθήκευση

Στον Πίνακα 3.7. παρουσιάζεται η περιεκτικότητα των ένσπερμων και άσπερμων καρπών τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino, σε φρουκτόζη μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C.

Η περιεκτικότητα σε φρουκτόζη των ένσπερμων καρπών και των δύο υβριδίων παρουσίασε σημαντική αύξηση με την πρόοδο της αποθήκευσης. Παρατηρείται ότι η περιεκτικότητα σε φρουκτόζη των παρθενοκαρπικών καρπών του υβριδίου Conchita δεν αλλάζει κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, ενώ στους παρθενοκαρπικούς καρπούς του υβριδίου Cherelino δε μεταβάλλεται σημαντικά έως και τις 10 ημέρες αποθήκευσης, ενώ 20 ημέρες μετά την αποθήκευση παρουσιάζει σημαντική αύξηση.

Πίνακας 3.7. Περιεκτικότητα σε φρουκτόζη (% νωπού βάρους) σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C.

	RR	10 ημ.	20 ημ.
<u>Conchita</u>			
Ένσπερμοι	2,40±0,17 a (b)	2,67±0,13 a (ab)	2,82±0,25 a (a)
Παρθενοκαρπικοί	2,53±0,12 a (a)	2,78±0,19 a (a)	2,83±0,20 a (a)
<u>Cherelino</u>			
Ένσπερμοι	2,36±0,09 b (b)	2,49±0,09 b (b)	3,19±0,32 a (a)
Παρθενοκαρπικοί	2,60±0,10 a (b)	2,78±0,14 a (b)	3,26±0,02 a (a)

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το T-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Οι παρθενοκαρπικοί και ένσπερμοι καρποί του υβριδίου Conchita δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές όσον αφορά την περιεκτικότητά τους σε φρουκτόζη, ενώ οι παρθενοκαρπικοί καρποί του υβριδίου Cherelino εμφανίζουν σημαντικά υψηλότερες τιμές φρουκτόζης σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς έως και τις 10 ημέρες αποθήκευσης.

3.2.2. Περιεκτικότητα των καρπών σε γλυκόζη κατά την αποθήκευση

Στον Πίνακα 3.8. περιγράφεται το ποσοστό της γλυκόζης, όπως αυτό μεταβάλλεται κατά την πορεία της αποθήκευσης για 10 και 20 ημέρες, σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς τομάτας τύπου “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino.

Η περιεκτικότητα σε γλυκόζη δε μεταβάλλεται σημαντικά και στα δύο υβρίδια κατά την πρόοδο της αποθήκευσης, ενώ δε φαίνεται να επιδρά η ύπαρξη του σπόρου στον καρπό στην περιεκτικότητα στο συγκεκριμένο σάκχαρο.

Πίνακας 3.8. Περιεκτικότητα σε γλυκόζη (% νωπού βάρους) σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C.

	RR	10 ημ.	20 ημ.
<u>Conchita</u>			
Ένσπερμοι	2,36±0,14 a (a)	2,38±0,10 a (a)	2,40±0,20 a (a)
Παρθενοκαρπικοί	2,47±0,06 a (a)	2,44±0,08 a (a)	2,43±0,14 a (a)
<u>Cherelino</u>			
Ένσπερμοι	2,35±0,32 a (a)	2,44±0,22 a (a)	2,57±0,25 a (a)
Παρθενοκαρπικοί	2,57±0,13 a (a)	2,59±0,02 a (a)	2,64±0,16 a (a)

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το T-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

3.2.3. Περιεκτικότητα των καρπών σε σακχαρόζη κατά την αποθήκευση

Η συγκέντρωση της σακχαρόζης στους καρπούς του ώριμου κόκκινου σταδίου και μετά την αποθήκευση των καρπών αυτών για 10 και 20 ημέρες στους 15°C βρισκόταν κάτω από το όριο ανίχνευσης της HPLC.

3.2.4. Ολικά διαλυτά στερεά των καρπών κατά την αποθήκευση

Στον Πίνακα 3.9. παρουσιάζεται η περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά των ένσπερμων και άσπερμων καρπών τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino, μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C.

Κατά την πορεία της αποθήκευσης η περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά τόσο των ένσπερμων, όσο και των άσπερμων καρπών των δύο υβριδίων, παρουσίασε στατιστικά σημαντική αύξηση, εμφανίζοντας μέγιστες τιμές την 20^η ημέρα αποθήκευσης.

Πίνακας 3.9. Ολικά διαλυτά στερεά (^oBrix) σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C.

	RR	10 ημ.	20 ημ.
<u>Conchita</u>			
Ένσπερμοι	7,75±0,19 b (c)	8,12±0,23 b (b)	8,55±0,19 b (a)
Παρθενοκαρπικοί	8,13±0,12 a (c)	8,64±0,17 a (b)	8,94±0,13 a (a)
<u>Cherelino</u>			
Ένσπερμοι	8,10±0,26 b (b)	8,68±0,41 a (ab)	8,88±0,62 a (a)
Παρθενοκαρπικοί	8,80±0,23 a (b)	8,98±0,10 a (ab)	9,14±0,21 a (a)

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το T-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Οι παρθενοκαρπικοί καρποί του υβριδίου Conchita παρουσιάζουν υψηλότερη περιεκτικότητα σε ολικά διαλυτά στερεά καθ’ όλη τη διάρκεια την αποθήκευσης, σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς. Αντίθετα δεν παρατηρούνται στατιστικά σημαντικές διαφορές στην περιεκτικότητα των ένσπερμων και άσπερμων καρπών του υβριδίου Cherelino κατά την πορεία της αποθήκευσης.

3.2.5. Τιτλοδοτούμενη οξύτητα καρπών κατά την αποθήκευση

Στον Πίνακα 3.10. περιγράφεται η τιτλοδοτούμενη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ποσοστό κιτρικού οξέος, σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C.

Η οξύτητα των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών του υβριδίου Conchita μειώνεται σημαντικά από το ώριμο κόκκινο στάδιο κατά την αποθήκευση, χωρίς όμως να παρουσιάζει μεταβολές κατά καθώς αυξάνονται οι ημέρες της αποθήκευσης. Ακόμη, παρατηρείται ότι η οξύτητα των ένσπερμων καρπών είναι σημαντικά υψηλότερη σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς καρπούς.

Πίνακας 3.10. Τιτλοδοτούμενη οξύτητα (% κιτρικό οξύ) σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C.

	RR	10 ημ.	20 ημ.
<u>Conchita</u>			
Ένσπερμοι	0,630±0,014 a (a)	0,593±0,020 a (b)	0,594±0,032 a (b)
Παρθενοκαρπικοί	0,548±0,023 b (a)	0,503±0,014 b (b)	0,482±0,017 b (b)
<u>Cherelino</u>			
Ένσπερμοι	0,605±0,024 a (a)	0,580±0,015 a (ab)	0,569±0,017 a (b)
Παρθενοκαρπικοί	0,545±0,045 b (a)	0,524±0,019 b (a)	0,518±0,045 a (a)

* **Κάθετη σύγκριση:** μέσοι σε στήλες για κάθε γονότυπο που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εκτός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το T-test σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

** **Οριζόντια σύγκριση:** μέσοι σε γραμμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα εντός παρένθεσης δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο της ΕΣΔ σε επίπεδο σημαντικότητας 5%.

Η πορεία της οξύτητας στους ένσπερμους καρπούς του υβριδίου Cherelino μειώνεται καθώς προχωρά η αποθήκευση, ενώ στους παρθενοκαρπικούς καρπούς η δεν επηρεάζεται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης. Οι ένσπερμοι καρποί παρουσιάζουν υψηλότερη οξύτητα σε σχέση με τους παρθενοκαρπικούς καρπούς κατά την αποθήκευση για 10 ημέρες αλλά όχι στις 20 ημέρες.

3.2.6. Συσχέτιση μεταξύ των ολικών διαλυτών στερεών και των ολικών σακχάρων

Στον Πίνακα 3.11. περιγράφονται οι συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των ολικών διαλυτών στερεών και των ολικών σακχάρων σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης, και μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C.

Παρατηρείται ότι η συσχέτιση των ολικών διαλυτών στερεών και των ολικών σακχάρων και στους δύο γονότυπους και στα δύο είδη των καρπών (ένσπερμοι και άσπερμοι) είναι πάντα πολύ στενή και στατιστικά σημαντική, ιδιαίτερα στην περίπτωση του υβριδίου Conchita.

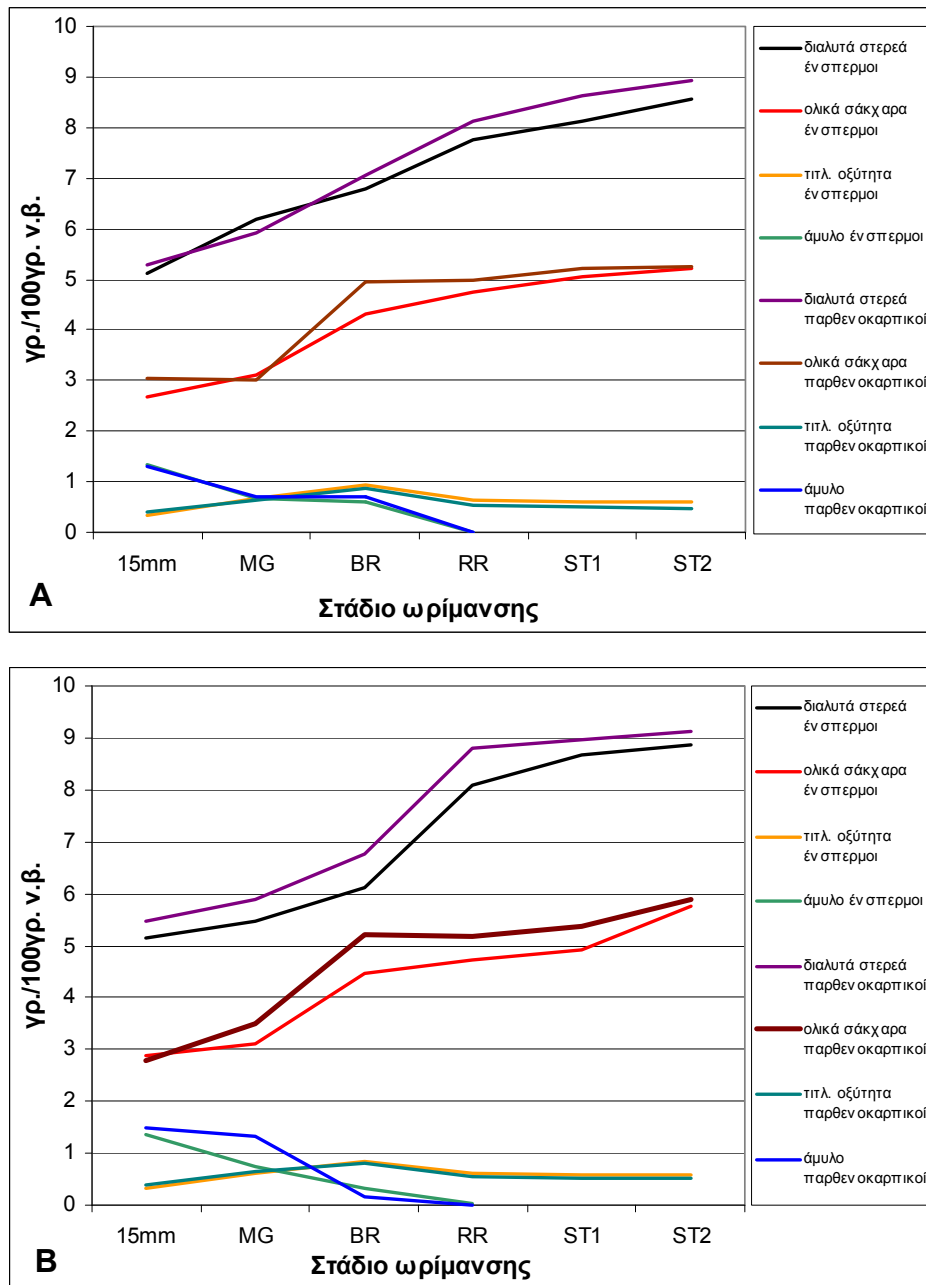
Πίνακας 3.11. Συντελεστές συσχέτισης μεταξύ των ολικών διαλυτών στερεών και των ολικών σακχάρων σε ένσπερμους και άσπερμους καρπούς τομάτας “cherry” των υβριδίων Conchita και Cherelino σε διάφορα στάδια ωρίμανσης, και μετά από αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C.

Είδος καρπού	Συντελεστής συσχέτισης (r)
Conchita ένσπερμοι	0,974*
Conchita παρθενοκαρπικοί	0,961*
Cherelino ένσπερμοι	0,916*
Cherelino παρθενοκαρπικοί	0,891*

* σημαντικός συντελεστής συσχέτισης σε επίπεδο σημαντικότητας 5%

3.2.7. Σχηματική απεικόνιση των μεταβολών των υδατανθράκων και οξέων κατά την ανάπτυξη, ωρίμανση και αποθήκευση των καρπών

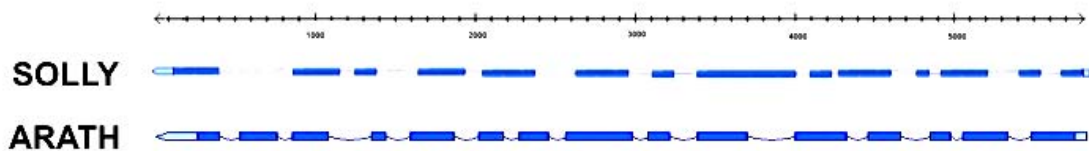
Στο Σχήμα 3.1 παρουσιάζεται σχηματικά η μεταβολή των ολικών διαλυτών στερεών, των ολικών σακχάρων, της τιτλοδοτούμενης οξύτητας και του περιεχομένου σε άμυλο, κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση, όπως περιγράφηκε στα προηγούμενα κεφάλαια των αποτελεσμάτων.



Σχήμα 3.1. Μεταβολή των ολικών διαλυτών στερεών, των ολικών σακχάρων, της τιτλοδοτούμενης οξύτητας και του περιεχομένου σε άμυλο, κατά την ωρίμανση και την αποθήκευση για 10 και 20 ημέρες στους 15°C σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς cherry τομάτας των υβριδίων Conchita (A) και Cherelino (B).

3.3. Προσδιορισμός νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου στην τομάτα

Η έρευνα με τον αλγόριθμο BLAST (Altschul *et al.*, 1997) του NCBI (National Center for Biotechnology Information) στις διεθνείς γονιδιακές βάσεις δεδομένων έδειξε την πιθανή παρουσία ESTs (Expressed Sequence Tags) τα οποία κωδικοποιούν πιθανώς τη φωσφορυλάση του αμύλου. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία (TC195918) χρησιμοποιήθηκε για τον εντοπισμό γονιδίων φωσφορυλασών του αμύλου της τομάτας στη βάση δεδομένων SOL genomics. Εντοπίστηκε με αυτόν τον τρόπο μία περιοχή στο χρωμόσωμα 5 που περιείχε την πλήρη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου. Ακολούθως με τη σύγκριση της αλληλουχίας αυτής με την αλληλουχία του γονιδίου της πατάτας (X73684) απαλοίφθηκαν οι περιοχές των ιντρονίων και κατέστη δυνατόν να διευκρινιστεί όλο το ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου. Η πλήρης νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου αποτελείται από 5918 νουκλεοτίδια (Εικόνα 3.2) και περιέχει 14 εξόνια. Επίσης, έρευνα στη βάση δεδομένων TAIR για τη δομή του At3g29320 του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου του *Arabidopsis thaliana*, έδειξε ότι σε αυτό το φυτικό είδος το γονίδιο αποτελείται από 15 εξόνια (Εικόνα 3.3) σε αντίθεση με το γονίδιο της τομάτας που περιέχει 14 εξόνια.



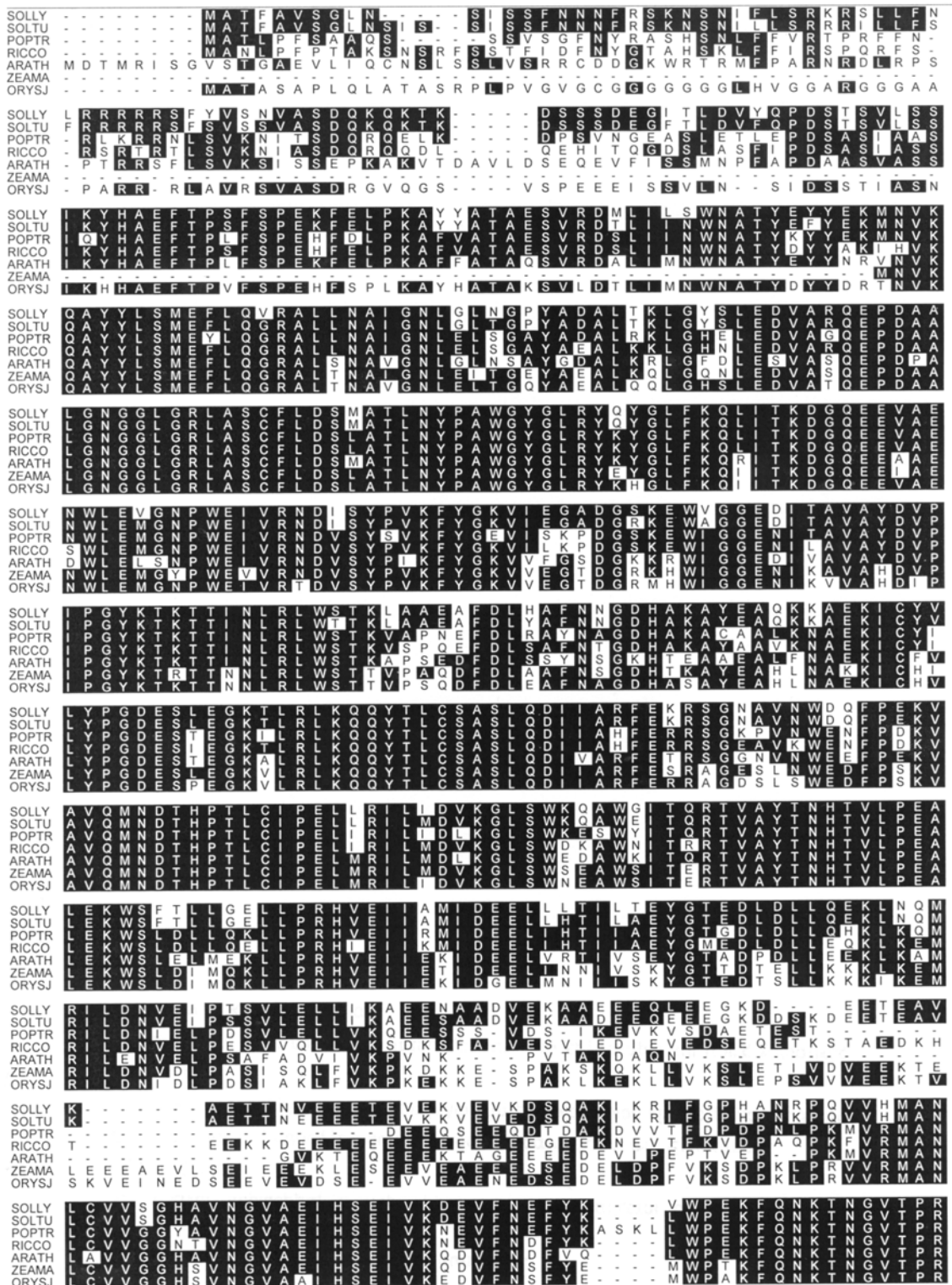
Εικόνα 3.2. Η δομή του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου της τομάτας (SOLLY) και του *Arabidopsis thaliana* (ARATH).

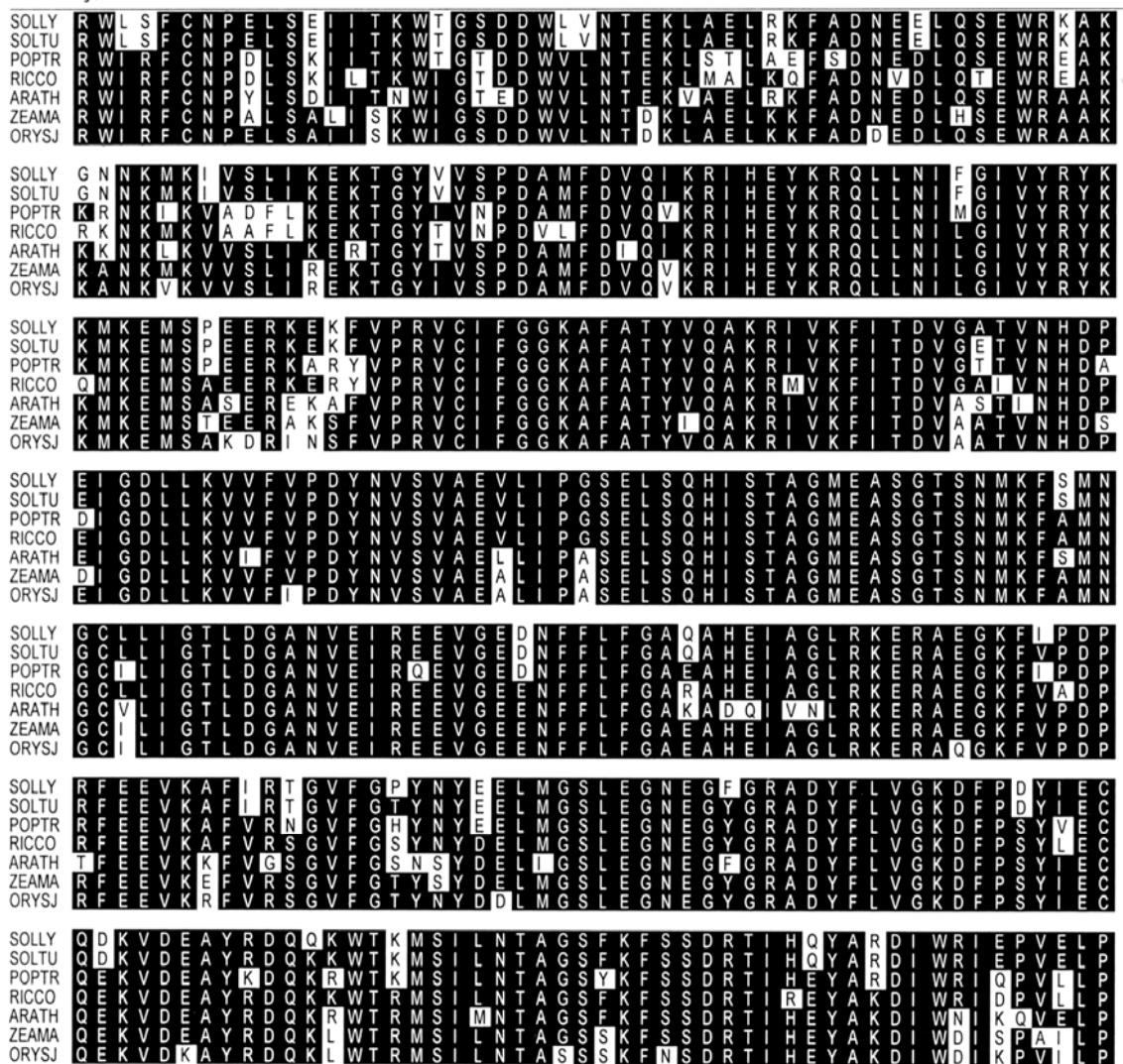
10 20 30 40 50 60 70 80
 ATGGCACTTTGCTGCTCTGGATTGAAGTCAATTTCAAGTTTAAATAACAATTTCAAGCAAAACTCAAAATATTT 80
 TTTGAGTAGAAGAGGAGTTTATTTGTTCAATTTAAGAAGAAGAAGAAGTTTCTATGTTAGCAATGTTGCTAGTGATC 160
 AAAAGCAGAAGACAAAAGATTTCTCTCTGGATGAAGTATTGAAATAATTGTCGGTTTAAATTTCTTTGCTGATTTTAA 240
 TTGACACTAAGTTTAAACAAAATACAGACTTGTATGATATGAAATGATATGTTGAATGACTTTAGTGTTATTTAATCT 320
 TGTGGTGTAAACGCTCTCGCTGGAAAGTAAAAAATTAAGAGTTGTTGAAAAAGGGCGGCACATATTTTGA AAAA 400
 410 420 430 440 450 460 470 480
 GACTAGAANTGGAAGTAAAGATAAACAAAATGAAATGTTTCGCGTGTGTTAGATCTCAATTTGGTTAAGGAAACAGGTTG 480
 TTTCTATAAGGTATTAGCAATGCTCACCTCGTTAATTAGCTTTTGAGATTGACTTAGGCTCTAGGCTATTGATTTATT 560
 TAACATGGTGTGAGAAAGACAACGATAACATACCCAGTGAATCCCCTAGCGGGTCTGAGGAGGGATGTTGTGACTT 640
 AGACCTAAGTCTATCTTGTGAATGTAGATAGATCGTTTTTGGTGAATCCTCGGCTCAAGACACATTTCTATTTGTAGTT 720
 TAACTAGTATTGATACCTTATGTTAATGTCTACGCTCAAGATCTTACGCTGGACATGCCAGGTTAAGAGTCGCGC 800
 810 820 830 840 850 860 870 880
 ATTGGTAGAGAGATAGGTTGTTGTTGTTAGAGAGTAGAATTTGAAAATTTTCGATATAGTAGAGTTATCACTCCAT 880
 ACGACTATTATTTGGACCTTTGTTAATTTGGAGTACAGCAAGTCCAATTTGGACTTATTAATGTTGTTTGTATATTTTC 960
 AGGATTTACCTTAGATGTTTATCGCCGGCTCAACGCTCTGTTTTATCAAGTATAAAGATATCCGCAAGGTTACGCGCAT 1040
 CATTTTCTCCTGAGAAAGTTTGAAGTCTCCCAAGGCTACTATGCAACTGACAGAGAGTGTCTGAGATATGCTCATTTAAGT 1120
 TGAATGCCACATATGAATACAGAAAAGTAAAGTAAAGCAGGCATATTACTGTCTAGGAGTTTCTTCAGGTTAG 1200
 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280
 ATTAGCTAGGCTTCCCTTTTATTTTCGAGTATAACTACAGAGGTCGTCGTTGAAGTGAAGTGTCTTAAATGCTTTTGGT 1280
 GCTTGCAGGGAAGAGCTTACTCAATGCTATTGGTAACTTGGGCTAAACGGACCTTATGAGATGCTTTAACTAAGCTC 1360
 GGATACAGTTTAGAGGATGTAGCCAGGCAAGTCCGATTTCTGTAAGAAGTACTTATTTCTGTTGACGGTTAGCCACTCA 1440
 AAGTAGTTTTTTGTTGTTGAGTCTGTTGTTTTCAGTACAGCCCTATTTGACTATTACTAACACTTTGAAGCGCACA 1520
 GCTCCTGTTCTATATTGCAACAAGTCTTGATTGATATGCTTTTCAAAAATGATTTAATAACATGCAACGCTAGTCAAA 1600
 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 TATCCCGTTCTCATCATCACTGTTCTAACATTTGTGATATATCAATTTGATTTCAAGCGGGATAGTCTGCTACTGTAAT 1680
 AGCTTAAAGCTGTTTACTGTAATGACTGACGAGAAACAGATGCAGCTTTAGGAAATGGAGCTTAGGAAGACTTGCTTCTT 1760
 GCTTCTTACTCAATGGCAGCCTAACTACCTGCATGGGTTATGGACTTAGATACCAATATGGCTTTTCAAACAG 1840
 CTTATTACAAAAGATGGCCAGGAGGAAGTTGCTGAAAAGTGGCTCGAGGTAACGATATGTTGGAGGACCTTGATACTACTG 1920
 ACTGCACGTTTTTTGCTATTTTCAATAGCTTTTATATGTTCTTGTATGCTTCAAAAGTAAATAGGACTATCATTTTCTC 2000
 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080
 CTTATTGATTCCTAAACCGTCTGCAACAGCTTTCTTGAATGGATTTTACTTTAGTCTCTTCTATGTGGAAGAGATCTT 4080
 TATAAATATCATAAAGAACATGTGAAATGATGAGCAAGTAAAGGAAATAACTCTATTTCTTACTAGCTCCGTTTCTATC 4160
 TGTTTGTCTTATTTGACTTGATAATCATAGTCCGGCCCTACTCCGGATCCGTCATAGTGGAAAGCTTGGGTTGCCCTT 4240
 TTACTTATCTGAACATACATGCATTTAACTGTGCAACAGTTTGCTGATAACGAAGAACTCCAGTCTGATGTGGAGGA 4320
 CAAAAGGAAATAACAAAATGAAGATTGTCTCTCATTAAGAAAAAACAGGATACGTTGGTCAAGTCCCGATGCGATGTT 4400
 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480
 GATGTTGATCAAGCGCATTACAGATATAAGAGGCAAGTATAAATATATTCGGCATTTGTTATCGCTACAAGAAGAT 4480
 GAAAGAAATGAGCCCTGAAGAAGCAAAAAGAAAGTTGTTCCCTCGAGTTTGCATATTTGGAGGAAAAGCATTTGCTACAT 4560
 ATGTTCAAGGCAAGGAAATTTGAAAATTTATCACTGATGAGGGCAACAGTCAACCATGATCCCGAGATTGGTATCTT 4640
 TTGAAGGTATGATTAGGACAGTCAAAAACAAATGATGCTTGAACATTTTCGAAAGATGTTACTAACCTCTGGTTATACCT 4720
 GTTATAAGTCCAAGATGGTGGATAGATTGAAAAATATCGGTTTGCATTTACGGTTGCTTGTGTTTCTGATTTACAACG 4800
 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880
 TCAGTGTAGCGGAAGTCTAAATTCCTGGTAGTGTGCTGCTCCAGCACATAGGTAATTTTAAATTTGCTTGTGTTTGCATA 4880
 GGTCAAAAATTTCTATAGAGCTAAATATGCTGTATACCTGTCTGATATATCGATATTTGTTCAATAGTACTGCTGGTATGG 4960
 AGGCTAGTGGAAACAGCAACATGAAATTTTCAATGAATGGCTGCCTCTTATCGGAACGTTAGATGGTGGCAATGTTGAG 5040
 AATAAGAGGAAAGTTGGAGAGGACAAATTTCTCCTTTTCGGAGCTCAGGCTCATGAAATTTGCTGGTCTGCAAGGAAAG 5120
 AGCCGAGGAAAGGTAACATAAATTTTCAATTTTAAATCATACAAATTTACATTTGCACAGCACAAGCTCATAAAAAACTA 5200
 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280
 CTCCTCCTCCGTTTTCAATTTGTTTGTCTGGTTATGACTTGACACGAAGTTTCAGATGAAAAAGAAATACTTTTGAATC 5280
 TTTAACGCCATATAGCTAAATTAACGATATATAGAATGAAAGTCAAAAAAGGGAAGCAATCATTTTGGAAACGA 5360
 ACTAAAAAGGAAAGTATAACAGATAAATTTGAGCTGCATATTTCTTATCGATGGAATGCATCTTACCTATCTGTCTTC 5440
 ACGTAGTTTATCCCGGACCAAGATTTGAAGAAGTAAAGGCGTTTATAGGACAGGCTCTTTGGCCCTTACAACATATGA 5520
 AGAACTCATGGGATCCTTGAAGGAAACGAAGGCTTTGGTCTGCTGACTATTTCTTGTAGGAAAGATTTCCTGATT 5600
 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680
 ATATAGAGTGCAGAAAGTAAAGTGTGATGAAGCATATCGAGACCAAGAGGTATACTTCTCGTAGTCTCATTTTCAAACTCTG 5680
 TTAACCATATCTTCTCTGTTTCTATATCTCGGCACAACAACTATTTACTCATATTTAGTACTTAGTATCTCTTTCGT 5760
 GTAGTGTCTTCTGAAACATGTTGCTGTTGAAATGAATGCAGAAATGGACAAAATGTCGATCTTAAACACAGCTGGATCG 5840
 TTCAAAATTTAGCAGTGTATGCAACAATTCATCAATATGCAAGAGACATATGGAGAAATGAACTGTTGAAATACCTTAA 5918

2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080
 AGATGGGAAATCCATGGGAAATTTGTCAGGAATGATATTTGCTATCCCGTAAAATTTCTATGGGAAGGTCATTGAAGGAGCT 2080
 GATGGGTCAAAGGAATGGGTTGGCGGAGAAGATAAATGCTGTTGCTATGATGTCCTCAATACCAGGATATAAAACAAA 2160
 AACAACTATCAACCTTCGACTGTGGTCAACAAAGCTAGCTGCAGAAGCTTTTGTATCTACATGCTTTTAAACAACGGAGACC 2240
 ATGCCAAAGCATATGAGGCAACGAAAAAGGCTGAGAAGGTGACTTTTTTCTTTAGCTTACTTGAGAAACTATAAAATAC 2320
 TCTCCTGGTTCAATTTGCTGCTACTTCCCTTTTTAGTTTGTTTAAAGGAAAGTCTTTTTCTTTTTTGGAAACT 2400
 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480
 CGTTAATTTCAACCTTCCACATGACATGTTTTAAACCAACAAGATTCAAAAGTTTTCTTTACTTTTTCTTAAACTCCGTC 2480
 AAGTCAAACAGACAAAACAAAGTGAACCGGAGCAAGTACAATTCAAAAGCATGAATGCTGCGGAAATACTGCGAGATTC 2560
 TGTTTATTAACCAAGAAGAGCATTCCTAATATTGTGCTTGTATTTTGGATCAGATTTGCTATGCTTTATATCCAGG 2640
 TGACGAGTCACTTGAGGAAAGACACTTCGGTTAAAGCAACAATACACCCTATGTTCTGCTTCTTCCAGGACATTTATG 2720
 CACGGTTCGAGAAGAGATCAGGGAATGCAGTGAACGGGATCAGTTCGCGGAAAAGGTTGCAGTACAGATGAATGACACT 2800
 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 CATCCAACTTTGCATACAGAACTTTTAAAGGATATTGATAGATGTTAAAGGTTTGAAGCTGGAAGCAGGATGGGGAAT 2880
 TACTCAAAGGTTCTTCCCGTATTGGCATCCGATAAATGCTTAAATTTTTCTAGCAATGCTTTAAGATACAAAGGTA 2960
 GATGATTTCTCCCTTTGTTTATCATGTAATAACAGTACTCTACTCCTGTGACATTTGTTATATCTTGGCAGAACGGTCG 3040
 CATACACTAACCACTGTTTTACCAGGCTCTAGAGAAATGGAGCTTCAACATTTCTTGGTGAAGTCTTCTCCGCGCAC 3120
 GTGGAGATCATAGCAATGATAGATGAGGAGGTTGAAAATTTTAAACTCCATTTTCAATTTCTAGGATTAAGTTGATTTTA 3200
 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280
 CATTTTGAAGTCTTGTATCGAATTCGTTGCAAGTCAACATATTACTTTTCTTCAATTTCTTCTGAGAACTACTAAATGTG 3280
 TATGCTTTTGAGCTTTTGTCAACTACTTACTGAATATGGTACTGAAAGTCTTACTGTTTGAAGAAAAGCTAAACC 3360
 AAATGAGGATCTGGATAATGTTGAAATACCTACTTCTGTTTTGGAGTTACTTATCAAAGCCGAAAGAAATGCTGCTGAT 3440
 GTCGAAAAGCAGCAGAAGAACAACACTAGAAGAAGTAAAGATGAGGAACTGAGGCTGTAAGAAAGCAAACTACGAA 3520
 CGTAGAGGAGAAACTGAGGTTGAGAAAGTTGAGGTCAGGATAGTCAAGCAAAAATAAAACGGATATTCGCGCCACATG 3600
 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680
 CAAATAGACCACAGGTTGGTTCACATGGCAAACTATGTTAGTGTAGTGGTCAAGTAAACGGTGTGCTGAGATTCAT 3680
 AGTGAATAGTAAAGATGAAGTTTTCAATGAATTTTACAAGGATGAACATATACACCGCTAGAAAGTATGATGATATC 3760
 ATTTTCACTTCTCCTCTTCAATGTTATTTTCGATGATGATCAAACTATTTGTTTCAAGCAGTATGGCCAGAGAAATCCA 3840
 AAACAAGACAAATGGTGTGACACCAAGAAGATGTTAAGTTTCTGTAACCCAGAGTTGAGTGAATTTAACAACAAATGGA 3920
 CAGGATCTGATGATGGTTGGTAAACACTGAAAAATTTGGCAGAGCTTCGAAAGGTAACAGGTTGTTTCTGACTTGTGAT 4000

Εικόνα 3.3. Η πλήρης νοκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου της τομάτας.

Η ευθυγράμμιση της αμινοξικής αλληλουχίας που προέκυψε από τη μετάφραση του ανοικτού αναγνωστικού πλαισίου, κατέδειξε ότι η ομοιότητα της φωσφορυλάσης του αμύλου της τομάτας με άλλες φωσφορυλάσες του αμύλου από άλλα φυτικά είδη είναι μεγάλη.





Decoration *Decoration #1*: Shade (with solid black) residues that match the Consensus exactly.

Εικόνα 3.4. Η προσδιορισμένη αμινοξική ακολουθία της φωσφορυλάσης του αμύλου της τομάτας (*Solanum lycopersicon*) (SOLLY), ευθυγραμμίστηκε με τις ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες του ενζύμου των *Solanum tuberosum* (SOLTU), *Populus trichocarpa* (POPTR), *Ricinus communis*(RICCO), *Arabidopsis thaliana* (ARATH), *Zea mays* (ZEAMA) και *Oryza sativa japonica* (ORYSJ). Τα μαύρα πλαίσια υποδηλώνουν συντηρημένα αμινοξέα στην πλειοψηφία των αμινοξικών αλληλουχιών.

Πράγματι, η σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών της φωσφορυλάσης του αμύλου στην τομάτα (*Solanum lycopersicon*), με άλλες ήδη χαρακτηρισμένες αλληλουχίες βάσεων φυτικών φωσφορυλασών του αμύλου (Εικόνα 3.4) έδειξε 96,0%, 77,7%, 75,1%, 72,4%, 75,2%, και 70,3% ομολογία με τις αλληλουχίες βάσεων των *Solanum tuberosum*,

Populus trichocarpa, *Ricinus communis*, *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa japonica* και *Zea mays* αντίστοιχα (Πίνακας 3.12).

Πίνακας 3.12. Το ποσοστό ομοιότητας των αλληλουχιών των πεπτιδικών αλληλουχιών που προκύπτουν από τη σύγκριση της φωσφορυλάσης του αμύλου μεταξύ των φυτικών ειδών *Solanum lycopersicon* (SOLLY Q8W505) και των *Solanum tuberosum* (P53535 PHSL2_SOLTU) , *Populus trichocarpa* (B9HXL0_POPTR), *Ricinus communis* (B9RCW0_RICCO), *Arabidopsis thaliana* (Q9LIB2_ARATH At3g29320), *Oryza sativa japonica* (B3IYE3_ORYSJ), *Zea mays* (B5AMJ9_ZEAMA).

Ποσοστό ομοιότητας (%)									
	1	2	3	4	5	6	7		
1		96.0	77.7	75.1	72.4	75.2	70.3	1	SOLLY
2	4.2		78.0	75.8	72.9	76.0	70.7	2	SOLTU
3	26.6	26.1		82.9	72.0	77.6	72.3	3	POPTR
4	30.3	29.3	19.4		72.8	77.6	71.5	4	RICCO
5	34.5	33.7	35.0	33.8		78.7	72.5	5	ARATH
6	30.2	29.0	26.6	26.7	25.1		89.3	6	ZEAMA
7	37.7	37.2	34.6	35.8	34.2	11.6		7	ORYSJ
	1	2	3	4	5	6	7		

Μετά την ταυτοποίηση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας και τη σύγκριση των αμινοξικών αλληλουχιών, σχεδιάστηκαν εκκινητές στο ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο της αλληλουχίας αυτής. Η θέση των εκκινητών φαίνεται παρακάτω (Εικόνα 3.5).


```

      10      20      30      40
-----
ATGGCAACTTTTGGCTGTCTCTGGATTGAACTCAATTTCAA 40
GTTTAAATAACAATTTTCAGAAGCAAAAACCTCAAATATTTT 80
TTTGAGTAGAAAGAGGAGTTTATTGTTCAATTTAAGAAGA 120
AGAAGAAGAAGTTTCTATGTTAGCAATGTTGCTAGTGATC 160
AAAAGCAGAAGACAAAAGATTCTTCCTCTGATGAAGGTAT 200

      210      220      230      240
-----
TACATTAGATGTTTATCAGCCGGACTCAACGTCTGTTTTTA 240
TCAAGTATAAAGTATCACGCAGAGTTCACGCCATCATTTT 280
CTCCTGAGAAGTTTGAACCTCCCAAGGCGTACTATGCAAC 320
TGCAGAGAGTGTTCGAGATATGCTCATTTTAAAGTTGGAAT 360
GCCACATATGAATACTACGAAAAGATGAATGTAAAGCAGG 400

      410      420      430      440
-----
CATATTACTTGTCTATGGAGTTTCTTCAGGTTAGAGCTTT 440
ACTCAATGCTATTTGGTAACTTGGGGCTAAACGGACCTTAT 480
GCAGATGCTTTAACTAAGCTCGGATACAGTTTAGAGGATG 520
TAGCCAGGCAGGAACCCAGATGCAGCTTTAGGGAATGGAG 560
CTTAGGAAGACTTGCTTCTTGCTTTCTTGACTCAATGGCG 600

      610      620      630      640
-----
ACGCTAAACTACCCTGCATGGGGTTATGGACTTAGATAACC 640
AATATGGCCTTTTCAAACAGCTTATTACAAAAGATGGCCA 680
GGAGGAAGTTGCTGAAAACCTGGCTCGAGGTGGGAAATCCA 720
TGGGAAATTGTCAGGAATGATATTTTCGTATCCCGTAAAAT 760
TCTATGGGAAGGTCATTGAAGGAGCTGATGGGTCAAAGGA 800

      810      820      830      840
-----
ATGGGTTGGCGGAGAAGATATAAAGTGCCTATGAT 840
GTCCCAATACCAGGATATAAAAACAAAACAACCTATCAACC 880
TTCGACTGTGGTCAACAAAGCTAGCTGCAGAAGCTTTTGA 920
TCTACATGCTTTTAAACAACGGAGACCATGCCAAAGCATAT 960
GAGGCACAGAAAAGGCTGAGAAGATTTGCTATGTCTTAT 1000

      1010      1020      1030      1040
-----
ATCCAGGTGACGAGTCACTTGAGGGAAAGACACTTCGGTT 1040
AAAGCAACAATACACCCTATGTTCTGCTTCTCTTCAGGAC 1080
ATTATTGCACGGTTCGAGAAGAGATCAGGGAATGCAGTGA 1120
ACTGGGATCAGTTCCCGGAAAAGGTTGCAGTACAGATGAA 1160
TGACACTCATCCAACACTTTGCATACCAGAACTTTTAAGG 1200

      1210      1220      1230      1240
-----
ATATTGATAGATGTTAAAGGTTTGGAGCTGGAAGCAGGCAT 1240
GGGGAATTACTCAAAGAACGGTCGCATACACTAACCACAC 1280
TGTTTTACCCGAGGCTCTAGAGAAATGGAGCTTCACACTT 1320
CTTGGTGAACCTGCTTCCTCGGCACGTGGAGATCATAGCAA 1360
TGATAGATGAGGAGCTTTTGCTAACTATACTTACTGAATA 1400

```

Εικόνα 3.5. Σχεδιασμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ορθόδρομου εκκινητή (5'-ACCATTTGAACCCCGATTTGC- 3') και της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας οπισθόδρομου εκκινητή (5'-CCTCCTGGCCATCTTTTGTA -3').

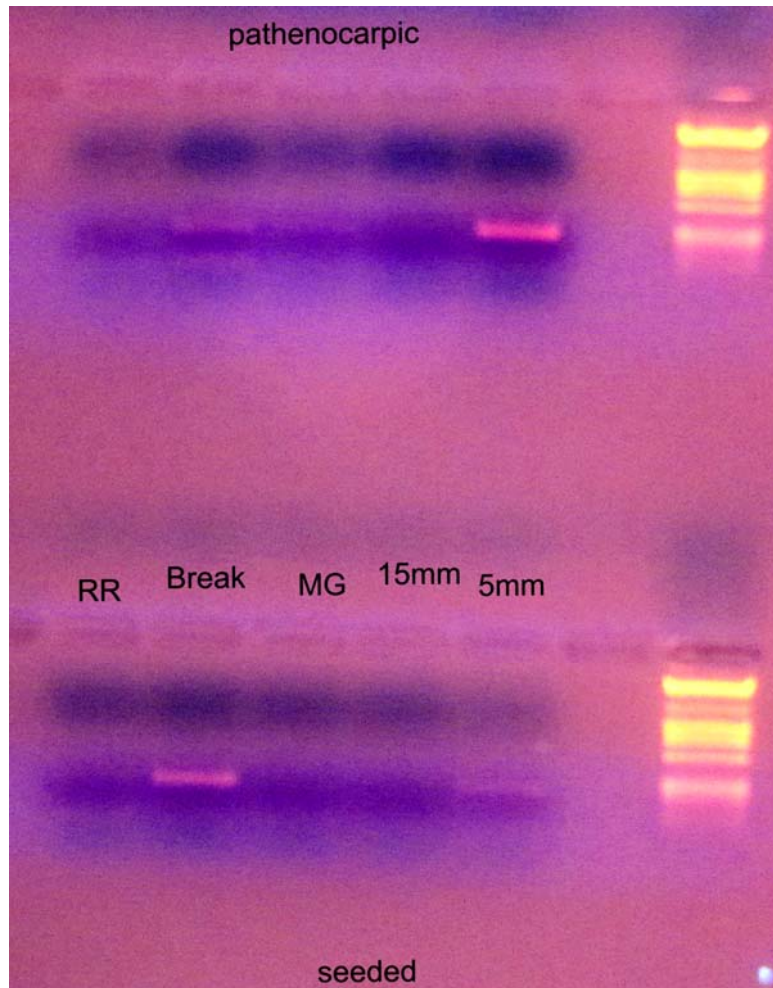
3.4. Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου στα διάφορα στάδια ανάπτυξης παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών τομάτας.

3.4.1. Προσδιορισμός μέσω ημιποσοτικής PCR

Προκειμένου να μελετηθεί η εμπλοκή της φωσφορυλάσης του αμύλου στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια της τομάτας τόσο σε ένσπερμους όσο και σε παρθενοκαρπικούς καρπούς, προσδιορίστηκε η συσσώρευση των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου. Ολικό RNA απομονώθηκε από καρπούς της ποικιλίας Conchita και χρησιμοποιήθηκε για την εφαρμογή της ημιποσοτικής PCR. Οι ποσότητες του ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση, κανονικοποιήθηκαν με βάση την ενίσχυση τμήματος ενός σταθερής έκφρασης γονιδίου (house keeping) της ουμπικουϊτίνης (Ubiquitin), το οποίο εκφράζεται σε σταθερά επίπεδα σε όλα τα στάδια ανάπτυξης της τομάτας.

Τα προϊόντα της PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης (2% w/v) και χρωματίστηκαν με βρωμιούχο αιθίδιο.

Από την Εικόνα 3.6 φαίνεται πως η συσσώρευση των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου παρουσιάζεται στους ένσπερμους καρπούς του υβριδίου Conchita στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης των καρπών (5mm) και πιο έντονα κατά την ωρίμανση του καρπού, στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος. Στους άσπερμους καρπούς η συσσώρευση των μεταγραφημάτων φαίνεται να είναι υψηλή κατά την έναρξη της ανάπτυξης (5mm), ενώ παρουσιάζεται λιγότερο έντονα στα στάδια του ώριμου πράσινου και του «σπασίματος» του χρώματος.



Εικόνα 3.6. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR από παρθενοκαρπικούς και ένσπερους καρπούς *Conchita* σε διάφορα στάδια ωρίμανσης.

- 5mm: στάδιο 5 χιλιοστών
- 15mm: στάδιο 15 χιλιοστών
- MG: στάδιο ώριμου πράσινου
- Break: στάδιο «σπασίματος» χρώματος
- RR: στάδιο ώριμου κόκκινου χρώματος

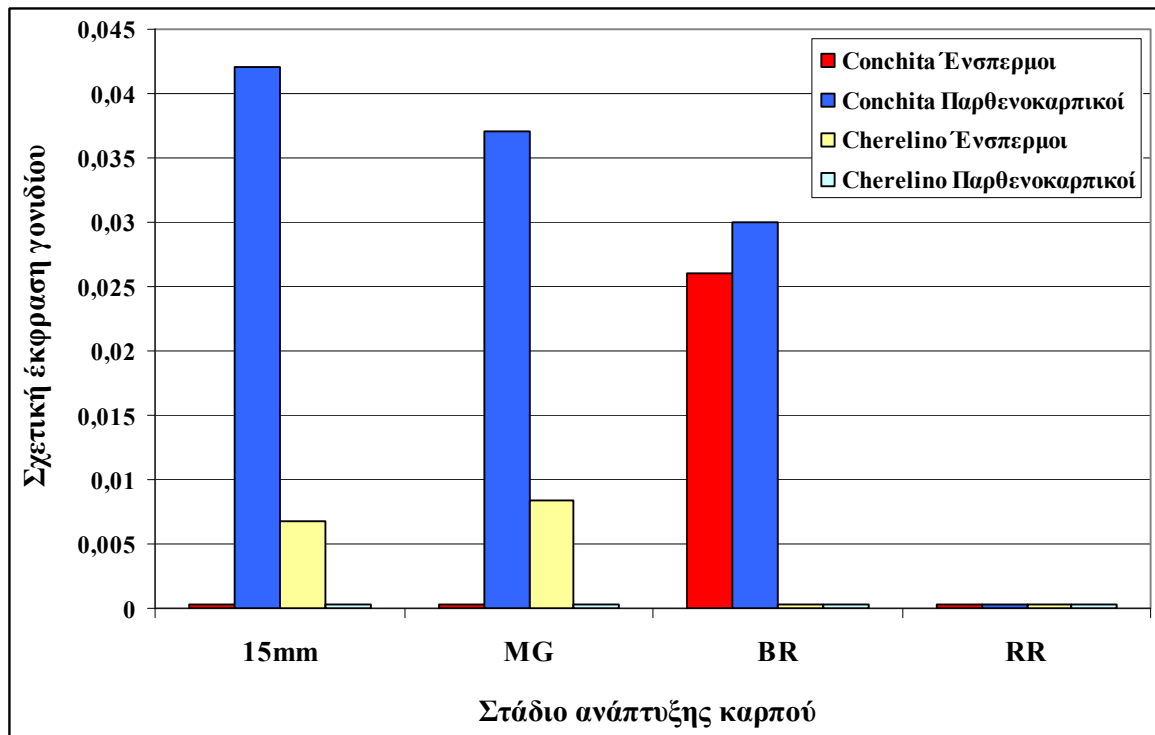
3.4.2. Προσδιορισμός και ποσοτικοποίηση μέσω RT-PCR

Για τον προσδιορισμό της εμπλοκής του ενζύμου της φωσφορυλάσης του αμύλου στην αποδόμηση του αμύλου στα διάφορα στάδια ανάπτυξης των ποικιλιών Conchita και Cherelino τόσο σε ένσπερους όσο και σε παρθενοκαρπικούς καρπούς, προσδιορίστηκε η συσσώρευση των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου μέσω RT-PCR. Μετά την απομόνωση του ολικού RNA από τους ιστούς των καρπών, οι ποσότητες του RNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση, μετά την μετατροπή τους σε cDNA κανονικοποιήθηκαν με βάση την ενίσχυση τμήματος ενός γονιδίου με σταθερή έκφραση (house keeping) της ουμπικουϊτίνης (Ubiquitin), σε όλα τα στάδια ανάπτυξης.

Στο Σχήμα 3.2. φαίνεται το πλήθος των μεταγραφημάτων που προέκυψαν από την αντίδραση της RT-PCR. Οι ένσπεροι καρποί της ποικιλίας Conchita εμφάνισαν πλήθος μεταγραφημάτων μόνο στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος. Οι παρθενοκαρπικοί καρποί του ίδιου σταδίου εμφανίζουν αυξημένο πλήθος μεταγραφημάτων σε σχέση με τους ένσπερους καρπούς της ίδιας ποικιλίας. Εκτός από το στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος, οι παρθενοκαρπικοί καρποί εμφανίζουν πλήθος μεταγραφημάτων στα στάδια των 15mm και στο ώριμο πράσινο στάδιο. Το πλήθος των μεταγραφημάτων των παρθενοκαρπικών καρπών της ποικιλίας Conchita παρουσιάζει μέγιστο στο στάδιο των 15mm, ενώ όσο προχωρά η ωρίμανση, το πλήθος των μεταγραφημάτων μειώνεται.

Οι παρθενοκαρπικοί καρποί της ποικιλίας Cherelino δεν αντέδρασαν, δίνοντας μηδενικό σήμα. Οι ένσπεροι καρποί της ίδιας ποικιλίας εμφάνισαν πλήθος μεταγραφημάτων στο στάδιο των 15mm και στο ώριμο πράσινο στάδιο. Στο ώριμο κόκκινο στάδιο δεν παρατηρήθηκε καμία αντίδραση από όλα τα είδη καρπών.

Η σχετική έκφραση του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου όπου εκφράζεται, ως προς το γονίδιο της ουμπικουϊτίνης είναι πολύ χαμηλή, στα επίπεδα του 0,007-0,042.



Σχήμα 3.2. Η συσσώρευση των μεταγραφημάτων του γονιδίου της φωσφορυλάσης του αμύλου σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς cherry τομάτας των υβριδίων Conchita και Cherelino στα στάδια των 15 χιλιοστών (15mm), του ώριμου πράσινου (MG), του «σπασίματος» του χρώματος (BR) και στο στάδιο του ώριμου κόκκινου χρώματος (RR).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η επίδραση της φυσιολογικής γονιμοποίησης ή της καρπόδεσης με την εφαρμογή της ορμόνης β-NOA, καθώς και του σταδίου ανάπτυξης και ωρίμανσης και της αποθήκευσης, στο περιεχόμενο των καρπών cherry τομάτας σε σάκχαρα, άμυλο, οξέα και ολικά διαλυτά στερεά. Παράλληλα, έγινε προσπάθεια μελέτης της αμυλολυτικής δραστηριότητας στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς κατά την ανάπτυξη και ωρίμανσή τους, μέσω του προσδιορισμού της δράσης της φωσφολυάσης του αμύλου, ενζύμου που εμπλέκεται στο μεταβολισμό του αμύλου στους καρπούς της τομάτας.

4.1. Μεταβολές σακχάρων και οξέων σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς κατά την ωρίμανση

Κατά την πορεία της ανάπτυξης και ωρίμανσης των καρπών το περιεχόμενό τους σε φρουκτόζη και γλυκόζη αυξάνεται και στους ένσπερμους και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς, ενώ η σακχαρόζη μειώνεται για να φτάσει στο ώριμο κόκκινο στάδιο σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα. Η μεταβολή των σακχάρων στα στάδια που μελετήθηκαν διαφέρει μεταξύ των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών. Έτσι, στους ένσπερμους καρπούς και των δύο υβριδίων η αύξηση της φρουκτόζης είναι σχετικά ομαλή μεταξύ των σταδίων που μελετήθηκαν, με τη μέγιστη συγκέντρωση να παρατηρείται στο ώριμο κόκκινο στάδιο, ενώ αντίθετα στους παρθενοκαρπικούς εμφανίζεται στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος και δεν παρατηρείται περαιτέρω αύξηση στο ώριμο κόκκινο. Αντίστοιχη εικόνα αλλά λιγότερο σημαντική εμφανίζεται και στην γλυκόζη. Αντίθετα, η μείωση της σακχαρόζης με την ωρίμανση δε φαίνεται να επηρεάζεται από την παρουσία ή όχι του σπόρου στους καρπούς. Η μεγάλη αύξηση των εξοζών, ιδιαίτερα στους παρθενοκαρπικούς καρπούς παρατηρείται εντός λίγων ημερών (3-4), από το ώριμο πράσινο στάδιο έως το στάδιο «σπασίματος» του χρώματος., δηλαδή συμπίπτει με την έναρξη της κλιμακτηρίου.

Σε συμφωνία με τη πορεία της μεταβολής των σακχάρων των ένσπερμων καρπών κατά την ωρίμανση, οι Winsor *et al.* (1962a) αναφέρουν προοδευτική αύξηση των σακχάρων από το στάδιο του ώριμου πράσινου έως την πλήρη ωρίμανση, με έντονη αύξηση μεταξύ των σταδίων «σπασίματος» και αλλαγής του χρώματος. Αντίθετα, οι Salunkhe *et al.*, (1974) σε

μεγαλόκαρπες τομάτες και ο Picha (1987) σε cherry τομάτες παρατήρησαν πιο ομαλή αύξηση των αναγωγικών σακχάρων κατά την ωρίμανση σε σχέση με τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, ενώ οι Davies and Kempton (1975) αναφέρουν μείωση στο περιεχόμενο των καρπών σε γλυκόζη και φρουκτόζη από το κιτρινο-πορτοκαλί έως το ώριμο κόκκινο στάδιο.

Ως προς την αναλογία της φρουκτόζης και της γλυκόζης, στο στάδιο των 15mm η γλυκόζη είναι ελαφρά υψηλότερη της φρουκτόζης και στα δύο είδη των καρπών, ενώ η φρουκτόζη υπερτερεί ελαφρά στους παρθενοκαρπικούς καρπούς στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος. Αντίθετα, οι ένσπερμοι καρποί εκτός από τα 15mm παρουσιάζουν ίσες ποσότητες γλυκόζης και φρουκτόζης. Αντίθετα, ο Picha (1987) σε δύο ποικιλίες cherry τομάτας (ένσπερμοι καρποί) παρατήρησε σε όλα τα στάδια της ανάπτυξης και ωρίμανσης υψηλότερες συγκεντρώσεις φρουκτόζης σε σχέση με τη γλυκόζη. Σε μεγάλοκαρπους γονότυπους τομάτας οι Davies and Kempton (1975) και Stevens *et al.* (1977a,b) αναφέρουν σχεδόν διπλάσια ποσά γλυκόζης σε σχέση με τη φρουκτόζη στα αρχικά στάδια ανάπτυξης, ισορροπία των εξοζών στο ώριμο πράσινο και επικράτηση της φρουκτόζης, με την γλυκόζη να μην παρουσιάζει ιδιαίτερη αύξηση μετά το στάδιο του ώριμου πράσινου, όταν στην παρούσα εργασία και η γλυκόζη αλλά και η φρουκτόζη δεν αυξήθηκαν σημαντικά στους παρθενοκαρπικούς καρπούς μετά το στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος.

Το περιεχόμενο των καρπών σε άμυλο μειώνεται καθ'όλη τη διάρκεια της ωρίμανσης και πρακτικά μηδενίζεται στο ώριμο κόκκινο στάδιο. Αν και στους καρπούς του υβριδίου Conchita και στους ένσπερμους καρπούς του υβριδίου Cherelino, παρατηρείται σχετικά ομαλή μεταβολή με το χρόνο του αμύλου κατά την ωρίμανση, στο υβρίδιο Cherelino οι παρθενοκαρπικοί καρποί παρουσιάζουν μειωμένη αποδόμηση του αμύλου μεταξύ του σταδίου των 15mm και του ώριμου πράσινου σταδίου, αλλά έντονη αποδόμηση σε σύντομο χρονικό διάστημα (3-4 ημέρες) μεταξύ των σταδίων του ώριμου πράσινου και του «σπασίματος» του χρώματος. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, στην Conchita μεταξύ των σταδίων του ώριμου πράσινου χρώματος και του «σπασίματος» του χρώματος παρατηρείται μειωμένη αποδόμηση αμύλου, αλλά έντονη αύξηση των εξοζών, χωρίς τη συσσώρευση σακχαρόζης, γεγονός που πιθανά οφείλεται στη συνδυασμένη αποδόμηση του αμύλου και στην εισροή σακχαρόζης από τα φύλλα και μετατροπή της μέσω της ιμπερτάσης σε εξόζες εντός του καρπού (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001). Αντίθετα στην Cherelino ιδίως στους

παρθενοκαρπικούς καρπούς παρατηρείται μεγαλύτερη αντιστοιχία μεταξύ της αποδόμησης του αμύλου και της συσσώρευσης των εξοζών. Η πορεία της συσσώρευσης και αποδόμησης του αμύλου κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση αντίστοιχα, συμφωνεί με τα βιβλιογραφικά δεδομένα (Hobson, 1967; Tanaka *et al.*, 1974a,b; Ho *et al.*, 1983; Varga and Bruinsma, 1985), αλλά στην παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε ότι η αποδόμηση του αμύλου πραγματοποιείται και πριν το ώριμο πράσινο στάδιο, δηλαδή πριν τη κλιμακτήριο, σε αντίθεση με τις προαναφερθείσες αναφορές. Όμοια όμως είναι η εικόνα της αποδόμησης του αμύλου κατά την ωρίμανση, από το περικάρπιο προς τον πλακούντα, όταν ακόμα και στο ώριμο κόκκινο στάδιο υπάρχουν υπολείμματα αμύλου στον πλακούντα (Obiadalla-Ali *et al.*, 2004).

Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα αυξάνεται κατά την ανάπτυξη των καρπών και την ωρίμανσή τους έως το στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος όπου λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της, ανεξάρτητα από το είδος των καρπών και το γονότυπο. Από το στάδιο αυτό έως και το ώριμο κόκκινο στάδιο η οξύτητα μειώνεται, εντονότερα όμως στους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Έτσι, το επίπεδο της οξύτητας των ένσπερμων καρπών στο ώριμο κόκκινο στάδιο μειώθηκε στα επίπεδα του ώριμου πράσινου σταδίου, ενώ στους παρθενοκαρπικούς τα επίπεδα ήταν χαμηλότερα αυτών του ώριμου πράσινου καρπού. Αντίστοιχη μεταβολή της τιτλοδοτούμενης οξύτητας κατά την ωρίμανση αναφέρεται σε μεγαλόκαρπους γονότυπους (Winsor *et al.*, 1962a; Dalal *et al.*, 1965; Stevens, 1972) αλλά και σε cherry καρπούς τομάτας (Picha, 1987).

Τα ολικά διαλυτά στερεά των καρπών αυξάνονται κατά την ανάπτυξη και ωρίμανσή τους. Παράλληλα, σε όλες τις περιπτώσεις (άσπερμοι και ένσπερμοι καρποί και των δύο υβριδίων), τα ολικά διαλυτά στερεά σχετίζονται στενά με τα ολικά σάκχαρα (φρουκτόζη + γλυκόζη + σακχαρόζη) τόσο στα στάδια της ωρίμανσης όσο και κατά την αποθήκευση των καρπών (Πίνακας 3.11), παρόλο που τα σάκχαρα δεν αποτελούν τα μόνα στοιχεία που καθορίζουν το περιεχόμενο των καρπών σε διαλυτά στερεά (Young *et al.*, 1993; Saltveit, 2005). Έτσι, στους παρθενοκαρπικούς καρπούς της Conchita και στα δύο είδη καρπών της Chelino η έντονη αύξηση των ολικών διαλυτών στερεών μεταξύ των σταδίων του «σπασίματος» του χρώματος και του ώριμου κόκκινου δεν αντιστοιχεί σε ανάλογη αύξηση των ολικών σακχάρων, ενώ και τα οργανικά οξέα που συμμετέχουν στα διαλυτά στερεά των καρπών μειώνονται στα στάδια αυτά της ωρίμανσης (Σχήμα 3.1). Η αύξηση επομένως των διαλυτών στερεών στα τελικά στάδια της ωρίμανσης πιθανά δεν προέρχεται από αύξηση των

σακχάρων των καρπών αλλά από αύξηση του ποσού των διαλυτών πηκτινών (Salunkhe *et al.*, 1974; Hobson and Grierson, 1993).

4.2. Διαφορές στο περιεχόμενο των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών σε υδατάνθρακες και οξέα

Από τους Πίνακες 3.1. και 3.2. παρατηρείται ότι στις περισσότερες περιπτώσεις οι παρθενοκαρπικοί καρποί των υβριδίων Conchita και Cherelino υπερτερούν ως προς την περιεκτικότητά τους σε φρουκτόζη και γλυκόζη έναντι των ένσπερμων καρπών. Αντίθετα, η περιεκτικότητα σε σακχαρόζη δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών στα στάδια που εντοπίστηκε. Επομένως, οι παρθενοκαρπικοί καρποί και των δύο υβριδίων έφεραν περισσότερα ολικά σάκχαρα σε σχέση με τους ένσπερμους σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης (Σχήμα 3.1), συμφωνώντας με αντίστοιχες αναφορές στην τομάτα (Janes, 1941; Richter, 1972; Dryanovska, 1975; Casas-Diaz *et al.*, 1987). Σύμφωνα με τον Janes (1941), οι παρθενοκαρπικοί καρποί που παρήχθησαν μετά από ψεκασμό των ανθέων με IAA ή IBA αν και δεν διέφεραν στο περιεχόμενο σε ολικά σάκχαρα με τους ένσπερμους στα πρώτα στάδια ανάπτυξης, με την ωρίμανσή τους εμφάνισαν ταχύτερη συσσώρευση σακχάρων, έτσι ώστε στο ώριμο κόκκινο στάδιο τα σάκχαρα των παρθενοκαρπικών καρπών να είναι ψηλότερα. Αντίθετα, οι Cano-Medrano and Darnell (1997) δεν παρατήρησαν διαφορές στη συγκέντρωση των εξοζών στους ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς (με εφαρμογή γιββερελλικού οξέος - GA₃) ώριμους καρπούς του μπλούμπερι (*Vaccinium ashei*).

Το περιεχόμενο των καρπών σε άμυλο στα διάφορα στάδια ανάπτυξης, δε φαίνεται να επηρεάζεται από την ύπαρξη ή μη των σπόρων στους καρπούς, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις (στο ώριμο πράσινο στάδιο στο Cherelino και στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος και στους δύο γονότυπους) παρατηρούνται διαφορές οι οποίες όμως δεν ακολουθούν κάποια συγκεκριμένη τάση. Αν και η ποσότητα του αμύλου που απομένει στο ώριμο κόκκινο στάδιο είναι πολύ χαμηλή, εντούτοις παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών, με τους ένσπερμους να διατηρούν λίγο περισσότερο άμυλο στην περιοχή του πλακούντα κοντά στους σπόρους, όπως έχει παρατηρηθεί από χρώση με ιώδιο σε τομές καρπών. Σύμφωνα με τους Obiadalla-Ali *et al.*

(2004) το αποθησαυρισμένο άμυλο στον πλακούντα χρησιμεύει για την τροφοδοσία των σπερμάτων όταν διακοπεί η εισροή της σακχαρόζης από τα φύλλα. Αντίθετα, σύμφωνα με τον Janes (1941), το περιεχόμενο των παρθενοκαρπικών καρπών σε άμυλο είναι υψηλότερο από των ένσπερμων σε όλα τα στάδια ανάπτυξης, ενώ και τα δύο είδη καρπών εμφάνισαν σχεδόν μηδενική περιεκτικότητα σε άμυλο στο ώριμο κόκκινο στάδιο.

Ακολουθώντας τις διαφορές των σακχάρων, τα ολικά διαλυτά στερεά στους παρθενοκαρπικούς καρπούς του υβριδίου Cherelino υπερτερούν σημαντικά έναντι των ένσπερμων καρπών σε όλα τα στάδια ωρίμανσης, όταν στο υβρίδιο Conchita οι διαφορές είναι λιγότερο έντονες και σημαντικές μόνο στο ώριμο κόκκινο στάδιο. Αντίστοιχα αποτελέσματα που πιθανά οφείλονται στους διαφορετικούς γονότυπους ή στις διαφορετικές τεχνικές επαγωγής της παρθενοκαρπίας έχουν αναφερθεί, είτε παρουσιάζοντας υπεροχή των παρθενοκαρπικών (Janes, 1941; Dryanovska, 1975; Falavigna *et al.*, 1978; Casas-Diaz *et al.*, 1987; Carmi *et al.*, 2003), είτε έλλειψη διαφορών στα ολικά διαλυτά στερεά μεταξύ των δύο ειδών καρπών (Lipari *et al.*, 1994; Rotino *et al.*, 2005; Martinelli *et al.*, 2009).

Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών και στα δύο υβρίδια παρουσιάζει διαφορές ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης. Στα αρχικά στάδια ανάπτυξης (15mm) οι παρθενοκαρπικοί καρποί έχουν σημαντικά υψηλότερη οξύτητα σε σχέση με τους ένσπερμους, στο ώριμο πράσινο στάδιο παρατηρείται ισορροπία, ενώ από το στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος η οξύτητα των ένσπερμων καρπών υπερτερεί αλλά όχι στατιστικά σημαντικά και κατά το ώριμο κόκκινο στάδιο η διαφορά αυτή αυξάνεται. Σε συμφωνία με τα αποτελέσματα αυτά, ο Janes (1941) παρατήρησε μειωμένη διαφορά στην ολική οξύτητα των παρθενοκαρπικών και ένσπερμων καρπών έως και το ώριμο πράσινο στάδιο, ενώ με την πρόοδο της ωρίμανσης οι διαφορές εντάθηκαν και οφείλονται κυρίως στις διαφορές στην οξύτητα του ζελατινώδους παρεγχύματος, με το περικάρπιο να μην παρουσιάζει σημαντικές διαφορές σε όλα τα στάδια της ωρίμανσης. Όμως, αν και ο Richter (1972) συμφωνεί με την υψηλότερη οξύτητα των ένσπερμων καρπών, οι Dryanovska (1975) και Casas-Diaz *et al.* (1987) ισχυρίζονται το αντίθετο, ενώ υπάρχουν και αναφορές για έλλειψη διαφορών (Lipari *et al.*, 1994; Rotino *et al.*, 2005). Γίνεται λοιπόν φανερό πως τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας συμφωνούν με την γενικότερη άποψη ότι οι άσπερμοι καρποί τομάτας στο στάδιο του ώριμου κόκκινου περιέχουν περισσότερα σάκχαρα, λιγότερα οξέα, λιγότερη σελλουλόζη (Lukyanenko, 1991) και έχουν περισσότερα διαλυτά στερεά

(Vagoquaux *et al.*, 2000) από τους αντίστοιχους ένσπερμους καρπούς. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί πως οι παρθενοκαρπικοί cherry καρποί τομάτας τόσο στην παρούσα εργασία όσο και από προγενέστερες εργασίες στο Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών (Αρναούτης, 2006; Παρασκευάς, 2007; Μακρογιάννη, 2010) δεν υστερούσαν ως προς την οπτική ποιότητα, το περιεχόμενο σε ζελατινώδες παρέγχυμα ήταν συγκρίσιμο με αυτό των ένσπερμων καρπών και έφεραν υψηλότερα διαλυτά στερεά και χαμηλότερη οξύτητα σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς στο ώριμο κόκκινο στάδιο. Αντίθετα, είναι πολυάριθμες οι αναφορές σχετικά με την ποιοτική (μορφολογική και γευστική) υποβάθμιση των μεγαλόκαρπων παρθενοκαρπικών καρπών έναντι των ένσπερμων (Rylski, 1979; Abad and Monteiro, 1989; Ολύμπιος, 2001).

Στην παρούσα μελέτη (αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται) αλλά και από αντίστοιχες παρατηρήσεις των Αρναούτη (2006), Παρασκευά (2007) και Μακρογιάννη (2010) με ένσπερμους και άσπερμους (επαγόμενους με β-NOA) καρπούς παρατηρήθηκε ότι οι παρθενοκαρπικοί καρποί υστερούσαν σε μέγεθος έναντι των ένσπερμων καρπών και παράλληλα εμφάνιζαν καθυστερημένη ανάπτυξη. Σε όμοια συμπεράσματα καταλήγουν οι Janes (1941) και Pandolfini *et al.* (2009) σε καρπούς τομάτας, οι Cano-Medrano and Darnell (1997) σε καρπούς μπλούμπερι και οι Hayata *et al.* (2000) στο πεπόνι. Αντίθετα οι Picken και Grimmatt (1986) αναφέρουν ότι με την εφαρμογή 4-CPA και β-NOA αυξήθηκε το μέγεθος των παραγόμενων καρπών τομάτας. Ενώ οι διαφορές στο μέγεθος των καρπών είναι εμφανείς, τα επίπεδα της ιμβερτάσης και κατά συνέπεια τα επίπεδα των εξοζών, μιας και η ιμβερτάση φαίνεται να ελέγχει τη συγκέντρωση των εξοζών (Nguyen-Quoc and Foyer, 2001), δεν παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών, τόσο στην τομάτα (Miron and Schaffer, 1991), όσο και στο μπλούμπερι (Cano-Medrano and Darnell, 1997) και το πεπόνι (Hayata *et al.*, 2000), ενώ δεν παρατηρούνται διαφορές ως προς τον αριθμό των κυττάρων των καρπών αλλά ως προς το μέγεθός τους. Αν και οι παρθενοκαρπικοί καρποί των ειδών αυτών εμφανίζουν εντονότερη αρχική ανάπτυξη έναντι των ένσπερμων, μετέπειτα ο ρυθμός ανάπτυξής τους μειώνεται. Η μείωση αυτή τουλάχιστον στη τομάτα σχετίστηκε με μειωμένη συσσώρευση των γιββερελλινών και περιορισμένο sink-strength έναντι των ένσπερμων καρπών (Mapelli *et al.*, 1978; Ho and Hewitt, 1986).

4.3. Μετασυλλεκτικές μεταβολές στο περιεχόμενο των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών σε υδατάνθρακες και οξέα

Παρόλο που υπάρχουν εκτενείς βιβλιογραφικές αναφορές σχετικά με την επίδραση των συνθηκών και της διάρκειας της αποθήκευσης στη μετασυλλεκτική συμπεριφορά των καρπών της τομάτας, εντούτοις δεν έχει μελετηθεί η επίδραση της παρουσίας σπόρου στη μεταβολή του περιεχομένου των καρπών σε υδατάνθρακες και οξέα κατά την αποθήκευση. Στην παρούσα μελέτη, το ποσοστό σε φρουκτόζη των παρθενοκαρπικών καρπών Cherelino είναι σημαντικά αυξημένο κατά το ώριμο κόκκινο στάδιο και μετά από αποθήκευση στους 15°C για 10 ημέρες, αλλά όχι και μετά από 20 ημέρες. Τα επίπεδα φρουκτόζης στο υβρίδιο Conchita δε φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά από την παρουσία σπόρων στους καρπούς, αν και παρατηρείται τάση υψηλότερου περιεχομένου σε φρουκτόζη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης η συγκέντρωση σε φρουκτόζη τόσο στους ένσπερμους όσο και στους παρθενοκαρπικούς καρπούς των υβριδίων Conchita και Cherelino παρουσιάζει μια τάση αύξησης καθώς παρατείνεται η διάρκεια της αποθήκευσης, η οποία δεν είναι πάντοτε σημαντική. Ενώ μεταξύ των δύο υβριδίων, δεν εμφανίζονται διαφορές στη περιεκτικότητα σε φρουκτόζη στους ένσπερμους ή στους παρθενοκαρπικούς καρπούς στο ώριμο κόκκινο στάδιο, η αύξηση της φρουκτόζης μετά από 20 ημέρες αποθήκευσης είναι εντονότερη στους καρπούς της Cherelino (ένσπερμοι και παρθενοκαρπικοί) σε σχέση με τους καρπούς της Conchita, γεγονός που πιθανά σχετίζεται με τη μειωμένη μετασυλλεκτική ζωή της Cherelino σε σχέση με την Conchita (Μακρογιάννη, 2010).

Σε σχέση με την φρουκτόζη η αύξηση του περιεχομένου των καρπών σε γλυκόζη κατά την πρόοδο της αποθήκευσης πρακτικά εμφανίζεται αμελητέα και μη σημαντική, ιδιαίτερα στους καρπούς της Conchita. Αντίστοιχα, οι διαφορές των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών είναι σε κάθε περίπτωση μη σημαντικές, αν και παρατηρείται ελαφρά αύξηση στο περιεχόμενο σε γλυκόζη στους παρθενοκαρπικούς καρπούς.

Οι Gomez *et al.* (2009) παρατήρησαν αύξηση τόσο στη φρουκτόζη όσο και στη γλυκόζη κατά την αποθήκευση ώριμων καρπών μικρόκαρπης τομάτας (cv. Micro-Tom) στους 20°C. Αντίθετα οι Auerswald *et al.* (1999), Krumbein *et al.* (2004) και de Leon-Sanchez *et al.* (2009) αναφέρουν πως οι ποσότητες των αναγωγικών σακχάρων δε μεταβάλλονται κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης των ώριμων καρπών στους 20°C, ενώ μειώνονται στους 10°C (de Leon-Sanchez *et al.* 2009). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η θερμοκρασία αποθήκευσης

αλλά και ο γονότυπος επιδρούν σημαντικά στη μεταβολή της περιεκτικότητας των καρπών σε σάκχαρα κατά την αποθήκευση.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρατηρείται στην περιεκτικότητα των καρπών σε ολικά διαλυτά στερεά, τόσο μεταξύ των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών και των δύο υβριδίων, όσο και κατά την πορεία της αποθήκευσης. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης, η περιεκτικότητα των καρπών σε ολικά διαλυτά στερεά αυξάνεται και στα δύο υβρίδια, εντονότερα όμως στο υβρίδιο Conchita. Σε κάθε περίπτωση και ιδιαίτερα στην Conchita οι παρθενοκαρπικοί καρποί υπερτερούν σε ολικά διαλυτά στερεά σε σχέση με τους ένσπερμους καρπούς, αν όχι πάντα στατιστικά σημαντικά. Παρά την στενή συσχέτιση μεταξύ των ολικών σακχάρων και των διαλυτών στερεών που παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις, η εντονότερη αύξηση των σακχάρων στην Cherefino δεν αντιστοιχεί στην σχετικά περιορισμένη αύξηση των διαλυτών στερεών, όταν το αντίθετο (μικρότερη αύξηση σακχάρων και εντονότερη αύξηση διαλυτών στερεών) παρατηρείται στην Conchita. Όμοια, οι Cantwell *et al.* (2009) αναφέρουν ότι τα ολικά διαλυτά στερεά αυξήθηκαν κατά την αποθήκευση καρπών τομάτας η οποία όμως είναι ανεξάρτητη με την αύξηση που παρατηρήθηκε στα σάκχαρα. Αν και ορισμένοι ερευνητές αναφέρουν ότι η περιεκτικότητα των καρπών σε ολικά διαλυτά στερεά μειώνεται κατά τη αποθήκευση (Jimenez *et al.* 1996, Roberts *et al.* 2002, Cantwell *et al.* 2009), στην πλειονότητα των περιπτώσεων η ποσότητα των διαλυτών στερεών παραμένει σταθερή (Jimenez *et al.*, 1996; Triglia *et al.*, 1998; Javanmardi and Kubota, 2006; Znidarcic *et al.*, 2010).

Η τιτλοδοτούμενη οξύτητα μειώνεται με τη πρόοδο της αποθήκευσης. Στους καρπούς της Conchita η μείωση είναι εντονότερη στις πρώτες 10 ημέρες αποθήκευσης, ενώ στην Cherefino η μείωση είναι λιγότερο εμφανής, ιδιαίτερα στους παρθενοκαρπικούς καρπούς. Οι παρθενοκαρπικοί καρποί σε κάθε περίπτωση εμφανίζουν μειωμένη τιτλοδοτούμενη οξύτητα σε σχέση με τους ένσπερμους, δείχνοντας ότι η τάση των παρθενοκαρπικών καρπών για χαμηλότερη οξύτητα κατά το ώριμο κόκκινο στάδιο διατηρείται και μετασυλλεκτικά. Οι μεγάλοι καρποί παρθενοκαρπικοί καρποί είναι γνωστό ότι φέρουν λιγότερο ζελατινώδες παρέγχυμα σε σχέση με τους ένσπερμους (Rylski, 1979; Abad and Monteiro, 1989) και για το λόγο αυτό παρουσιάζουν χαμηλότερη οξύτητα, αφού οι διαφορές στην αναλογία του περικαρπίου προς το ζελατινώδες παρέγχυμα επηρεάζουν την τιτλοδοτούμενη οξύτητα (Davies and Winsor, 1969). Στους παρθενοκαρπικούς cherry καρπούς της παρούσας εργασίας

παρατηρήθηκε ύπαρξη ζελατινώδους παρεγχύματος, αλλά σε χαμηλότερη αναλογία ως προς το σύνολο του καρπού από των ένσπερμων (μετρήσεις δεν παρουσιάζονται), επηρεάζοντας επομένως την οξύτητα.

4.4. Η εμπλοκή της φωσφορυλάσης του αμύλου στο μεταβολισμό του αμύλου κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών cherry τομάτας

Τα αποτελέσματα της ημιποσοτικής PCR έδειξαν σχετικώς υψηλά μεταγραφήματα του γονιδίου στο υβρίδιο Conchita στα στάδια του 5mm και «σπασίματος» του χρώματος και στους παρθενοκαρπικούς και στους ένσπερμους καρπούς. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να ερμηνευθεί ως συνεισφορά του ενζύμου στην αποδόμηση του αμύλου κατά τα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του καρπού και στην έναρξη της ωρίμανσης ως αποτέλεσμα της κλιμακτηριακής αιχμής. Πράγματι, στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης του καρπού παρατηρείται έντονη σύνθεση αμύλου ως αποτέλεσμα της αυξημένης εισροή σακχαρόζης στον καρπό και παράλληλα σημαντική αποδόμησή του, οδηγώντας σε φωσφορυλιωμένα παράγωγα σακχάρων που χρησιμοποιούνται άμεσα στον κεντρικό μεταβολισμό για την παραγωγή ενέργειας και τη σύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων κατά την περίοδο της ταχείας ανάπτυξης του καρπού (Luengwilai and Beckles, 2009). Κατά την ωρίμανση των καρπών, γίνεται μεγάλη αποδόμηση του αμύλου (Dinar and Stevens, 1981; Ho *et al.*, 1983; Luengwilai and Beckles, 2009), κατά την οποία η συνεισφορά της φωσφορυλάσης του αμύλου δεν μπορεί να αποκλειστεί.

Τα αποτελέσματα της RT-PCR δείχνουν ότι ανιχνεύονται μεταγραφήματα του γονιδίου στον καρπό της τομάτας και στα δύο υβρίδια. Όμως, η αξιολόγηση των ευρημάτων αυτών απαιτεί περαιτέρω έρευνα, η οποία υπερβαίνει τις απαιτήσεις της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης. Σύγκριση πάντως του πλήθους των μεταγραφημάτων μεταξύ του αναπτυσσόμενου καρπού της τομάτας και εκείνου της πατάτας δείχνει ότι τα μεταγραφήματα στην τομάτα είναι τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους μικρότερες, πράγμα που πιθανόν σημαίνει ότι η φωσφορυλάση του αμύλου στην τομάτα έχει μικρή συνεισφορά στην υδρόλυση του αμύλου. Η ερμηνεία αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι παρά τις επανειλημμένες προσπάθειές μας προσδιορισμού της δραστηριότητας του ενζύμου με διαφορετικά υποστρώματα και διαφορετικές μεθόδους απομόνωσης τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά.

Πρέπει να σημειωθεί ότι σε αντίθεση με το μεταβολισμό των υδατανθράκων και κυρίως της σακχαρόζης, τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με το μεταβολισμό του αμύλου στους καρπούς της τομάτας είναι πολύ περιορισμένα και δεν έχει γίνει σχεδόν καμία ερευνητική προσπάθεια τα τελευταία 20 χρόνια για να διευκρινιστεί η δράση των αμυλασών και της φωσφορυλάσης του αμύλου στην αποδόμηση του αμύλου κατά την ανάπτυξη και ωρίμανση των καρπών. Μόνο οι έρευνες των Yelle *et al.*, (1988) και Robinson *et al.* (1988) παρέχουν δεδομένα, τα οποία όμως δεν φαίνεται να υποστηρίζονται από τα δεδομένα της παρούσας εργασίας, τουλάχιστον ως προς την δράση της φωσφορυλάσης του αμύλου. Σύμφωνα με τους ερευνητές αυτούς η φωσφορυλάση του αμύλου αποτελεί το κυρίαρχο ένζυμο που συμβάλλει στην αποδόμηση του αμύλου, με την συνεισφορά των αμυλασών να είναι πολύ χαμηλή. Όμως, τα χαμηλά επίπεδα των μεταγραφημάτων του ενζύμου όπως παρουσιάστηκαν στην παρούσα μελέτη, καθώς και η σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της β-αμυλάσης στο στάδιο των 5mm και του «σπασίματος» του χρώματος σε ένσπερμους και παρθενοκαρπικούς καρπούς των ίδιων υβριδίων (Θάνου, 2010), υποδεικνύουν ότι θα πρέπει να επανεξεταστεί η δράση της φωσφορυλάσης του αμύλου, καθώς και να γίνουν περαιτέρω έρευνες σχετικά με την αμυλολυτική δραστηριότητα στους καρπούς της τομάτας.

Συμπερασματικά, από την παρούσα εργασία προκύπτει ότι οι παρθενοκαρπικοί καρποί cherry τομάτας υπερτερούν ως προς το περιεχόμενό τους σε φρουκτόζη, γλυκόζη και ολικά διαλυτά στερεά και υστερούν ως προς τη τιτλοδοτούμενη οξύτητα στα τελικά στάδια της ωρίμανσης. Παράλληλα, εμφανίζουν τη μέγιστη συσσώρευση σακχάρων στο στάδιο του «σπασίματος» του χρώματος όταν οι ένσπερμοι καρποί συνεχίζουν να συσσωρεύουν σάκχαρα έως και το ώριμο κόκκινο στάδιο και παρουσιάζουν εντονότερη μείωση της οξύτητάς τους στα τελικά στάδια της ωρίμανσης. Οι διαφορές όμως αυτές είναι λιγότερο έντονες σε σχέση με των μεγαλόκαρπων γονότυπων, γεγονός που σε συνδυασμό με την καλή οπτική ποιότητα των παρθενοκαρπικών καρπών, αποδεικνύει ότι οι παρθενοκαρπικοί cherry καρποί τομάτας δεν υστερούν σημαντικά ποιοτικά σε σχέση με τους ένσπερμους. Διαφορές στις μεταβολές των υδατανθράκων, οξέων και διαλυτών στερών κατά την ωρίμανση και αποθήκευση των καρπών παρατηρήθηκαν και μεταξύ των γονότυπων, με την Cherelino να παρουσιάζει

εντονότερες μεταβολές, γεγονός που σχετίζεται με τη μικρότερη ικανότητα αποθήκευσης σε σχέση με την Conchita.

Αν και η μέγιστη συσσώρευση του αμύλου δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των ένσπερμων και παρθενοκαρπικών καρπών και στα δύο υβρίδια, η αποδόμησή του κατά την ωρίμανση φαίνεται να εξαρτάται από την παρουσία ή όχι του σπόρου και τον γονότυπο, αν και σε όλες τις περιπτώσεις στο ώριμο κόκκινο στάδιο εντοπίζονται αμελητέες ποσότητες αμύλου. Σε αντίθεση με την επικρατούσα άποψη ότι η φωσφορυλάση του αμύλου αποτελεί το κυριότερο ένζυμο αποδόμησης του αμύλου κατά την ωρίμανση της τομάτας όταν οι αμυλάσες συνεισφέρουν σε πολύ μικρό ποσοστό, από την παρούσα εργασία προκύπτουν ενδείξεις που συνηγορούν στο ότι η συνεισφορά του ενζύμου αυτού δεν είναι κυρίαρχη, ενώ από αντίστοιχη μεταπτυχιακή εργασία αναδεικνύεται ο ρόλος της β-αμυλάσης στην αποδόμηση του αμύλου της τομάτας, οδηγώντας στην ανάγκη πραγματοποίησης περαιτέρω έρευνας σχετικά με την αμυλολυτική δραστηριότητα στους καρπούς της τομάτας.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Abad M., Monteiro, A. A. (1989). The use of auxins for the production of greenhouse tomatoes in mild-winter conditions: A review. *Scientia Horticulturae*, **38**: 167-192.
- Arias R., Lee T.-C., Logendra L., Janes H. (2000). Correlation of lycopene measured by HPLC with the L*, a*, b* color readings of a hydroponic tomato and the relationship of maturity with color and lycopene content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 1697-1702.
- Asahira T., Hosoki T. (1977). *In vitro* studies of controlling tomato puffiness by growth regulators. *Scientia Horticulturae*, **7**: 319-328.
- Auerswald H., Peters P., Bruckner B., Krumbein A., Kuchenbuch R. (1999). Sensory analysis and instrumental measurements of short-term stored tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Postharvest Biology and Technology*, **15**: 323-334.
- Barham D., Trinder P. (1972). An improved color reagent for the determination of blood glucose by oxidase system. *Analyst*, **97**: 142-145.
- Betancourt A. L., Stevens A. M., Kader A. A. (1977) Accumulation and loss of sugars and reduced ascorbic acid in attached and detached tomato fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **102**: 721-723.
- Bisogni C. A., Armbruster G., Brecht P. E. (1976). Quality comparisons of room ripened and field ripened tomato fruits. *Journal of Food Science*, **41**: 333-338.
- Brady C. J. (1987). Fruit ripening. *Annual Reviews of Plant Physiology*, **38**: 155-178.
- Brecht P. E., Keng L., Bisogni C. A., Munger H. M. (1976). Effect of fruit portion, stage of ripeness and growth habit on chemical composition of fresh tomatoes. *Journal of Food Science*, **41**: 495.
- Cano-Medrano R., Darnell R. (1997). Sucrose metabolism and fruit growth in parthenocarpic vs seeded blueberry (*Vaccinium ashei*) fruits. *Physiologia Plantarum*, **99**: 439-446.
- Cantwell M., Nie X., Hong G. (2009). Impact of storage conditions on grape tomato quality. *Acta Horticulturae*, **877**.
- Carmi N, Salts Y., Dedicova B., Shabtai S., Barg R. (2003). Induction of parthenocarpy in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta*, **217**: 726-735.

- Casas-Diaz A. V., Hewitt J. D., Lapushner D. (1987). Effects of parthenocarpy on fruit quality in tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **112**: 634-637.
- Condit I. J. (1920). Capfigs and caprification. *California Agricultural Experimental Station Bulletin*, 319.
- Cordenunsi B. R., Lajolo F. M. (1995). Starch breakdown during banana ripening: sucrose synthase and sucrose phosphate synthase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**: 347-351.
- D' Aoust M. A., Yelle S., Nguyen-Quoc B. (1999). Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and sucrose unloading capacity of young fruit. *The Plant Cell*, **11**: 2407–2418.
- Dalal K. B., Salunkhe D. K., Boe A. A., Olson L. E. (1965). Certain physiological and biochemical changes in the developing tomato fruit (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Food Science*, **30**: 504-507.
- Dali N., Michaud D, Yelle S. (1992). Evidence for the involvement of sucrose phosphate synthase in the pathway of sucrose accumulation in sucrose accumulating tomato fruits. *Plant Physiology*, **99**: 434–438.
- Davies J. N., Hobson G. E. (1981). The constituents of tomato fruit-the influence of environment, nutrition and genotype. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **15**: 205-280.
- Davies J. N., Maw A. G. (1972). Metabolism of citric and malic acids during ripening of tomato fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **23**: 969-976.
- Davies J. N., Winsor G. W. (1969). Rapid, indirect assessment of the sugar content of tomatoes. *Annual Report of the Glasshouse Crops Research Institute for 1968*, 139p.
- Davies N. J. (1966). Changes in the non-volatile organic acids of tomato fruit during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **17**: 396-400.
- Davies N. J., Kempton J. R. (1975). Changes in the individual sugars of tomato fruit during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **26**: 1103-1110.
- De Leon-Sanchez, F. D., Pelayo-Zaldivar, C., Rivera-Cabrera, F., Ponce-Valadez, M., Avila-Alejandre, X., Fernandez, F. J., Escalona-Buendia, H. B., Perez-Flores, L. J. (2009). Effect of refrigerated storage on aroma and alcohol dehydrogenase activity in tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, **54**: 93-100.
- Dekker R. F. H., Richards N. G. (1971). Determination of starch in plant material. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **22**: 441-444.

- Dinar M., Stevens M. A. (1981). The relationship between starch accumulation and soluble solids content of tomato fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **106**: 415-418.
- Dryanovska O.A. (1975). Induced parthenocarpy with pollen irradiation with gamma rays. *C.R. Acad. Bulg. Sci.* **28**: 1273-1276.
- Ewert R. (1910). Die korrelativen einfluss des kerns beim reifeprozess der frucht. *Landw. Jahrb*, **39**: 471-486.
- Falavigna A., Badino M., Soressi G. P. (1978). Potential of the monomendelian factor *pat* in the tomato breeding for industry. *Genetica Agraria*, **32**: 159-160.
- Garcia E., Lajolo F. M. (1988). Starch transformation during banana ripening: the amylase and glucosidase behavior. *Journal of Food Science*, **53**: 1181-1186.
- Geigenberger P., Stitt M. (1993). Sucrose synthase catalyses a readily reversible reaction *in vivo* in developing potato tuber and other plant tissues. *Planta*, **189**: 329–339.
- George W., Scott L., Spiltstoesser W. (1984). Parthenocarpy in tomato. *Horticultural Reviews*, **6**: 65-84.
- Gillaspy G., Ben-David H., Gruissem W. (1993). Fruits: A developmental perspective. *The Plant Cell*, **5**: 1439-1451.
- Gomez P., Ferrer M. A., Fernandez-Trujillo J. P., Calderon A., Artes F., Egea-Cortines M., Weiss J. (2009). Structural changes, chemical composition and antioxidant activity of cherry tomato fruits (cv. Micro-Tom) stored under optimal and chilling conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**: 1543-1551.
- Goodenough W. P., Tucker A. G., Grierson D., Thomas T. (1982). Changes in color, polygalacturonase monosaccharides and organic acids during storage of tomatoes. *Phytochemistry*, **21**: 281-284.
- Grierson D., Kader A.A. (1986). Fruit ripening and quality. In: *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement* (Atherton J.G., Rudich J., ed.), pp. 241-280, Chapman and Hall, London, UK.
- Gustafson F. (1936). Inducement of fruit development by growth promoting chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **22**: 628-636.
- Gustafson F. (1939). Auxin distribution in fruits and its significance in fruit development. *American Journal of Botany*, **26**: 189-194.

- Hayata Y., Niimi Y., Inoue K., Kondo S. (2000). CPPU and BA, with and without pollination, affect set, growth and quality of muskmelon fruit (*Cucumis melo* L.). *HortScience*, **35**: 868-870.
- Hewitt J. D., Dinar M., Stevens M. A. (1982). Sink strength of fruits of two tomato genotypes differing in total fruit solids content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **107**: 896-900.
- Hewitt J. D., Stevens M. A. (1981). Growth analysis of two tomato genotypes differing in total soluble solids content. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **106**: 723-727.
- Hill S. A., ap Rees T. (1994). Fluxes of carbohydrate metabolism in ripening bananas. *Planta*, **192**: 52-60.
- Ho L. C., Sjut V., Hoad G. V. (1983). The effect of assimilate supply of fruit growth and hormone levels in tomato plants. *Plant Growth Regulation*, **1**: 155-171.
- Ho L.C. and Hewitt J.D. (1986). Fruit development. In: *The Tomato Crop: A Scientific Basis for Improvement* (Atherton J.G., Rudich J., ed.), pp. 201-239, Chapman and Hall, London, UK.
- Hobson G. E. (1967). Starch in tomato fruits. *Annual Report of the Glasshouse Crops Research Institute*, 130-134.
- Hobson G., Davies J. (1970). The tomato. In: *The Biochemistry of Fruits and Their Products, Vol. II*, (Hulme A.C., ed.), pp. 437-482, Academic Press, London, UK.
- Hobson G., Grierson D. (1993). Tomato. In: *Biochemistry of Fruit Ripening* (Seymour G.B., Taylor J.E., Tucker G.A., eds.), pp. 405-442, Chapman and Hall, London, UK.
- Husain S. E., Harrison J., ap Rees T., Shields R., Foyer C. H. (1999). The role of invertase in the carbohydrate metabolism of tomato fruit. *Acta Horticulturae*, **487**: 77-84.
- Imanishi S., Hiura I. (1977). Relationship between fruit weight and seed content in the tomato. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **46**: 211-218.
- Islam Md. S. (2001). Sucrose metabolism in domesticated cherry tomato, *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme* Alef., and purification of sucrose synthase. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, **76**: 40-47.
- Iwahori S. (1967). Auxin of tomato fruit at different stages of its development with a special reference to high temperature injuries. *Plant and Cell Physiology*, **8**: 15-22.
- Janes B. E. (1941). Some chemical differences between artificially produced parthenocarpic fruits and normal seeded fruits of tomato. *American Journal of Botany*, **28**: 639-646.

- Javanmardi J., Kubota C. (2006). Variation of lycopene, antioxidant activity, total soluble solids and weight loss of tomato during postharvest storage. *Postharvest Biology and Technology*, **41**: 151-155.
- Jimenez M., Trejo E., Cantwell M. (1996). Cherry tomato storage and quality evaluations. (cetulare.ucdavis.edu/pubveg/che96.htm).
- Jones R. A., Scott S. J. (1984). Genetic potential to improve tomato flavor in commercial F1 hybrids. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **109**: 318-321.
- Kader A. A., Morris L. L., Stevens M. A., Albright-Holton M. (1978). Composition and flavour quality of fresh market tomatoes as influenced by some postharvest handling procedures. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **103**: 6-13.
- Kader A. A., Stevens M. A., Albright-Holton M., Morris L. L., Algazi M. (1977). Effect of fruit ripeness when picked on flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **102**: 724-731.
- Kanayama, Y., Odanaka, S. (2000). Biochemistry and genetic engineering of sugar metabolism in fruit. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, **51**: 7-14.
- Klann H. M., Hall B., Bennet A. B. (1996). Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit. *Plant Physiology*, **112**: 1321-1330.
- Krumbein A., Peters P., Bruckner B. (2004). Flavour compounds and a quantitative descriptive analysis of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) of different cultivars in short-term storage. *Postharvest Biology and Technology*, **32**: 15-28.
- 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 Physiology*, **60**: 872-876.
- Lipari V., Branca F., Leonardi C. (1994). Response of parthenocarpic tomato to low temperature and auxin sprays. *Acta Horticulturae*, **366**: 79-84.
- Luengwilai K., Beckles M. D. (2009). Starch granules in tomato fruit show a complex pattern of degradation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**: 8480-8487.
- Lukyanenko A. N. (1991). Parthenocarpy in tomato. In: *Monographs on Theoretical and Applied Genetics: Genetics Improvement of Tomato* (Kallo G., ed.), pp. 167-178, Springer-Verlag, Heidelberg, Germany.
- Maisonneuve B., Philouze J. (1982). Action des basses temperatures nocturnes sur une collection varietale de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). I. Etude de la production de fruits et la valeur fecondante du pollen. *Agronomie*, **2**: 443-452.

- Malundo T., Shewfelt R., Scott J. (1995). Flavor quality of fresh tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) as affected by sugar and acid levels. *Postharvest Biology and Technology*, **6**: 103-110.
- Manning K., Maw G. A. (1975). Distribution of acid invertase in the tomato plant. *Phytochemistry*, **14**: 1965-1969.
- Mapelli S., Frova C., Torti G., Soressi G. P. (1978). Relationship between set, development and activities of growth regulators in tomato fruits. *Plant and Cell Physiology*, **19**: 1281-1288.
- Mapelli S., Torti G., Soressi G. P. (1979). Effects of GA₃ on flowering and fruit-set in a mutant of tomato. *HortScience*, **14**: 736-737.
- Marre E., Murneek A. E. (1953). Carbohydrate metabolism in the tomato fruit as affected by pollination, fertilization and growth regulators. *Plant Physiology*, **28**: 255-256.
- Martinelli F., Uratsu S. L., Reagan R. L., Chen Y., Tricoli D., Fiehn O., Rocke D. M., Gasser C. S., Dandekar A. M. (2009). Gene regulation in parthenocarpic tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, **60**: 3873-3890.
- Maul F., Sargent S. A., Sims C. A., Baldwin E. A., Balaban M. O., Huber D. J. (2000). Tomato flavor and aroma quality as affected by storage temperature. *Journal of Food Science*, **65**: 1228-1237.
- McCollum J. P., Skok J. (1960). Radiocarbon studies on the translocation of organic constituents into ripening tomato fruits. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **75**: 611-616.
- McGlasson B. (1993). Tomatoes. In: *Encyclopedia of Food Science, Food Technology, and Nutrition* (MaCrea R., Robinson R.K., and Sandlers M.J., eds.), Academic Press, New York, p. 4579.
- Miron D., Schaffer A. A. (1991). Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase and invertase activities in developing fruits of *Lycopersicon esculentum* Mill. and the sucrose-accumulating *Lycopersicon hirsutum*. Humb and Bonpl. *Plant Physiology*, **95**: 623-627.
- Monselise S. P., Varga A., Bruinsma J. (1978). Growth analysis of tomato fruit, *Lycopersicon esculentum* Mill. *Annals of Botany*, **42**: 1245-1247.
- Nadkarni M. A., Nair C. K. K., Pandey V. N., Pradhan D. S. (1992). Raffinose metabolism and novel mode of sucrose synthesis in *Corynebacterium murisepticum*. *Journal of General and Applied Microbiology*, **38**: 533-539.

- Nguyen-Quoc B., Foyer H. C. (2001). A role for 'futile cycles' involving invertase and sucrose metabolism of tomato fruit. *Journal of Experimental Botany*, **52**: 881-889.
- Nitsch J. (1970). Hormonal factors in growth and development. In: *The Biochemistry of Fruits and Their Products, Vol II* (Hulme A.C., ed.), pp. 427-472, Academic Press, London, UK.
- Nitsch J., Pratt C., Nitsch C., Shaulis N. (1960). Natural growth substances in Concord and Concord seedless grapes in relation to berry development. *American Journal of Botany*, **47**: 566-576.
- N'tchobo H. (1998). Sucrose unloading in tomato fruits. II. Subcellular distribution of acid invertase and possible roles in sucrose turnover and hexose storage in tomato fruit. PhD thesis, Laval University, pp.87-118.
- N'tchobo H., Dali N., Nguyen-Quoc B., Foyer C. H., Yelle S. (1999). Starch synthesis in tomato remains constant throughout fruit development and is dependent on sucrose supply and sucrose activity. *Journal of Experimental Botany*, **50**: 1457-1463.
- Obiadalla-Ali H., Fernie R. A., Kossmann J., Lloyd R. J. (2004). Developmental analysis of carbohydrate metabolism in tomato (*Lycopersicon esculentum* cv. Micro-Tom) fruits. *Physiologia Plantarum*, **120**: 196-204.
- Okita T., (1992). Is there an alternative for starch synthesis? *Plant Physiology*, **100**: 560-564.
- Pandolfini T., Molesini B., Spena A. (2009). Parthenocarpy in crop plants. In: *Annual Plant Reviews: Fruit Development and Seed Dispersal* (Østergaard L., ed.), pp.326-345, Blackwell Publishing, USA.
- Pék Z., Helyes L., Lugasi A. (2010). Color changes and antioxidant content of vine and postharvest-ripened tomato fruits. *HortScience*, **45**: 466-468.
- Philouze J. (1983). Parthénocarpié naturelle chez la tomate. I. Revue bibliographique. *Agronomie*, **3**: 611-620.
- Piccaglia R., Galletti G. C. (1988). Sugar and sugar alcohol determination in feedstuffs by HRGC, HPLC and enzymic analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **45**: 203-213.
- Picha D. H. (1986). Effect of harvest maturity on the final fruit composition of cherry and large-fruited cultivars. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **111**: 723-727.
- Picha D. H. (1987). Sugar and organic acid content of cherry tomato fruit at different ripening stages. *HortScience*, **22**: 94-96.

- Picken A. J. F. (1984). A review of pollination and fruit set in the tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Journal of Horticultural Science*, **59**: 1-13.
- Picken A. J. F., Grimmett M. (1986). The effects of two fruit setting agents on the yield and quality of tomato fruit in glasshouses in winter. *Journal of Horticultural Science*, **61**: 243-250.
- Pollock C. J. (1986). Fructan and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist*, **104**: 1-24.
- Preiss, J., (1991). Starch biosynthesis and its regulation. In: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology, Vol.7*, (Mifflin J, ed.), pp. 59-114, Academic Press, New York, USA.
- Ramakers C., Ruijter J. M., Lekanne-Deprez R. H., Moorman A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, **339**: 62-66.
- Raymundo L. C., Chichester, C. O., Simpson, K. L. (1976). Light dependent carotenoid synthesis in tomato fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **24**: 59-64.
- Richter E. (1972). Der gehalt an geschmackgebenden inhaltsstoffen von parthenokarpen und samenhaltigen tomaten. *Gartenbauwissenschaft*, **37**: 201-211.
- Roberts K. P., Sargent S. A., Fox A. J. (2002). Effect of storage temperature on ripening and postharvest quality of grape and mini-pear tomatoes. *Proceedings of the Florida State Horticultural Society*, **115**: 80-84.
- Roberts R. (1946). Notes on apple set and growth. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **48**: 59-62.
- Robinson N. L., Hewitt D. J., Bennett B. A. (1988). Sink Metabolism in tomato fruit. Developmental changes in carbohydrate metabolising enzymes. *Plant Physiology*, **87**: 727-730
- Rotino G. L., Acciarri N., Sabatini E., Menella G., Lo Scalzo R., Maestrelli A., Molesini B., Pandolfini T., Scalzo J., Mezzetti B., Spena A. (2005). Open field trial of genetically modified parthenocarpic tomato: seedlessness and fruit quality. *BMC Biotechnology*, **5**: 32-40.
- Ruan Y. L., Patrick J. W. (1995). The cellular pathway of post-phloem sugar transport in developing tomato fruit. *Planta*, **196**: 434-444.
- Rylski I. (1979). Fruit set and development of seeded and seedless tomato fruits under diverse regimes of temperature and pollination. *Journal of the American Society for the Horticultural Science*, **104**: 835-838.

- Sakiyama R., Stevens M. A. (1976). Organic acid accumulation in attached and detached tomato fruits. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **101**: 394-396.
- Saltveit M.E. (2005). Fruit ripening and fruit quality. In: *Tomatoes. Crop Production Science in Horticulture* (Heuvelink E., ed.), pp. 145-170, CABI Publishing, Cambridge, UK.
- Salunkhe D.K., Jadhav S.J., Yu M.H. (1974). Quality and nutritional composition of tomato fruit as influenced by certain biochemical and physiological changes. *Qualitas Plantarum*, **24**: 85.
- Sapers G. M., Philips J.G., Panasiuk O., Carre J., Stoner A K., Barksdale T. (1978). Factors affecting the acidity of tomatoes. *HortScience*, **13**: 187.
- Sato T., Iwatsubo T., Tkahashi M., Nakagawa H., Ogura N., Mori H. (1993). Intercellular localization of acid invertase in tomato fruit and molecular cloning of cDNA for the enzyme. *Plant and Cell Physiology*, **34**: 263–269.
- Schwabe W. W., Mills J. J. (1981). Hormones and parthenocarp fruit set: a literature survey. *Horticultural Abstracts*, **51**: 661-699.
- Simandle P. A., Brogdon J. L., Sweeney J. P., Mobley E. O., Davis D. W. (1966). Quality of six tomato varieties as affected by some compositional factors. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science*, **89**: 532.
- Stevens M. A. (1972). Citrate and malate concentrations in tomato fruits: genetic control and maturational effects. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **97**: 655-658.
- Stevens M. A., Kader A. A., Albright-Holton M. (1977b). Intercultivar variation in composition of locular and pericarp portions of fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **102**: 689-692.
- Stevens M. A., Kader A. A., Albright-Holton M., Algazi M. (1977a). Genotypic variation for flavor and composition in fresh market tomatoes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **102**: 680-689.
- Stevens M. A., Rudich, J. (1978). Genetic potential for overcoming physiological limitation on adaptability, yield and quality in the tomato. *HortScience*, **13**: 673-678.
- Sturtevant E. L. (1889). Seedless fruits. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, **1**: 141-185.
- Sun J., Loboda T., Sung S. S., Black C. C. (1992). Sucrose synthase in wild tomato, *Lycopersicon chmielewskii*, and tomato fruit sink strength *Plant Physiology*, **98**: 1163-1169.

- Sweetlove L. J., Burrell M. M., ap Rees T. (1996). Starch synthesis in tubers of transgenic potato (*Solanum tuberosum*) with increased ADPglucose pyrophosphorylase. *Biochemistry Journal*, **320**: 493–498.
- Sweetlove L. J., Muller-Rober B., Willmitzer L., Hill S. A. (1999). The contribution of adenosine 5'-diphosphoglucose pyrophosphorylase to the control of starch synthesis in potato tubers. *Planta*, **209**: 330–337.
- Tanaka A., Fujita K., Kikuchi K. (1974a). Nutro-physiological studies on the tomato plant. II. Translocation of the photosynthates. *Soil Science and Plant Nutrition*, **20**: 57-68.
- Tanaka A., Kikuchi K. (1974b). Nutro-physiological studies on the tomato plant. III. Photosynthetic rate of individual levels in relation to the dry matter production of plants. *Soil Science and Plant Nutrition*, **20**: 73-83.
- Toor R. K., Savage G. P. (2006). Changes in major antioxidant components of tomatoes during post-harvest storage. *Food Chemistry*, **99**: 724-727.
- Triglia A., La Malfa G., Musumeci F., Leonardi C., Scordino A. (1998). Delayed luminescence as an indicator of tomato fruit quality. *Journal of Food Science*, **63**: 512-515.
- Tucker G. A. (1993). Introduction. In: *Biochemistry of Fruit Ripening, 1st edn* (Seymour G.B., Taylor J.E., Tucker G.A., eds.), pp. 1-51, Chapman & Hall, London, UK.
- USDA (1976). United States standards for grades of fresh tomatoes. US Department of Agriculture, Agr. Mktg. Serv., Washington, D.C., pp. 10.
- Varga A., Bruinsma J. (1986). Tomato. In: *CRC Handbook of Fruit Set and Development* (Monselise S.P., ed.), pp. 461-480, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Varga A., Bruinsma J. 1976. Roles of seeds and auxins in tomato fruit growth, *Z. Pflanzenphysiol.*, **80**: 95-104.
- Varoquaux F., Blanvillain R., Delseny M., Gallois P. (2000). Less is better: new approaches for seedless fruit production. *Trends in Biotechnology*, **18**: 233-242.
- Viola R. (1996). Hexose metabolism in discs excised from developing potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers: estimation of fluxes *in vivo* and evidence that fructokinase catalyses a near rate-limiting reaction. *Planta*, **198**: 186–196.
- Walker A. J., Ho L. C. (1977). Carbon translocation in the tomato carbon import and fruit growth. *Annals of Botany*, **41**: 813-823.
- Walker A. J., Ho L. C., Baker D. A. (1978). Carbon translocation in the tomato: pathway and the rate of translocation. *Annals of Botany*, **42**: 901–909.

- Winsor G. W., Davies J. N., Massey D. M. (1962a). Composition of tomato fruit - III. Juices from whole fruit and locules at different stages of ripeness. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **13**: 108-115.
- Winsor G. W., Davies J. N., Massey D. M. (1962b). Composition of tomato fruit. - IV. Changes in some constituents of the fruit walls during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **13**: 141-145.
- Yelle S., Hewitt J. D., Robinson N. L., Damon S, Bennet A. B. (1988). Sink metabolism in tomato fruit. III. Analysis of carbohydrate assimilation in a wild species. *Plant Physiology*, **87**: 737-740.
- Young T. E., Juvik J. A., Sullivan J. G. (1993). Accumulation of the components of total solids in ripening fruits of tomato. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, **118**: 286-292.
- Znidarcic D., Ban D., Oplanic M., Karic L., Pozrl T. (2010). Influence of postharvest temperatures on physicochemical quality of tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Journal of Food Agriculture and Environment*, **8**: 21-25.
- Αρναούτης Μ. (2006). Μελέτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών της τομάτας τύπου «cherry» (cv. Sakura F1) κατά την αποθήκευση σε τροποποιημένη ή μη ατμόσφαιρα, σε δυο θερμοκρασίες. Πτυχιακή Μελέτη, Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών Γ.Π.Α.
- Θάνου Μ. (2010). Ανοσοεντοπισμός και δραστηριότητα της β-αμυλάσης σε παρθενοκαρπικούς και μη καρπούς τομάτας κατά τη διάρκεια της ανάπτυξής τους. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Εργαστήριο Φυσιολογίας και Μορφολογίας Φυτών, Γ.Π.Α.
- Μακρογιάννη Δ. (2010). Συγκριτική μελέτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών και της μετασυλλεκτικής συμπεριφοράς ένσπερμων και άσπερμων καρπών τομάτας τύπου “cherry”. Μεταπτυχιακή Διατριβή, Εργαστήριο Κηπευτικών Γ.Π.Α.
- Ολύμπιος, Μ. Χ., (2001). Η τεχνική της καλλιέργειας των κηπευτικών στα θερμοκήπια. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Παρασκευάς Γ. (2007). Μελέτη των ποιοτικών χαρακτηριστικών της τομάτας τύπου «cherry» (cv. Cherelino F1) κατά την αποθήκευση σε τροποποιημένη ή μη ατμόσφαιρα σε δυο θερμοκρασίες. Πτυχιακή Μελέτη, Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιεργειών Γ.Π.Α.