

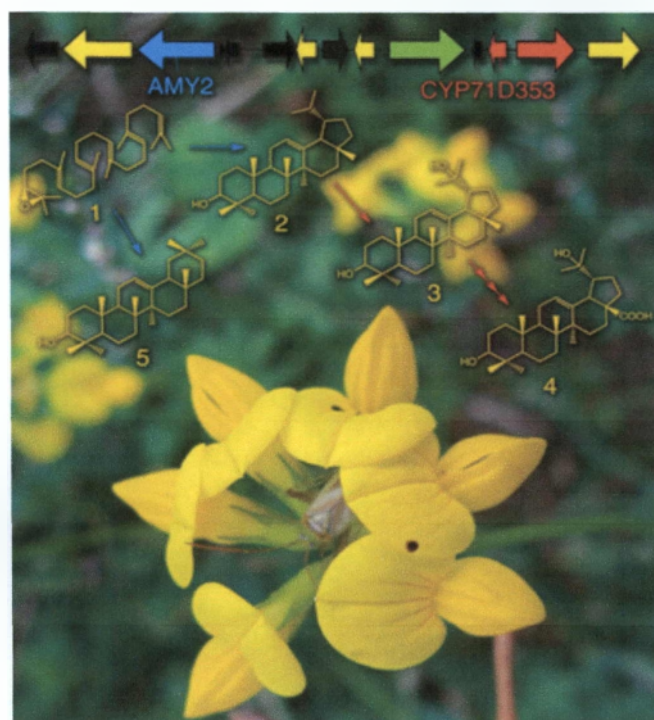
Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πελοποννήσου

Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας

Τμήμα Φυτικής Παράγωγης

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ: «Η ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΓΙΑ ΤΗ ΒΙΟΣΥΝΘΕΣΗ ΤΩΝ
ΤΡΙΤΕΡΠΕΝΟΕΙΔΩΝ ΣΕ ΦΥΤΑ ΤΟΜΑΤΑΣ»



ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΥ Ν. ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2013

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Πάνε πολλά χρόνια από την μέρα που είχα την πρώτη επαφή με το αντικείμενο της γεωπονικής επιστήμης. Όντας άπειρη μπήκα στη διαδικασία να αναγνωρίσω την μορφολογία και την ανατομία των φυτών, και μέσω αυτής συνειδητοποίησα έναν πιο ενδιαφέρον κλάδο που μου έδωσε το έναυσμα να συνεχίσω.

Υπήρξαν αρκετές φορές που συνάντησα δυσκολίες και εμπόδια όμως ήμουν διατεθειμένη να κατακτήσω τον στόχο μου. Παρ'όλα αυτά οι όποιες δυσκολίες έγιναν κινητήριες δυνάμεις που με βοήθησαν σε όλους του τομείς της ζωής μου.

Αφού ολοκλήρωσα την πτυχιακή μου εργασία και αφήνω πίσω μου πολλές φοιτητικές αναμνήσεις, καταλαβαίνω ότι όπως ένα φυτό όταν τον φροντίζεις αποδίδει καρπούς έτσι και η διαδικασία της φοίτησης μου προσέφερε γνώσεις ώστε να μπορώ να ανταπεξέλθω στις μετέπειτα απαιτήσεις του εργασιακού τομέα.

Χωρίς την συμβολή ορισμένων προσώπων, η επίτευξη του στόχου θα ήταν πολύ δυσκολότερη γι'αυτό είναι επιθυμία μου να τους ευχαριστήσω και να δείξω την ευγνωμοσύνη μου. Πρώτα απ'όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τον αδερφό μου για την υπομονή και την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια, αναγνωρίζοντας τους κόπους και την αγωνία τους αφού ήταν εκείνοι που με ωθούσαν διαρκώς να έχω πίστη στον εαυτό μου. Εν συνεχεία ευχαριστώ και εκτιμώ την αμέριστη παρότρυνση και καθοδήγηση του επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Κ Δελή καθώς επίσης και τα υπόλοιπα μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κ. Κ Νυφάκο και τον κ. Α Κώτσιρα.

Τέλος, ευχαριστώ όλους όσους μου στάθηκαν όλα αυτά τα χρόνια και με βοήθησαν ο καθένας με τον δικό του τρόπο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Κεφάλαιο 1:Εισαγωγή.....	4
1.1 Δευτερογενείς Μεταβολίτες.....	4
Κεφάλαιο 2: Τερπένια και Τερπενοειδή.....	5
2.1.1 Βιοσύνθεση Τερπενίων.....	5
2.1.2 Βιοσύνθεση Τριτερπενοειδών.....	7
2.1.3 OSCs- Κυκλάσες του Οξειδοσκουαλενίου.....	9
2.1.4 Σαπωνίνες και Κυτοχρώματα(CYPs).....	15
2.1.5 Η Βιοσύνθεση των Τριτερπενοειδών στα φυτά.....	18
Κεφάλαιο 3: Η Καλλιέργεια της Τομάτας.....	20
3.1.1 Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	20
3.1.2 Καλλιέργεια και Περιποίηση .Αρδευση.....	21
3.1.3 Λίπανση	24
3.1.4 Κλάδεμα και Κορυφολόγημα	25
3.1.5 Υποστύλωση.....	26
3.1.6 Πολλαπλασιασμός – Παραγωγή φυταρίων.....	27
Κεφάλαιο 4: Σκοπός της Πτυχιακής	30
Κεφάλαιο 5:Αποτελέσματα.....	31
Κεφάλαιο 6: Συζήτηση- Συμπεράσματα.....	34
Κεφάλαιο 7:Βιβλιογραφία.....	35

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Δευτερογενείς μεταβολίτες

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες γνωστοί και ως φυσικά προϊόντα (Zwenger et al., 2008) απαρτίζουν μία μεγάλη ομάδα οργανικών ενώσεων που παράγουν τα φυτά. Ο ρόλος των δευτερογενών μεταβολιτών δεν είναι πλήρως καθορισμένος. Έχει βρεθεί ότι συμμετέχουν σε ποικίλες λειτουργίες όπως η άμυνα του φυτού έναντι παθογόνων μικροβίων και θηρευτών, η αντίδραση σε καταπονήσεις (Keeling et al., 2006), η επικοινωνία μεταξύ παρακείμενων φυτών και η έλξη εντόμων που βοηθούν στην αναπαραγωγή των φυτών. Ως δευτερογενείς μεταβολίτες ορίζονται ενώσεις μικρού σχετικά μοριακού βάρους με περιορισμένη κατανομή στο φυτικό βασίλειο και που δεν παίζουν πρωταρχικό ρόλο στην ανάπτυξη και αύξηση του φυτού. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες διαφέρουν από τους πρωτογενείς μεταβολίτες καθώς, εκτός από το γεγονός ότι δεν είναι ομοιόμορφα κατανεμημένοι στα φυτικά είδη, επίσης δεν έχουν κάποιο αναγνωρισμένο ρόλο στις διαδικασίες της φωτοσύνθεσης, αναπνοής, μεταφοράς διαλυμένων ουσιών, αφομοίωσης θρεπτικών ουσιών και διαφοροποίησης (Τσεκος Ι., 2004). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες προέρχονται από ενδιάμεσες ενώσεις του πρωτογενούς μεταβολισμού, παράγονται συνήθως σε επιμέρους ιστούς και σε συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια. Η παραγωγή των δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί μία συντονισμένη και ολοκληρωμένη δραστηριότητα των φυτικών κυττάρων, η οποία συνδέεται στενά με την ικανότητα διαφοροποίησης των κυττάρων(Καραμπουρνιώτης Γ., 2003).

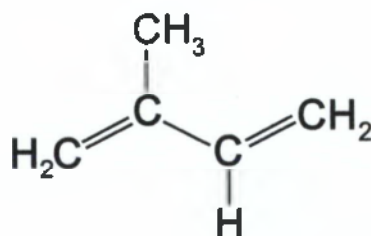
Οι δευτερογενείς μεταβολίτες κατατάσσονται στις παρακάτω ομάδες ανάλογα με το πρόδρομο μόριο του πρωτογενούς μεταβολισμού από το οποίο προέρχονται και τον περαιτέρω μεταβολισμό του:

- 1) Ενώσεις που περιέχουν άζωτο (N): Αυτές οι ενώσεις προέρχονται από αμινοξέα και είναι αλκαλοειδή, μεταλαΐνες, αμίνες, κυανογόνα γλυκοζίδια, θειογλυκοζίτες, αμυντικές πρωτεΐνες και αμίνες.
- 2) Φαινυλπροπανοειδή: Συντίθενται από το αρωματικό αμινοξύ φαινυλαλανίνη το οποίο προέρχεται από το μονοπάτι του σισκεμικού. Η φαινυλαλανίνη μεταβολίζεται αρχικά σε κινναμικό οξύ και στη συνέχεια παράγονται τα φαινυλπροπανοειδή.
- 3) Βενζενοειδή: Παράγονται από την φαινυλαλανίνη με αφαίρεση δύο ατόμων άνθρακα(Orlova I et al., 2006).

- 4) Φλαβονοειδή: Παράγονται από την φαινυλαλανίνη και από το μηλονυλο-CoA (Μιχάηλ Ηλ., 2007).
- 5) Τερπένια: Παράγονται ύστερα από σταδιακή συμπύκνωση μορίων ακετυλο-CoA μέσω της οδού βιοσύνθεσης του μεβαλονικού.

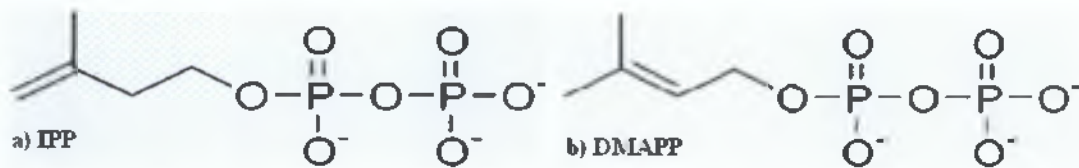
2.1.1.Βιοσύνθεση τερπενίων

Έχουν βρεθεί πάνω από 25.000 είδη τερπενίων και τερπενοειδών. Παρόλο που η παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών είναι συνδεδεμένη με τους φυτικούς οργανισμούς υπάρχουν και άλλων ειδών οργανισμοί στους οποίους απαντάται, όπως στον μύκητα *Hypericum perforatum* ο οποίος συνθέτει δύο είδη τερπενοειδών (Kusari et al., 2008). Εκτός από τη συμμετοχή των τερπενίων στην απάντηση σε καταπονήσεις, στην έλξη των επικονιαστών και στην άμυνα απέναντι σε έντομα και φυτοφάγα ζώα, τα τερπένια μπορούν να επηρεάσουν την έκφραση των γονιδίων γειτονικών φυτών από αυτό που τα παράγει. Ακόμη, τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον πολλών ερευνητών έχει στραφεί στο ρόλο που έχουν τα τερπένια στην ατμόσφαιρα της γης. Έχει βρεθεί ότι οι παγκόσμιες εκπομπές ισοπρενίου, δηλαδή του πρόδρομου μορίου των τερπενίων, ανέρχονται στα 500 Tg το χρόνο(Guenther et al., 2006). Το ισοπρένιο είναι ένα μόριο που αποτελείται από υδρογόνο και άνθρακα. Τέτοια μόρια ισοπρενίου περιλαμβάνονται στα τερπένια, ενώ στα τερπενοειδή έχει προστεθεί και οξυγόνο στο ισοπρένιο(Zwenger et al., 2008) (Σχήμα 1).



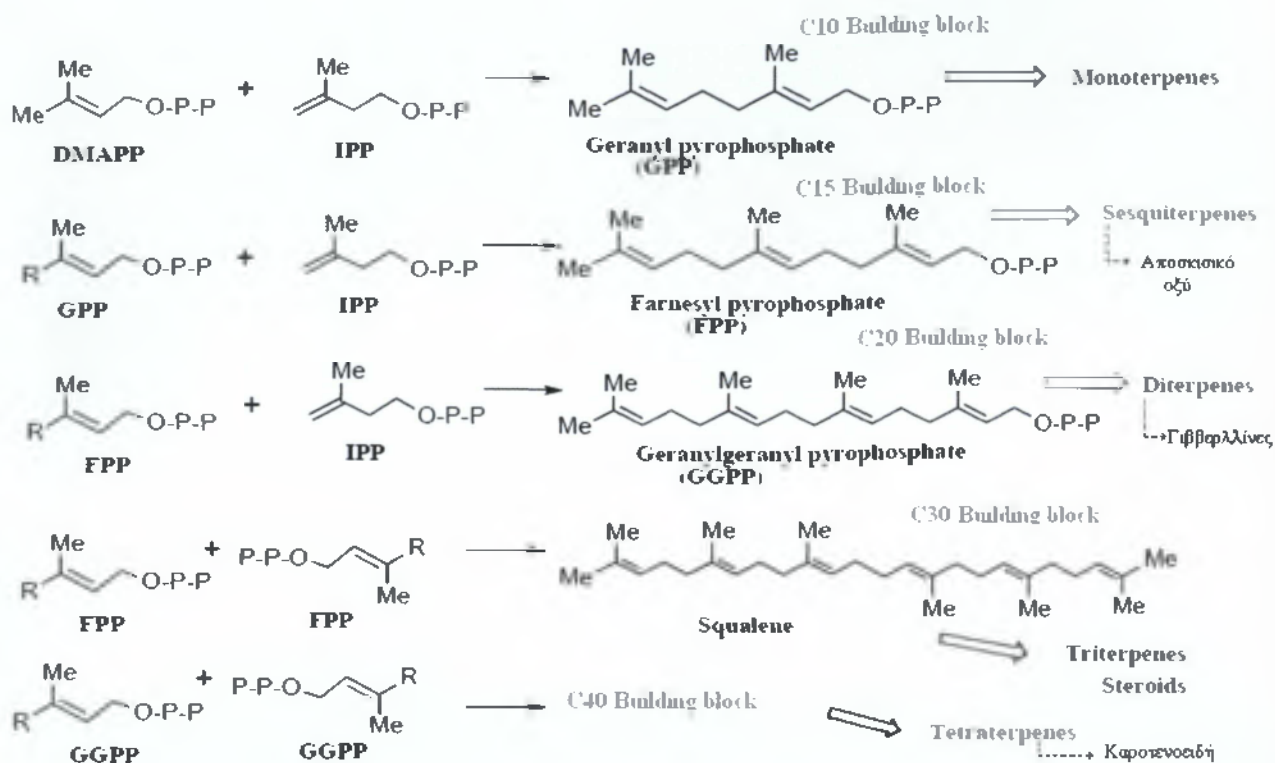
Σχήμα 1: Ισοπρένιο.

Τα τερπένια είναι πολυμερή του ισοπρενίου και συγκεκριμένα της ενεργοποιημένης μορφής του που είναι το πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP). Το IPP αποτελείται από 5 άτομα άνθρακα (C5) και η ισομερής του μορφή είναι το πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP), (Σχήμα 2).



Σχήμα 2: α) πυροφωσφορικό ισοπεντενύλιο (IPP). β) πυροφωσφορικό διμεθυλοαλύλιο (DMAPP). Την αντίδραση ισομερίωσης μεταξύ των IPP και DMAPP καταλύει το ένζυμο ισοπεντενυλο-πυροφωσφορική ισομεράση (isopentenyl pyrophosphate isomerase).

Μία και μόνο μονάδα ισοπρενίου αντιπροσωπεύει την δομική μονάδα των τερπενίων, τα ημιτερπένια (C5). Το IPP συμπυκνώνεται με το DMAPP για να σχηματιστεί το πυροφωσφορικό γερανύλιο (GPP) το οποίο είναι πρόδρομος ένωση των μονοτερπενίων (C10). Όταν το GPP συμπυκνώνεται με IPP παράγεται πυροφωσφορικό φαρνεξύλιο (FPP) το οποίο είναι η πρόδρομος ένωση των σεσκιτερπενίων (C15). Όταν συμπυκνωθούν το FPP και το IPP παράγεται πυροφωσφορικό γερανυλο-γερανύλιο το οποίο είναι η πρόδρομος ένωση των διτερπενίων (C20). Η συμπύκνωση δύο FPP με την δράση του ενζύμου συνθάση του σκουαλενίου (SQS) οδηγεί στην παραγωγή του σκουαλενίου το οποίο είναι η πρόδρομος ένωση των τριτερπενοειδών (C30). Ενώ η συμπύκνωση δύο πυροφωσφορικών γερανυλο-γερανυλίων έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή της φυτοΐνης η οποία είναι πρόδρομος ένωση των τετρατερπενίων (C40) (Τσέκος Ι. 2004; Guenther et al., 2004; Phillipps et al., 2007) (Σχήμα 3).



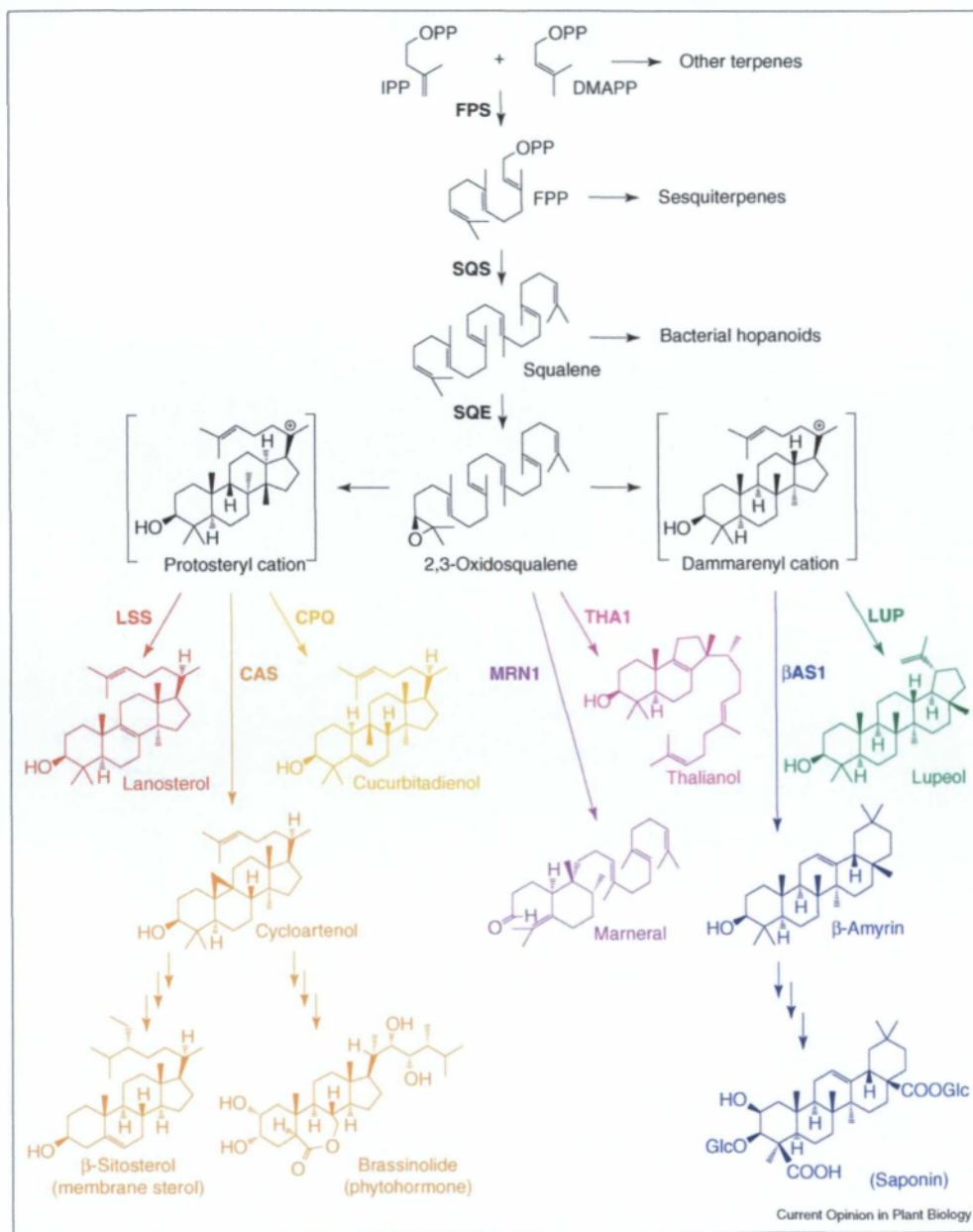
Σχήμα 3: Βιοσύνθεση τερπενίων και οι κυριότερες υποκλάσεις τους.

2.1.2.Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών

Προς το παρόν δεν έχει μελετηθεί πλήρως η βιολογική σημασία των τριτερπενοειδών στους φυτικούς οργανισμούς. Αρκετά φυτά συσσωρεύουν ποσότητες τριτερπενοειδών σαπωνίνων στους ιστούς τους και κυρίως στις ρίζες τους (Hostettmann et al., 1991). Έχουν μελετηθεί γλυκοσίδια τριτερπενίων τα οποία παρουσιάζουν αντιμυκητιστακή δράση (Hostettmann et al., 1991, Price et al., 1987, Papadopoulos et al., 1991), ενώ κάποια από αυτά έχουν και επιπλέον δράση όπως για παράδειγμα οι σαπωνίνες του φασιολιού οι οποίες φαίνεται να ελέγχουν τον γεωτροπισμό και να συμμετέχουν στη σύνθεση σελουλόζης (cellulose) (Ohana et al., 1998, Rahman A. et al., 2001).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, πρόδρομο μόριο για τη σύνθεση τριτερπενοειδών είναι το σκουαλένιο. Το σκουαλένιο μετατρέπεται σε 2,3 οξειδοσκουαλένιο με τη δράση του ενζύμου εποξειδάση του σκουαλενίου (SQE). Στη συνέχεια οι κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (OSCs) μετατρέπουν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο σε ενδιάμεσα προϊόντα για την παραγωγή στερολών, στεροειδών

και τριτερπενοειδών σαπωνίνων (Σχήμα 4). Η κυκλοποίηση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου είναι το σημείο-κλειδί στα φυτά για τη μεταβίβαση από τον πρωτογενή μεταβολισμό στο δευτερογενή μεταβολισμό (Iturbe-Ospina et al., 2003). Η β-αμυρίνη και η λουπεόλη είναι από τις πιο γνωστές τριτερπενοειδείς αλκοόλες.



Σχήμα 4: Βιοσύνθεση τριτερπενοειδών [8].

2.1.3. OSCs- κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου

Οι περισσότερες μελέτες για να χαρακτηριστούν οι OSCs των φυτών έχουν γίνει σε αγγειόσπερμα. Στους ευκαρυώτες οι κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου μετατρέπουν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο σε κυκλικές τριτερπενοειδείς αλκοόλες το πολύ έξι δακτυλίους. Τα κυκλικά τριτερπενοειδή συντίθενται ύστερα από πρωτονίωση και άνοιγμα του δακτυλίου του οξιρανίου του 2,3 οξειδοσκουαλενίου, κυκλοποίηση, ανακατανομή της ανθρακικής αλυσίδας και τελική αποπρωτονίωση ή ενυδάτωση του μορίου. Αντίθετα, στους προκαρυώτες τα κυκλικά τριτερπενοειδή συντίθενται ύστερα από κυκλοποίηση του σκουαλενίου από τις κυκλάσες του σκουαλενίου, ένζυμα τα οποία δεν βρίσκονται στα αγγειόσπερμα (Sawai et al., 2005). Τα φυτά βιοσυνθέτουν διάφορα είδη τριτερπενοειδών και κωδικοποιούν για πολλές OSCs. Χαρακτηριστικά στον πίνακα 1 αναφέρονται κάποιοι οργανισμοί και ο αριθμός των OSCs που κωδικοποιεί το γένωμά τους.

Οργανισμός	Αριθμός OSCs
<i>Arabidopsis thaliana</i>	13
<i>Oryza sativa</i>	9
<i>Lotus japonicus</i>	8

Πίνακας 1

Στα φυτά, οι OSCs κατά την βιοσύνθεση των κυκλικών τριτερπενοειδών από το 2,3 οξειδοσκουαλένιο σχηματίζουν κυρίως δύο ενδιάμεσα κατιόντα, το ενδιάμεσο κατιόν του προτεστερυλίου (protosteryl cation) με διαμόρφωση ανάκλιντρον-λουτήρα-ανάκλιντρον ή το ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου (dammarenyl cation) με διαμόρφωση ανάκλιντρον-ανάκλιντρον-ανάκλιντρον. Τα τελευταία χρόνια, με μελέτες του γονιδιώματος του *Arabidopsis* βρέθηκαν δύο νέα ένζυμα, το *THA1* και το *MRN1*, τα οποία έχουν το 2,3 οξειδοσκουαλένιο ως υπόστρωμα και προωθούν τον σχηματισμό ανθρακικών δομών οι οποίες δεν είναι πλήρως κυκλοποιημένες. Το *THA1* συμμετέχει στο σχηματισμό της τρικυκλικής αλκοόλης θαλιανόλη και το *MRN1* συμμετέχει στο σχηματισμό της μονοκυκλικής αλδεΐδης μαρνεράλη (Πίνακας 1).

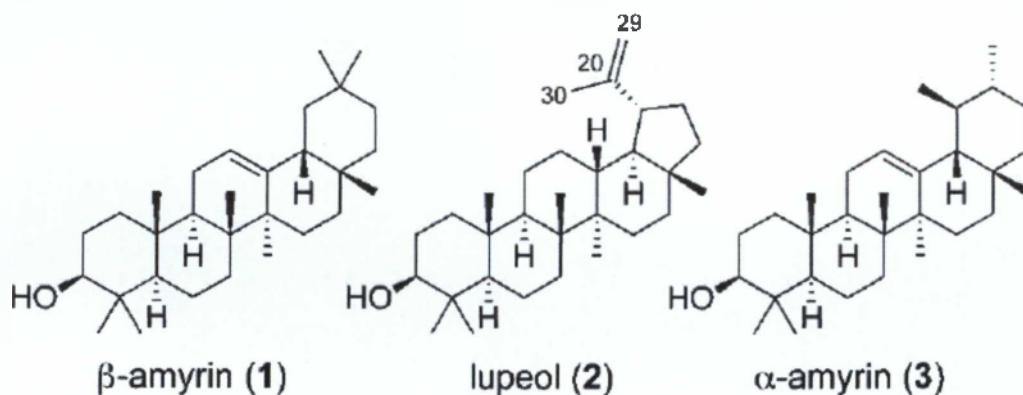
Ως αναφορά την πορεία της βιοσύνθεσης τριτερπενοειδών μετά τον σχηματισμό του κατιόντος του προτεστερυλίου τα ένζυμα που συμμετέχουν σε αυτή την πορεία παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία μεταξύ τους. Η συνθάση της

κυκλοαρτενόλης (CAS) είναι το κυριότερο ένζυμο αυτής της ομάδας OSCs το οποίο μετατρέπει το κατιόν του προτεστερυλίου σε κυκλοαρτενόλη. Η κυκλοαρτενόλη είναι πρόδρομη ένωση για την παραγωγή μεμβρανικών στερολών και φυτοορμονών. Ομόλογες συνθάσες της CAS των φυτών έχουν βρεθεί σε βακτήρια και στην αμοιβάδα. Η *συνθάση της λανοστερόλης (LSS)* μοιάζει πολύ με την CAS και καταλύει τον σχηματισμό της λανοστερόλης από το κατιόν του προτεστερυλίου. Η LSS απαντάται σε αρκετά γένη φυτών, αλλά όχι τόσο συχνά όσο η CAS, και το προϊόν της, δηλαδή η λανοστερόλη, έχει βρεθεί εκτός των φυτών σε ζώα, μύκητες και στην οικογένεια των *trypanosomatids*. Ακόμα, υπάρχουν αρκετά ένζυμα τα οποία έχουν προκύψει κατά την εξέλιξη με διπλασιασμό και διαφοροποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί για την CAS. Ένα τέτοιο ένζυμο είναι και η *συνθάση της κουρκουβιταδιενόλης (CPQ)*. Η εξελικτική απόκλιση των φυτικών συνθασών LSS και CPQ από την αρχική CAS είναι μικρή.

Οι OSCs που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση τριτερπενοειδών αλκοολών μέσω του κατιόντος του νταμαρενυλίου, σε αντίθεση με τα παραπάνω, δεν παρουσιάζουν πολύ μεγάλη ομοιότητα μεταξύ τους. Αυτή η κατηγορία OSCs απαντάται μόνο σε φυτά που έχουν αγγειακό σύστημα, στα τραχεόφυτα. Οι κυριότερες OSCs που χρησιμοποιούν το ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου για την βιοσύνθεση τριτερπενοειδών είναι η *συνθάση της λουπεόλης* και η *συνθάση της β-αμυρίνης*. Επίσης σε αυτή την κατηγορία OSCs ανήκουν και πολυλειτουργικές συνθάσες οι οποίες παράγουν μείγματα προϊόντων. Η συνθάση της λουπεόλης καταλύει την κυκλοποίηση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου στο ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου και στη συνέχεια σε λουπεόλη. Η πορεία σύνθεσης της λουπεόλης αναφέρεται πιο αναλυτικά παρακάτω. Η συνθάση της β-αμυρίνης καταλύει και αυτή την κυκλοποίηση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου προς το ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου και αφού μοιραστεί τα βήματα του μονοπατιού της σύνθεσης της λουπεόλης έως και την δημιουργία του λουπιλ-κατιόντος (lupyl cation), στη συνέχεια επιτρέπει την περαιτέρω διαμόρφωση της ανθρακικής αλυσίδας και τη δημιουργία ανθρακικών δακτυλίων ώστε μετά από αποπρωτονίωση να δημιουργηθεί τελικά η β-αμυρίνη. Εκτός από την λουπεόλη και την β-αμυρίνη μία ακόμα γνωστή τριτερπενοειδής αλκοόλη που παράγεται από το ενδιάμεσο κατιόν του νταμαρενυλίου είναι η α-αμυρίνη (Σχήμα 5).

Τα τελευταία χρόνια μελετηθήκαν οι λειτουργίες διάφορων OSCs που συνθέτουν τριτερπενοειδή ύστερα από κλωνοποίηση και έκφρασή τους σε κύτταρα

ζύμης (Haralampidis et al., 2001). Μεταξύ αυτών μελετήθηκε η συνθάση της λουπεόλης από την *Olea europea* (ελιά) [Shibuya et al., 1991], το *Taraxacum officinale* (Shibuya et al., 1991) και το *Arabidopsis thaliana* (Herrera J. et al., 1998). Ακόμη, χαρακτηρίστηκαν και πολυλειτουργικές OCSs από το φασόλι και το *A. thaliana* οι οποίες συνθέτουν α-αμυρίνη και β-αμυρίνη η πρώτη (Morita et al., 2000) και α-αμυρίνη, β-αμυρίνη και λουπεόλη η δεύτερη (Kushiro et al., 2000; Husselstein-Muller et al., 2001). Η μελέτη της έκφρασης γονιδίων OSCs όπως της συνθάσης της λουπεόλης, της συνθάσης της α-αμυρίνης και της συνθάσης της β-αμυρίνης στα φυτικά μοντέλα *L. japonicus*, *M. Truncatula* και *Pisum sativum* δείχνει ότι αυτά τα γονίδια εκφράζονται διαφορετικά στους διάφορους ιστούς καθώς και κατά τον σχηματισμό των φυματίων υποδεικνύοντας ότι αυτά τα ένζυμα μπορεί να έχουν διάφορους ρόλους στην φυσιολογία και την ανάπτυξη του φυτού (Iturbe-Ormaetxe I. et al., 2003).



Σχήμα 5: Τα τριτερπενοειδή β-αμυρίνη (1), λουπεόλη (2) και α-αμυρίνη (3) στο *Arabidopsis thaliana* [13].

Η β-αμυρίνη, η λουπεόλη και η α-αμυρίνη είναι σαπωνίνες (Vincken et al., 2006). Οι σαπωνίνες είναι γλυκοσίδια τριτερπενίων (triterpene glycosides) και ένα παράδειγμα αυτής της κατηγορίας δευτερογενών μεταβολιτών αποτελεί η αντιμυκητιασική αβενακίνη η οποία βρίσκεται στις ρίζες του φυτού της βρώμης *Avena strigosa* (Qi X. et al., 2004, Papadopoulou K. et al., 1999). Οι σαπωνίνες ονομάστηκαν έτσι γιατί όταν αναμειχτούν με νερό παράγεται αφρός όπως γίνεται με το σαπούνι (Vincken J. et al., 2006). Τα τριτερπενοειδή και οι τριτερπενοειδείς σαπωνίνες θεωρείται ότι συμμετέχουν στο σύστημα άμυνας του φυτού απέναντι στα παθογόνα μικρόβια και στα έντομα. Επιπρόσθετα, οι σαπωνίνες είναι σημαντικές και

για τον άνθρωπο καθώς χρησιμοποιούνται στα φάρμακα, στα γλυκαντικά, στα απορρυπαντικά και στα καλλυντικά (Hayashi H.et al., 2004).

Characterized plant oxidoqualene cyclases.			
Synthase	Plant	Name (Genbank accession) ^a	Products ^b (product identification method [reference(s)])
Cycloartenol	<i>Abies magnifica</i>	CAS1 (AA044088)	Cycloartenol (NMR, GC [7])
Cycloartenol	<i>A. thaliana</i>	A22g07050/CAS1 (P30605)	Cycloartenol (NMR, IR, MS [4])
Cycloartenol	<i>B. platyphylla</i>	BPX1 (BAB3068) BPX2 (BAB3068)	Cycloartenol (LC-MS [53])
Cycloartenol	<i>C. speciosus</i>	CSOSC1 (BAB3253)	Cycloartenol (LC-MS [34])
Cycloartenol	<i>C. pepo</i>	CPX (BAD34644)	Cycloartenol (LC-MS [17 ^{**}])
Cycloartenol	<i>G. glabra</i>	GqCAS1 (BAA76902)	Cycloartenol [54]
Cycloartenol	<i>L. cylindrica</i>	LcCAS1 (BAA8268)	Cycloartenol [55]
Cycloartenol	<i>P. ginseng</i>	PNX (BAA33460)	Cycloartenol (HPLC [56])
Cycloartenol	<i>P. sativum</i>	CASPEA (BAA20533)	Cycloartenol [57]
Lanosterol	<i>A. thaliana</i>	A23g45130/LSS1/PEN7	Lanosterol (GC-MS, NMR [12 ^{**}])
Cucurbitadienol	<i>C. pepo</i>	CPO (BAD34645)	Cucurbitadienol (LC-MS, NMR [17 ^{**}])
β -Amyrin	<i>Avena sativosa</i>	ASBAS1 (CAC84558)	β -Amyrin (Genetic analysis, HPLC [19])
β -Amyrin	<i>B. platyphylla</i>	BPY (BAB3068)	β -Amyrin (LC-MS [53])
β -Amyrin	<i>Euphorbia tirucalli</i>	EIAS (BAE43842)	β -Amyrin (GC-MS, NMR [58])
β -Amyrin	<i>G. glabra</i>	GqBAS1 (BAA89815)	β -Amyrin (LC-MS [59])
β -Amyrin	<i>M. truncatula</i>	MtAMY1/BAS1 (CAD23247)	β -Amyrin (GC-MS, NMR [23]; HPLC [24])
β -Amyrin	<i>P. ginseng</i>	PNY1 (BAA33461) PNY2 (BAA33722)	β -Amyrin (HPLC, MS, NMR [56,60])
β -Amyrin	<i>P. sativum</i>	PSY (BAA97598)	β -Amyrin (LC-MS, GC-MS, NMR [32])
Lupeol	<i>B. platyphylla</i>	BPW (BAB3067)	Lupeol (LC-MS [53])
Lupeol	<i>G. glabra</i>	GqLUS1 (BAD06587)	Lupeol (LC-MS [28 ^{**}])
Lupeol	<i>O. europaea</i>	OEW (BAA89930)	Lupeol (LC-MS, NMR [29])
Lupeol	<i>T. officinale</i>	TRW (BAA89932)	Lupeol (LC-MS, NMR [29])
Thalianol	<i>A. thaliana</i>	A15g46010/THA1/PEN4	Thalianol (NMR [39 ^{**}])
Mameralol	<i>A. thaliana</i>	A15g42600/MRN1/PEN5	Mameralol (NMR [40 ^{**}])
Isomultiflorenol	<i>L. cylindrica</i>	LcIMS1 (BAB68529)	Isomultiflorenol (LC-MS [30])
Mixed	<i>A. thaliana</i>	A11g78870/LUP1	Lupeol, 3β,20-dihydroxylupane , β -amyirin, germanicol, taraxasterol and ψ -taraxasterol (GC, MS [33]; NMR [33-35])
Mixed	<i>A. thaliana</i>	A11g78980/LUP2/ YUP8H12R.43	β-Amyrin, taraxasterol, tirucalla-7,21-dien-3β-ol, lupeol, bauerenol, butyrospermol, multiflorenol, α-amyirin and ψ-taraxasterol (HPLC, NMR [2,36]; GC-MS [2]; LC-MS [36])
Mixed	<i>A. thaliana</i>	A11g89960/LUP5	Tirucalla-7,21-dien-3β-ol and additional uncharacterized (LC-MS [37])
Mixed	<i>A. thaliana</i>	A11g78500/PEN6	Bauerenol, lupeol, α-amyirin and additional uncharacterized (LC-MS [37])
Mixed	<i>C. speciosus</i>	CsOSC2 (BAB3254)	Lupeol, germanicol, β-amyirin and additional uncharacterized (LC-MS [38])
Mixed	<i>L. japonicus</i>	AMY2 (AAO33580)	Lupeol, β-amyirin and additional uncharacterized (HPLC [24])
Mixed	<i>P. sativum</i>	PSM (BAA97599)	α-Amyrin, β-amyirin, δ-amyirin, ψ-taraxasterol, butyrospermol, lupeol, germanicol and taraxasterol (LC-MS, GC-MS, NMR [32])

^a *A. thaliana* PEN and LUP designations are from [2].
^b For OSC enzymes with mixed products, major products are listed in bold text if known.
^c JBR-Herrera, PhD thesis, Rice University, 1999. Abbreviations: GC, gas chromatography; HPLC, high pressure LC; IR, infrared spectroscopy; LC, liquid chromatography; MS, mass spectrometry; NMR, nuclear magnetic resonance.

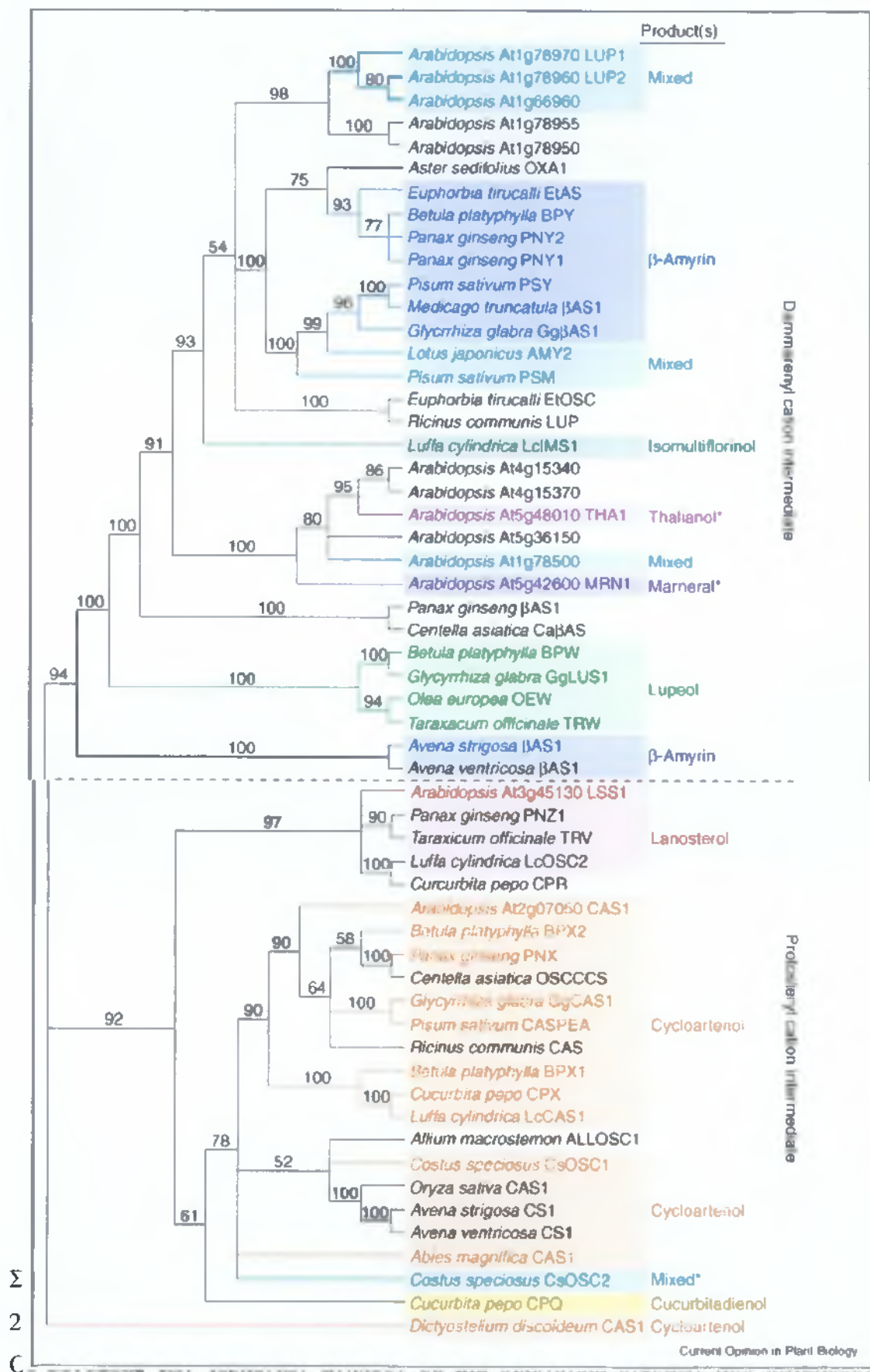
Πίνακας 2: Ταυτοποιημένες φυτικές κυκλάσες του οξειδοσκουαλενίου (Vincken J.et al.,2007).

Οι κυκλάσες που σχηματίζουν ενδιάμεσα το κατιόν του νταμαρενυλίου απαντώνται αποκλειστικά στα φυτά και μάλιστα σε αυτά με αγγειακό αγωγό σύστημα (τραχεόφυτα) και είναι υπεύθυνες για την παραγωγή των τριτερπενοειδών αλκοολών. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν η συνθάση της β -αμυρίνης και η συνθάση της λουπεόλης. Όσον αφορά την εξελικτική πορεία των OSCs, η συνθάση της κυκλοαρτενόλης μεταξύ διαφορετικών ειδών παρουσιάζει μεγάλη ομολογία, γεγονός που επιβεβαιώνει το γεγονός ότι έχει σημαντικό ρόλο για την ομοιόσταση του φυτικού κυττάρου. Σε αντίθεση, οι κυκλάσες που χρησιμοποιούν ως ενδιάμεσο το κατιόν του νταμαρενυλίου εμφανίζουν μικρή ομοιότητα μεταξύ τους[10]. Για

παράδειγμα οι συνθάσες της λουπεόλης από τα φυτά *Glycyrrhiza glabra*, *Betula platyphylla*, *Taraxacum officinale* και *Olea europaea* εμφανίζουν ομολογία της τάξης του 74-81% και συγκροτούν μια ξεχωριστή και διακριτή ομάδα κυκλασών (Πίνακας 2). Επίσης υπάρχουν κάποιες OSCs από μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά οι οποίες παράγουν αποκλειστικά και μόνο β-αμυρίνη. Οι συνθάσες της β-αμυρίνης των διαφόρων φυτών αυτών παρουσιάζουν μικρή ομολογία (48-50%) σε αντίθεση με την συνθάση της κυκλοαρτενόλης με την οποία παρουσιάζουν υψηλότερη ομολογία (70-79%)(Vincken J.et al., 2007).

Αυτό σημαίνει ότι μετά το διαχωρισμό των ειδών, είχαν την δυνατότητα να συσσωρεύσουν μεταλλάξεις, ευνοϊκές βέβαια αφού επικράτησαν, για την επιβίωση των ειδών στο εκάστοτε περιβάλλον. Συνεπώς, αυτό έρχεται σε συμφωνία με το ότι οι περισσότερες από αυτές παράγουν προϊόντα που ευνοούν την προσαρμογή και επιβίωση του φυτού στο περιβάλλον, π.χ. σαπωνίνες και άμυνα έναντι μυκήτων|(Qi X.et al., 2004).

Η ποικιλομορφία των φυτικών τριτερπενοειδών προκύπτει όχι μόνο από την ποικιλία των OSCs αλλά και από την ικανότητα κάποιων κυκλασών να παράγουν σύνθετα προϊόντα. Αυτές οι OSCs ανήκουν στην κατηγορία αυτών που σχηματίζουν το κατιόν του νταμαρενυλίου, αλλά θα μπορούσαν να χαρακτηριστούν και σαν μια τρίτη κατηγορία, αυτή των πολυλειτουργικών κυκλασών. (πίνακας 2). Συνθάσες της β-αμυρίνης οι οποίες παράγουν σύνθετα προϊόντα έχουν χαρακτηριστεί στα ψυχανθή και κυρίως στο *Pisum sativum* (μπιζέλι) και στο *Lotus japonicus*(Hayashi H.et al.,2004, Gallo M.et al., 2009). Οι πολυλειτουργικές κυκλάσες έχουν προκύψει μέσω της εξέλιξης των αγγειόσπερμων. Στα ψυχανθή οι συνθάσες της β-αμυρίνης που παράγουν σύνθετα προϊόντα έχουν κοινό πρόγονο με αυτές οι οποίες έχουν πιο εξειδικευμένη δράση. Αντίθετα στο *Arabidopsis thaliana* έχουν μικρότερη συγγένεια μεταξύ τους και μεγαλύτερη απόσταση στο φυλογενετικό δέντρο (Σχήμα 6)(Vincken et al., 2007).



πολύπλοκες αντιδράσεις πολλών βημάτων και παράγουν προϊόντα ποικίλης δομής με

βιολογική και εμπορική σημασία. Η τρισδιάστατη δομή των ενζύμων αυτών είναι καλά διατηρημένη από τους μύκητες μέχρι τα φυτά και περιλαμβάνει την «αναδίπλωση τερπενίων». Σύμφωνα με αυτή τη θεωρία, για την δραστηριότητα των ενζύμων αυτών δεν παίζουν ρόλο μόνο κάποια συγκεκριμένα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, αλλά και το σύνολο των αμινοξέων που το περιβάλλουν. Με τον τρόπο αυτό του προσδίδουν την κατάλληλη στερεοδιάταξη και γεωμετρία για την κατάλυση των πολύπλοκων αντιδράσεων (Hegera J. et al., 1998). Από μελέτες στην ευκαρυωτική συνθάση της λανοστερόνης (LSS), βρέθηκε ότι περιέχει κοντά στο ενεργό κέντρο και ένα λιποφιλικό κανάλι, καθώς και ένα στενό πέρασμα μεταξύ τους, το οποίο σχηματίζει μία εύκαμπτη θηλιά ώστε να επιτρέπει την διόδο του υποστρώματος. Αποδείχτηκε ότι η υψηλή εξειδίκευση των κυκλασών οφείλεται στις περιοχές αυτές (Kushiro T. et al., 2000).

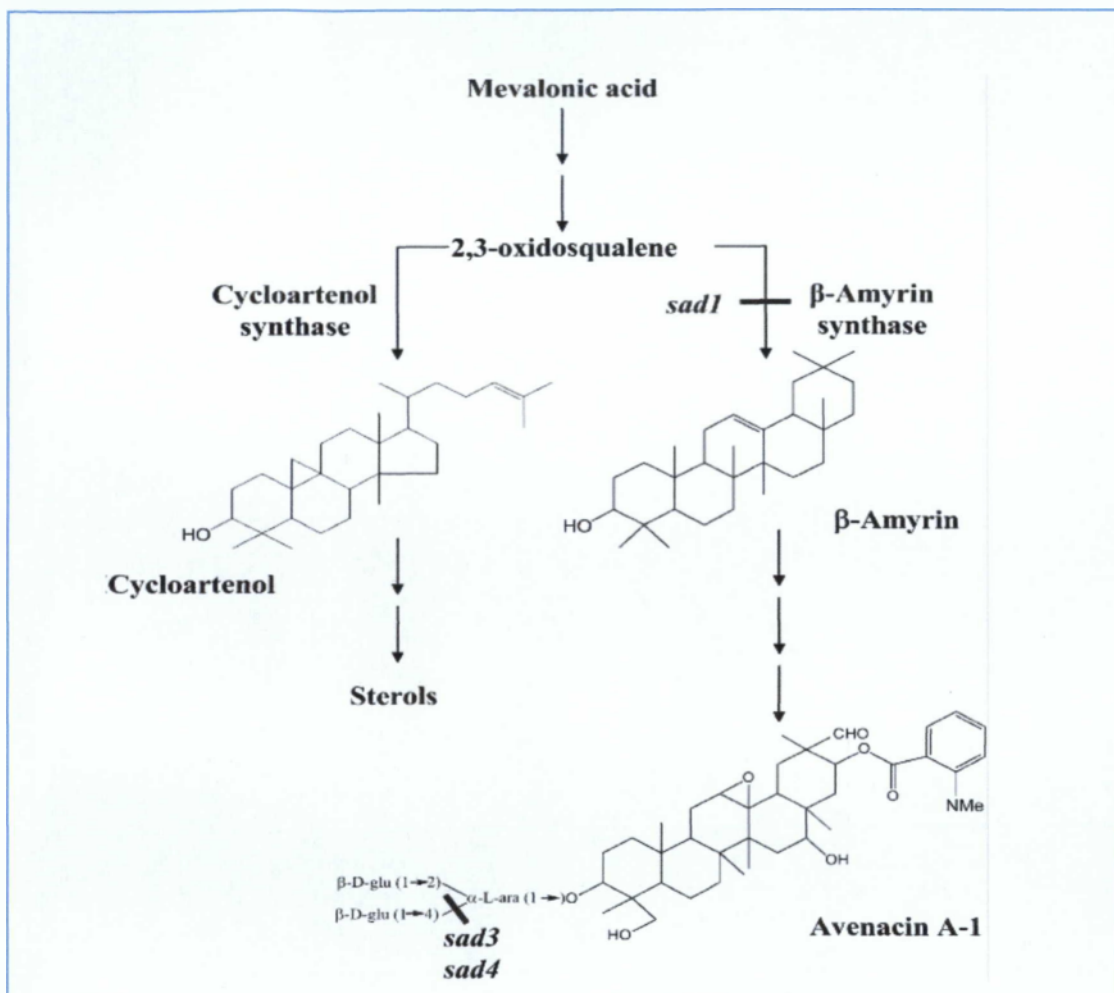
2.1.4 Σαπωνίνες και Κυτοχρώματα (CYPs)

Οι σαπωνίνες είναι τριτερπενικοί γλυκοζίτες στεροειδών, οι οποίες συναντώνται σε πολλά φυτικά είδη και ονομάστηκαν έτσι διότι με το νερό σχηματίζουν αφρό. Εκτός από τις απορρυπαντικές ιδιότητες εμφανίζουν και τοξικές ιδιότητες έναντι σε φυτοφάγα σπονδυλωτά αφού έχουν την ικανότητα να αποδιοργανώνουν τις μεμβράνες και να προκαλούν αιμόλυση των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Κατά την υδρόλυση τους δίνουν μια σειρά σακχάρων όπως η γλυκόζη, η γαλακτόζη και η ξυλόζη καθώς και το “άγλυκο” συστατικό που ονομάζεται σαπωγενίνη]. Λόγω της υψηλής συγκέντρωσης τους σε υγιή φυτά οι σαπωνίνες έχουν χαρακτηριστεί ως αντιμικροβιακά συστατικά και γενικότερα ως ουσίες οι οποίες εμπλέκονται στην άμυνα του φυτού απέναντι στα παθογόνα. Στο φυτό δακτυλίτης (*Digitalis purpurea*) εντοπίζεται η διγιτονίνη ενώ στη βρώμη (*Avena sativa*) συσσωρεύονται σαπωνίνες στις ρίζες γνωστές ως αβενασίνες (Qi et al., 2004; Qi et al., 2006). Η διαδικασία της βιοσύνθεσης των σαπωνινών δεν είναι ιδιαίτερα γνωστή, παρά το μεγάλο ενδιαφέρον που παρουσιάζουν αυτά τα φυτικά προϊόντα. Το πρώτο βήμα για την βιοσύνθεση των σαπωνινών είναι η δημιουργία ενός ενδιάμεσου προϊόντος, της β-αμυρίνης, μια τριτερπενοειδή αλκοόλη η οποία σχηματίζεται από τη κυκλοποίηση του 2,3 οξειδοσκουαλενίου και η αντίδραση καταλύεται από μία κυκλάση του οξειδοσκουαλενίου (OSC), την συνθάση της β-αμυρίνης. Η β-αμυρίνη δεν έχει σημαντική αντιμικροβιακή δράση αλλά μετατρέπεται στην βιολογικά ενεργή σαπωνίνη αβενασίνη A-1, μέσα από μια σειρά τροποποιήσεων στις οποίες

εμπλέκονται ένζυμα που ανήκουν στην οικογένεια του κυτοχρώματος P450. Η μετατροπή της β-αμυρίνης σε σαπωνίνες απαιτεί διάφορα ένζυμα όπως P450 εξαρτώμενες μονοξυγενάσες, ακυλοτρανσφεράσες και γλυκοσυλιοτρανσφεράσες (Σχήμα 7).

Στη βρώμη η συνθάση της β-αμυρίνης κωδικοποιείται από το γονίδιο *Sad1*, ενώ έχει κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί ένα άλλο γονίδιο το *Sad2*, το οποίο κωδικοποιεί για μια μονοξυγενάση του κυτοχρώματος P450, είναι συνώνυμο του *AsCYP51H10* και ανήκει στην υποοικογένεια *CYP51H* των ενζύμων του κυτοχρώματος P450. Το εν λόγω ένζυμο θεωρούνταν ότι ήταν υπεύθυνο για την σύνθεση στερολών, αλλά αποδείχθηκε ότι έχει δευτερεύουσα σημασία στην διαδικασία αυτή και τελικά συμμετέχει ενεργά στην βιοσύνθεση σαπωνινών και ιδιαίτερα της αβενασίνης, η οποία προσδίδει αντίσταση απέναντι στα παθογόνα και αντιμικροβιακή δράση στην βρώμη (Paradouroulou et al., 1999). Έχουν ταυτοποιηθεί εννιά γονιδιακοί τόποι (*loci*) δύο εκ των οποίων έχουν κλωνοποιηθεί και χαρακτηριστεί όπως είδαμε παραπάνω (*Sad1*, *Sad2*). Αυτά τα δύο γονίδια μαζί με άλλα πέντε οργανώνονται σε μια γονιδιακή συστοιχία (*cluster*) στο γένωμα της βρώμης. Η αβενασίνη A-1 συντίθεται και συσσωρεύεται στα επιδερμικά κύτταρα των ριζών της βρώμης. Η έκφραση των *Sad1* και *Sad2* πραγματοποιείται κυρίως σε αυτά τα κύτταρα και υπόκειται σε αναπτυξιακό έλεγχο. Η σωστή γλυκοσυλίωση της αβενασίνης είναι σημαντική για την αντιμικροβιακή δραστηριότητα. Αφαίρεση ενός μορίου γλυκόζης από την γλυκοσυλιωμένη αβενασίνη μειώνει την τοξικότητα της. Κάποιοι μύκητες του εδάφους παράγουν υδρολάσες της γλυκόζης οι οποίες αποτοξικοποιούν την αβενασίνη αφαιρώντας ένα ή περισσότερα μόρια γλυκόζης. Στα φυτά η προσθήκη γλυκόζης στις τριτερπενοειδείς αλκοόλες συμβαίνει στο τέλος του βιοσυνθετικού μονοπατιού και είναι σημαντική για την σταθερότητα των προϊόντων. Μεταλλάγματα των γονιδίων *Sad3* και *Sad4* είναι υπεύθυνα για την μείωση στην ριζική ανάπτυξη και επηρεάζονται από την ικανότητα τους να γλυκοσυλιώνουν την αβενασίνη, ενώ συσσωρεύεται ένα ενδιάμεσο προϊόν (αβενασίνη με έλλειψη της β-1,4-γλυκόζης). Αυτά τα μεταλλάγματα εντοπίζονται στα επιδερμικά κύτταρα των ριζών και καταστέλλονται από μεταλλάξεις του *Sad1*, του γονιδίου που κωδικοποιεί για την συνθάση της β-αμυρίνης. Έτσι φαίνεται ότι η συσσώρευση της μονογλυκοσυλιωμένης αβενασίνης A-1 είναι η αιτία και όχι το αποτέλεσμα των παρατηρούμενων ελαττωμάτων στη ρίζα. Το γονίδιο *Sad3* ανήκει στη γονιδιακή συστοιχία που αναφέρθηκε παραπάνω και έχει συγκεκριμένο ρόλο στη βιοσύνθεση

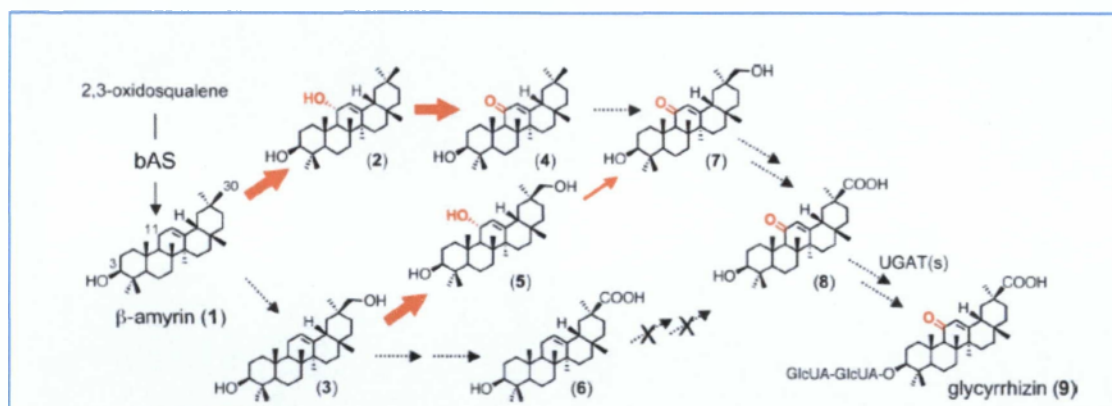
της αβενασίνης, ενώ το γονίδιο *Sad4* δεν είναι συνδεδεμένο στην συστοιχία αυτή και έχει ένα πιο διευρυμένο λειτουργικό ρόλο.



Σχημα 7: Η βιοσύνθεση στερολών και της αβενασίνης στη βρώμη

Τα ένζυμα που ανήκουν στην ομάδα του κυτοχρώματος P450 παίζουν σημαντικό ρόλο στις οξειδωτικές αντιδράσεις της βιοσύνθεσης των τριτερπενοειδών παρότι ο ρόλος του δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως. Η γλυκυριζίνη είναι ένα βιοενεργό συστατικό το οποίο προέρχεται κυρίως από τις ρίζες και τους βλαστούς του φυτού γλυκόριζα (*Glycyrrhiza glabra* και *Glycyrrhiza uralensis*, Fabaceae). Έχουν αναφερθεί διάφορες φαρμακευτικές ιδιότητες της γλυκυριζίνης όπως αντιφλεγμονώδεις, ανοσοποιητικές και αντιαλλεργικές ιδιότητες. Η γλυκυριζίνη είναι ένα τριτερπενοειδές που ανήκει στις γλυκοσυλιωμένες σαπωνίνες και κυρίως

συντίθεται από την β-αμυρίνη. Τα στάδια στη βιοσύνθεση της γλυκυριζίνης πιστεύεται ότι εμπλέκουν μια σειρά από οξειδωτικές αντιδράσεις (προσθήκη υδροξυλίου) στις θέσεις C-11 και C-30 της β-αμυρίνης, ακολουθούμενες από μία γλυκοσυλίωση στη 3 θέση του υδροξυλίου της β-αμυρίνης. Πρόσφατα έχει επιτυχώς ταυτοποιηθεί μία μονοξυγενάση της οικογένειας του κυτοχρώματος P450, ως ένα γονίδιο που εμπλέκεται στην βιοσύνθεση της γλυκυριζίνης. Το γονίδιο ονομάστηκε CYP88D6 και φαίνεται ότι καταλύει δύο διαδοχικά βήματα στην οξείδωση της β-αμυρίνης. Τη μετατροπή της β-αμυρίνης σε 11-οξο-β-αμυρίνη μέσω ενός ενδιάμεσου προϊόντος της 11-υδροξυ-β-αμυρίνης, με τελικό προϊόν την γλυκυριζίνη μέσω γλυκοσυλίωσης. (Το CYP88D6 αποτελεί μια υποοικογένεια των ενζύμων CYP88 τα οποία φαίνεται ότι παρουσιάζονται αποκλειστικά στα φυτά της οικογένειας Fabaceae.



Σχήμα 8: Προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης γλυκυριζίνης (Shibuya et al., 2004).

2.1.5 Η Βιοσύνθεση των Τριτερπενοειδών στα φυτά οργανώνεται σε συστοιχίες γονιδίων

Τα γονίδια που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών οργανώνονται στις ίδιες χρωμοσωμικές περιοχές σχηματίζοντας τύπου οπερονίου δομές (Osbourn, 2010). Φυτά στα οποία έχουν προσδιοριστεί τέτοιες περιοχές είναι η Βρώμη (Qi et al., 2004; Qi et al., 2006; Mugford et al., 2009; Mylona et al., 2008), το *Arabidopsis thaliana* (Field and Osbourn, 2008; Field et al., 2011) και το *Lotus japonicus* (Krokida et al., 2013). Οι δομές αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο συν-ρύθμισης των γονιδίων και έχουν δημιουργηθεί *de novo* στο γονιδίωμα των φυτών (Wegel et al., 2009; Krokida et al., 2013).

3.1 Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΤΟΜΑΤΑΣ

3.1.1 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Υπό τις κλιματικές μας συνθήκες η τομάτα είναι φυτό ετήσιο, ποώδες. Έχει στέλεχος διακλαδιζόμενο και το ύψος του κυμαίνεται από 0,50 μ. στους νάνους ή αυτοκλάδευτους τύπους έως 1,50 μ. και πλέον αναλόγως κυρίως της ποικιλίας.

Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων του είδους στη διπλοειδή μορφή είναι $2n = 24$, τον ίδιο δε αριθμό χρωμοσωμάτων έχουν και όλα τα είδη του γένους *Lycopersicum*.

Το ριζικό σύστημα είναι πασσαλώδες εφόσον το φυτό προέρχεται από σπόρο που σπάρθηκε απευθείας στη μόνιμη θέση. Υπό τις συνθήκες αυτές η ρίζα μπορεί να φτάσει γρήγορα το βάθος των 60 εκ. επιμηκυνόμενη κατά 2-3εκ. ημερησίως. Των μεταφυτευμένων φυτών η ρίζα αναπτύσσεται περισσότερο πλαγίως και λιγότερο κατακόρυφος.

Τα φύλλα εμφανίζονται επί των βλαστών εναλλάξ, είναι σύνθετα και αποτελούνται συνήθως από 7, 9 ή και 11 φυλλάρια. Στην επιφάνεια τους όπως και στους βλαστούς υπάρχουν αδενώδεις τρίχες, οι οποίες θραυόμενες αναδίδουν τη χαρακτηριστική οσμή του φυτού.

Τα άνθη τους είναι ερμαφρόδιτα και φέρονται ανά 4 έως 12 και πλέον σε ταξιανθίες απλές, διχαλωτές ή διακλαδιζόμενες. Ο κάλυκας συνίσταται από 5 ή περισσότερα σέπαλα, η στεφάνη επίσης από 5 ή περισσότερα πέταλα, τα οποία πέφτουν μετά την γονιμοποίηση του άνθους. Οι στήμονες, 5 ή περισσότεροι, είναι μερικώς ενωμένοι στη βάση με τη στεφάνη, αποτελούνται δε από νήματα βραχέα και ανθήρες επιμηκυνόμενες και ενωμένους μεταξύ τους κατά τρόπο ώστε να σχηματίζουν κώνο γύρω από το στύλο, τον οποίο συνήθως καλύπτουν τελείως. Ο ύπερος αποτελείται από πολύχρωμη ωοθήκη με πολλά ωάρια και από βραχύ ή μακρό στύλο, το στίγμα του οποίου στη τελευταία αυτή περίπτωση βγαίνει έξω από τον κώνο των ανθέρων. Κάποτε συναντώνται άνθη ανώμαλα με σύνθετο περιάνθιο και ωοθήκη παραμορφωμένη. Αυτών οι στήμονες συνήθως δεν καλύπτουν το στύλο.

Η άνθηση αρχίζει τις πρωινές ώρες και συνεχίζεται καθ' όλη την ημέρα. Με το άνοιγμα της στεφάνης γίνεται η ωρίμανση του στίγματος - οπότε τούτο είναι επιδεκτικό επικονίασης - και μόνο μετά από 24 - 48 ώρες αρχίζει η διάρρηξη των ανθέρων και η διάχυση της γύρης (υστερανδρία). Κυρίως γίνεται αυτεπικονίαση και αυτογονιμοποίηση, μερικές φορές όμως μπορεί να γίνει σταυρεπικονίαση με τα έντομα, όπως συμβαίνει πολλάκις σε ποικιλίες με μακρύ στύλο. Το μήκος του στύλου επηρεάζεται και από το μήκος της ημέρας, κατά τρόπο που τα άνθη τα οποία

σχηματίζονται υπό βραχεία φωτοπερίοδο να έχουν στύλους βραχείς, μακρούς δε υπό μακρά φωτοπερίοδο.

Η βλάστηση της γύρης είναι βραδεία και η γονιμοποίηση των ωαρίων γίνεται 2 περίπου ημέρες μετά την επικονίαση. Από την γονιμοποίηση του άνθους μέχρι την ωρίμανση του καρπού αποτελούνται αναλόγως της ποικιλίας και των καλλιεργητικών συνθηκών 45 - 60 ημέρες.

Ο καρπός είναι πολύχρωρη ράγα με σχήμα που ποικίλει στις διάφορες ποικιλίες, σφαιροειδές, πρισμένο στους πόλους ή επίμηκες, με περικάρπιο (φλοιό) λείο και λεπτό, μεσοκάρπιο (σάρκα) χυμώδες, κόκκινο και σπόρους πολυάριθμους, δισκοειδείς, τραχιάς επιφάνειας, ελαιούχους. Το βάρος του καρπού κυμαίνεται αναλόγως κυρίως προς την ποικιλία, από 50 έως 200 συνήθως γραμμάρια. Ως προς το χρώμα, αυτό μπορεί να είναι κόκκινο έως κιτρινοκόκκινο αναλόγως της περιεχόμενης στον καρπό καροτίνης (κίτρινο) και λικοπίνης (κόκκινο), υπάρχουν όμως επίσης ποικιλίες με καρπούς χρώματος εντελώς κίτρινου.

Η μέση σύνθεση του καρπού είναι: σάρκα και χυμός 96 - 97%, σπόροι 2 -3%, φλοιός 1 - 2%. Η χημική σύσταση του είναι περίπου 93,5% νερό, 1% αζωτούχες ουσίες, 0,2% λιπαρές ουσίες, 1% κυτταρίνες, 3,5% σάκχαρα και 0,5% τέφρα.

Η τομάτα είναι ένα από τα πιο πλούσια προϊόντα σε βιταμίνες. Περιέχει σε μεγάλη ποσότητα τη βιταμίνη C (25 - 30 χιλιοστά του γραμμαρίου σε 100g καρπού), τις βιταμίνες A, B1, B2, K κ.α.

3.1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ - ΠΕΡΙΠΟΙΗΣΗ

ΑΡΔΕΥΣΗ

Προσδιορισμός των απαιτήσεων των φυτών τομάτας σε νερό

Οι ποσότητες του νερού που χρησιμοποιούνται από ένα πληθυσμό φυτών τομάτας θερμοκηπίου ακολουθούν μια σιγμοειδή καμπύλη, στην οποία οι χαμηλές τιμές κατανάλωσης νερού σημειώνονται στα αρχικά βλαστικά στάδια των φυτών. Οι τιμές μεγαλώνουν σταδιακά μέχρι την αρχή της άνθησης και ακολουθεί απότομη αύξηση της κατανάλωσης νερού κατά τη διάρκεια της μέγιστης ωρίμανσης των καρπών. Στο στάδιο αυτό σημειώνεται και η μέγιστη τιμή της φυλλικής επιφάνειας. Στις αυτοκλάδευτες ποικιλίες τομάτας, οι ποσότητες του καταναλισκόμενου νερού παραμένουν σταθερές μέχρι την ολοκλήρωση της ωρίμανσης των καρπών και αρχίζουν να μειώνονται μετά από αυτό το στάδιο. Έτσι παρατηρείται μια συσχέτιση μεταξύ της μέγιστης μεταβολικής δραστηριότητας, της μέγιστης ανάπτυξης των

φυτών και της μέγιστης κατανάλωσης νερού. Στις απεριόριστης ανάπτυξης ποικιλίες τομάτας η κατανάλωση νερού στο θερμοκήπιο ακολουθεί την ίδια καμπύλη με τις αυτοκλαδευτες ποικιλίες μέχρι το στάδιο ωρίμανσης των καρπών. Όμως, επειδή στις ποικιλίες αυτές η παράγωγή φύλλων, βλαστών και καρπών είναι συνεχής, η κατανάλωση νερού παραμένει συνεχώς σταθερή, εφόσον ασφαλώς παραμένουν σταθερές η θερμοκρασία, η ηλιοφάνεια και η κίνηση του αέρα στο θερμοκήπιο. Μείωση της κατανάλωσης του νερού σημειώνεται όταν η καλλιέργεια τομάτας έχει φθίση στο τέλος της ή όταν συμβεί σοβαρή φυλλόπτωση ή προγραμματισμένη αποφύλλωση. Οι ποσότητες νερού που χρειάζεται ένα φυτό ανά ημέρα στο θερμοκήπιο κυμαίνονται από 0,2 - 0,4 λίτρα τον Ιανουάριο και φθάνουν μέχρι 2,6 - 3,0 λίτρα τον Ιούλιο μήνα, αλλά επηρεάζονται από την περιοχή, το στάδιο ανάπτυξης του φυτού, τις καιρικές συνθήκες κ.λπ., συνεπώς για μια καλλιέργεια φθινοπώρου που παραμένει στο χωράφι επί 8-9 μήνες οι συνολικές ανάγκες ανέρχονται περίπου στα 800μ³ στο στρέμμα. Όταν όμως χρησιμοποιείται η μέθοδος της στάγδην άρδευσης, όπου ο συντελεστής αποτελεσματικότητας είναι 85%, τότε η ποσότητα αυτή μπορεί να μειωθεί στα 700 μ³ ανά στρέμμα. Ο μέσος Όρος των 6μ³ ανά ημέρα και στρέμμα θερμοκηπίου μπορεί να θεωρηθεί ως βάση υπολογισμού των αναγκών σε αρδευτικό νερό, εφόσον δε διαθέτουμε επιστημονικά στοιχεία. Όταν είναι γνωστή η απαιτούμενη ποσότητα νερού ανά στρέμμα και ημέρα μπορούμε να καθορίσουμε τη διάρκεια του ποτίσματος, μέσω του συστήματος της στάγδην άρδευσης, με εφαρμογή της εξίσωσης:

$T = (H_a : Q \cdot A \Phi) \cdot 60$ όπου:

- T = ο χρόνος άρδευσης σε πρώτα λεπτά της ώρας,
- H_a = οι στρεμματικές απαιτήσεις της καλλιέργειας σε λίτρα ανά ημέρα,
- Q = η παροχή του σταλακτήρα σε λίτρα ανά ώρα και
- $A \Phi$ = ο αριθμός των φυτών (και συνεπώς σταλακτήρων) στο στρέμμα.

Συχνότητα ποτισμάτων

Μετά τον προσδιορισμό των εβδομαδιαίων αναγκών καλλιέργειας σε νερό, πρέπει να καθοριστεί και η συχνότητα των αρδεύσεων, η οποία σχετίζεται με την ποσότητα νερού που θα χορηγηθεί σε κάθε πότισμα. Πολύ αραιές αρδεύσεις με μεγάλες ποσότητες νερού κάθε φορά, ιδιαίτερα το χειμώνα, δημιουργούν προβλήματα ασφυξίας στις ρίζες των φυτών, ενώ αργά την άνοιξη και το καλοκαίρι, λόγω μεγάλης διακύμανσης της εδαφικής υγρασίας, προκαλούν βλαστομανία ή ανάσχεση του

ρυθμού ανάπτυξης των φυτών, ανθόρροια δυσκολία ή οψίμως στην καρπόδεση, καρπόπτωση, μείωση της παράγωγης και σχισίματα στους καρπούς.

Συχνές αρδεύσεις με μικρότερες ποσότητες νερού μπορούν να διατηρήσουν την εδαφική υγρασία χρονικά ομοιόμορφη σε κανονικά επίπεδα, χωρίς σημαντικές διακυμάνσεις, και επόμενος να εξασφαλίσουν το μέγιστο της παράγωγης, επειδή τα φυτά έχουν στη διάθεση τους πάντοτε αρκετές ποσότητες νερού. Στις ημέρες μας λόγω της εφαρμογής αυτοματοποιημένων συστημάτων άρδευσης, δια των οποίων ελαχιστοποιείται η ανθρώπινη εργασία και συνεπώς μειώνεται το κόστος του ποτίσματος, συνίσταται να εφαρμόζονται συχνότερα ποτίσματα με μικρότερη κάθε φορά ποσότητα νερού.

Όπως προαναφέρθηκε, οι ανάγκες των φυτών τομάτας σε νερό φθάνουν το μέγιστο την περίοδο καρποφορίας. Συνεπώς την άνοιξη και το καλοκαίρι, που η καρποφορία και η εξατμησοδιαπνοή των φυτών βρίσκονται στο μέγιστο, είναι ανάγκη να γίνονται ποτίσματα καθημερινά και μερικές φορές ίσως και δυο φορές την ημέρα, ανάλογα με τον τύπο του εδάφους. Την περίοδο καρποφορίας η τροφοδοσία των φυτών με νερό επηρεάζει τόσο την ποσότητα όσο και την ποιότητα των καρπών. Υπερβολικές ποσότητες νερού επηρεάζουν θετικά το βάρος των καρπών και συμβάλουν στην αύξηση της συνολικής παράγωγης, αλλά ταυτόχρονα επηρεάζουν αρνητικά τόσο το ποσοστό των αδιάλυτων στερεών, τα όποια καθορίζουν την αντοχή των καρπών στις μεταφορές, όσο και το ποσοστό των ολικών διαλυτών στερεών, τα όποια καθορίζουν την ποιότητα των καρπών. Μειωμένες ποσότητες διαθέσιμου νερού προκαλούν μείωση του βάρους της παράγωγης. Επειδή στις επιτραπέζιες τομάτες η τιμή τους δεν καθορίζεται καθημερινός και ανά παρτίδα συγκομιδής από την ποιότητά τους (ολικά διαλυτά, αδιάλυτα στερεά, pH, οξύτητα κ.λπ.), οι ημερήσιες ποσότητες νερού που καταναλώνονται από τα φυτά έχουν σημασία μονό για της τομάτες που προορίζονται για τις αγορές του εξωτερικού, λόγω του ότι πρέπει να είναι αρκετά συνεκτικές προκειμένου να αντέξουν περισσότερες μέρες στις μεταφορές. Επιβάλλεται σε αυτές τις περιπτώσεις μια κάποια συγκράτηση των ποσοτήτων νερού, ιδιαίτερα όταν η άρδευση γίνεται με τη μέθοδο των αυλακίων. Εάν η καλλιέργεια της τάματος γίνεται με μια από τις μεθόδους της υδροπονίας τότε αύξηση της συνεκτικότητας του καρπού μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της τιμής αυτότητας του θρεπτικού διαλύματος με χλωριούχο κάλιο.

Για τη διατήρηση κανονικών επιπέδων υγρασίας, είναι προτιμότερο να εφαρμόζονται αρδεύσεις με ισόποσες δόσεις ανά πότισμα, οπότε η κάλυψη των

αναγκών των φυτών να γίνεται με αυξομείωση της συχνότητας των ποτισμάτων. Η παρεχομένη ποσότητα νερού ανά πότισμα μπορεί να κυμανθεί, ανάλογα με την εποχή, από 500 έως 1500 γραμ. ανά φυτό, εφόσον το υπόστρωμα είναι έδαφος ή από 300 έως 600 γραμ. όταν το υπόστρωμα είναι μίγμα τύρφης σε σακούλες. Πάντως πρέπει να αποφεύγονται τα ποτίσματα αργά το απόγευμα, γιατί έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία σταγόνων νερού επί των φύλλων τη διάρκεια της νύχτας, οι ποιες εύνουν την εξάπλωση των μυκητολογικών ασθενειών.

3.1.3 ΛΙΠΑΝΣΗ

Για τις υπαίθριες καλλιέργειες γίνεται συνήθως μια βαθιά άροση του εδάφους το φθινόπωρο, σε βάθος 40εκ. περίπου, κατά την οποία μπορεί να ενσωματωθεί η κοπριά στο τέλος του χειμώνα μέχρι τις αρχές της άνοιξης, με μια δεύτερη άροση καλύπτονται τα φωσφοροκαλιούχα λιπάσματα που αναφέρονται στη βασική λίπανση. Ίσως χρειάζεται να προστεθεί μαζί μετά λιπάσματα και κάποιο κατάλληλο εντομοκτόνο για τη καταπολέμηση των εντόμων του εδάφους. Ακολουθούν η ισοπέδωση και 1-2 φρεζαρίσματα, συμπληρώνεται δε η ετοιμασία του εδάφους με το άνοιγμα αυλακιών ή των λάκκων φύτευσης ή σποράς ανά λόγος προς τον ακολουθούμενο τρόπο καλλιέργειας.

Τα αζωτούχα λιπάσματα προστίθενται στο έδαφος υπό νιτρική μορφή, μετά την εγκατάσταση της καλλιέργειας, με επιφανειακές λιπάνσεις και κατά μηνιαία διαστήματα, σε 3-5 δόσεις με έναρξη 20 περίπου ημέρες μετά τη φύτευση. Δεν είναι σπάνιες οι περιπτώσεις να δίνεται ένα μέρος του αζώτου υπό μορφή αμμωνιακή κατά τη βασική λίπανση μαζί με τα φωσφοροκαλιούχα λιπάσματα, ιδίως όταν το έδαφος είναι βαρύ-αργιλώδες. Επίσης είναι κάποτε σκόπιμο (στα ελαφρά εδάφη) να προστίθεται ένα μέρος του καλιούχου λιπάσματος κατά την περίοδο ανάπτυξης των φυτών με επιφανειακή λίπανση.

Οι ποσότητες των αναγκαίων λιπαντικών στοιχείων σε κάθε καλλιέργεια τομάτας εξαρτάται από διάφορους παράγοντες. Αν δεν υπάρχουν στοιχεία αναλύσεων εδάφους κ.λπ. που να επιτρέπουν μια κατά το δυνατό ορθολογική λίπανση κατά στρέμμα, η οποία υπόσχεται μια καλή παραγωγή στις περισσότερες καλλιέργειες τομάτας.

Κοπριά χωνευμένη 3,000 - 4,000 χγρ .

P₂O₅ χγρ. 15-20 = 75-100 χγρ· 0-20-0

K₂O χγρ· 25-35 = 50-70 χγρ· 0-0-50

N χγρ. 15-25 = 60-100 χγρ. 26-0-0

Η έλλειψη υγρασίας και ασβεστίου στο έδαφος έχουν καταστροφικές συνέπειες στην ανάπτυξη της ντοματιάς και των καρπών της. Τα λουλούδια του φυτού μαραίνονται και πέφτουν σε πρώιμο στάδιο ενώ αν το φυτό προχωρήσει στην ανάπτυξη καρπών αυτοί σαπίζουν στο πίσω μέρος αρχικά και το σάπισμα προχωράει σιγά σιγά σε όλο τον καρπό.

Η έλλειψη φωσφόρου προκαλεί μάρανση των φύλλων, συρρίκνωση τους και δημιουργία μωβ κηλίδων. Το φυτό έχει φτωχή ανάπτυξη και παραμένει λεπτό και ασθενικό. Η προσθήκη του φωσφόρου θα πρέπει να γίνει από τα αρχικά στάδια ανάπτυξης του φυτού.

Απαραίτητο είναι και το κάλιο. Βοηθάει τη ντοματιά να δέσει γερό καρπό και γίνει υγιής και ευμεγέθης. Όταν οι καρποί είναι αδύναμοι, κακής ποιότητας και πέφτουν και όταν η παραγωγή είναι χαμηλή, το έδαφος χρειάζεται επειγόντως το κάλιο. Το κάλιο βοηθάει σημαντικά στην αποτελεσματική αντιμετώπιση ασθενειών όπως η βερτιτσιλίωση, η φουζαρίωση, η αλτερνάρια, η σήψη του στελέχους, το κλαδοσπόριο και άλλες.

3.1.4 ΚΛΑΔΕΜΑ - ΚΟΡΥΦΟΛΟΓΗΜΑ

Το κλάδεμα στη τομάτα γίνεται, σε υποστυλωμένες συνήθως καλλιέργειες. Αρχίζει περίπου με το σχηματισμό της πρώτης ταξιανθίας και συνίσταται στην αφαίρεση των δευτερευόντων βλαστών κατά την αρχή του σχηματισμού τους. Στις υπαίθριες καλλιέργειες με ποικιλίες επιτραπέζιας τομάτας αφήνονται να αναπτυχθούν από τη βάση του φυτού, εκτός από το κεντρικό - αρχικό στέλεχος, συνήθως δυο ακόμα κλάδοι, από τους οποίους επίσης αφαιρούνται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης τους όλοι η πλευρικοί ή μερικοί μόνο πλευρικοί - τριτεύοντες βλαστοί. Στα θερμοκήπια αλλά πολλάκις και σε υπαίθριες πρώιμες καλλιέργειες με μικρές αποστάσεις φύτευσης γίνεται κλάδεμα αυστηρό, κατά το οποίο αφήνονται ένας μόνο ή δυο βλαστοί κατά φυτό.

Εφόσον η καλλιέργεια ενδιαφέρει για την πρώιμη μόνο παραγωγή της μπορεί να εφαρμόζεται **κορυφολόγημα** των φυτών πάνω από το φύλλο που ακολουθεί τον τρίτο, τέταρτο ή ανώτερο σταυρό (ταξιανθία). Οποσδήποτε η βλάστηση και τα άνθη που σχηματίζονται μετά τα μέσα ή έστω από το τέλος του Μαΐου, συνήθως αφαιρούνται με κορυφολόγημα προς όφελος της υπάρχουσας ήδη στα φυτά παραγωγής. Με την ίδια τεχνική αντιμετωπίζονται πολλάκις οι συνθήκες ξηρασίας, ιδίως σε αμμώδη εδάφη.

3.1.5 ΥΠΟΣΤΥΛΩΣΗ

Η υποστύλωση γίνεται σε συνδυασμό με το κλάδεμα για καλύτερη αξιοποίηση του όγκου του θερμοκηπίου και σκοπό έχει να:

- Διευκολύνει το κλάδεμα για ρύθμιση του φορτίου της παραγωγής.
- Διευκολύνει την εκτέλεση των καλλιεργητικών εργασιών (καταπολέμηση ασθενειών, πότισμα και λίπανση, συγκομιδή των καρπών κ.λπ.).
- Διευκολύνει τον φυσικό και τεχνητό αερισμό.
- Βοηθά στον καλύτερο φωτισμό των φυτών.

Το επικρατέστερο σύστημα μόρφωσης του φυτού της τομάτας στο θερμοκήπιο είναι το μονοστέλεχος, που επιτυγχάνεται με την αφαίρεση όλων των πλάγιων βλαστών σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η υποστύλωση των φυτών γίνεται κυρίως με τη χρήση σπάγκου και μεταλλικών συρμάτων. Σε μικρή κλίμακα και σε ορισμένες περιπτώσεις η υποστύλωση γίνεται με τη χρήση καλάμων ή λεπτών πασσάλων πάνω στα οποία δένονται τα φυτά με σπάγκο ή πλαστική ταινία.

Η χρήση σπάγκου και μεταλλικών συρμάτων εφαρμόζεται σε όλα τα νέου τύπου θερμοκήπια (ξύλινα, μεταλλικά, με πλαστικό ή γυαλί), όπου ο σκελετός είναι στέρεος και μπορεί να σηκώσει το βάρος της φυτομάζας και της καρποφορίας, που ανέρχεται σε αρκετούς τόνους το στρέμμα. Ο σπάγκος που χρησιμοποιείται σήμερα είναι πλαστικός, γιατί παρουσιάζει πλεονεκτήματα έναντι του σπάγκου φυτικής προέλευσης, όπως ανοχή στην υγρασία χωρίς προβλήματα από χημική επεξεργασία κ.λπ. - είναι όμως μιας χρήσης. Για την υποστύλωση χρειάζονται και μεταλλικά σύρματα που στερεώνονται στο σκελετό του θερμοκηπίου ή σε ανεξαρτήτους πασσάλους και στην απλούστερη περίπτωση είναι ένα σύρμα που τοποθετείται οριζόντια πάνω στη κάθε γραμμή φύτευσης των φυτών σε ύψος 1,8-2,5 μέτρα, ανάλογα με τη κατασκευή του θερμοκηπίου. Το άκρο του σπάγκου στερεώνεται στη βάση του φυτού με διαφόρους τρόπους. Οι πιο συνηθισμένη είναι: α) η άκρη δένεται σε πασσαλάκι που τοποθετείται διπλά από το φυτό, β) η άκρη δένεται στο κάτω μέρος του κορμού του φυτού με ειδικό τρόπο που δε σφίγγει (κίνδυνος διακοπής κυκλοφορίας) τον κορμό, και γ) η άκρη δένεται σε ειδικό πλαστικό εξάρτημα που στη συνέχεια στερεώνεται στο κορμό του φυτού. Υπάρχει η δυνατότητα το εξάρτημα αυτό να προκαλέσει τοπική ανύψωση υγρασίας, κακό αερισμό και πληγή στον κορμό με κίνδυνο την είσοδο ασθενειών (*Botrytis*, *Sclerotinia*) από το σημείο αυτό.

Και στις τρεις περιπτώσεις ο σπάγκος στη συνέχεια περιελίσσεται στον κορμό των φυτών και το άλλο άκρο δένεται στο οριζόντιο σύρμα, με τρόπο που εξαρτάται

και από τη μέθοδο υποστύλωσης που θα εφαρμοστεί. Υπάρχει και η δυνατότητα στερέωσης του σπάγκου με το φυτό, με τη χρήση ειδικού εργαλείου, το οποίο στερεώνει με πλαστική ταινία σπάγκο-φυτό.

Στις διάφορες περιοχές της υψηλίου που καλλιεργείται η τομάτα στο θερμοκήπιο εφαρμόζονται τα ίδια ή διαφορετικά συστήματα υποστύλωσης, που είναι αποτελέσματα της ιδιαίτερης κατασκευής του θερμοκηπίου (υψηλά-χαμηλά, πλατιά-στενά), της χρονικής διάρκειας που παραμένει η φυτεία σε παραγωγή στο θερμοκήπιο, της ευκολίας ή δυσκολίας εφαρμογής του συστήματος και, επίσης, σημαντικό ρόλο παίζουν και οι άλλοι προσωπικοί παράγοντες του καλλιεργητή.

3.1.6 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ - ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΤΟΜΑΤΑΣ

Η σπορά της τομάτας γίνεται είτε σε σπορείο από το οποίο λαμβάνονται τα φυτάρια για να φυτευτούν είτε απευθείας στον αγρό. Σε οποιαδήποτε περίπτωση συνίσταται η χρησιμοποίηση σπόρου απολυμασμένου.

Σε καλλιέργειες κανονικής εποχής, όπως είναι αυτές των οποίων η παραγωγή προορίζεται για τη βιομηχανία, η σπορά μπορεί να γίνει απευθείας στον αγρό. Κατά το σύστημα αυτό η σπορά γίνεται συνήθως σε λακκίσκους κατ' αποστάσεις 0,90 x 0,40 μ. περίπου. Μετά από διαδοχικές αραιώσεις αφήνεται τελικός ένα μονό φυτό σε κάθε λακκίσκο. Με τον τρόπο αυτό χρειάζονται 100 περίπου γραμμάρια σπόρου για σπορά ενός στρέμματος.

Στο σπορείο, του οποίου το έδαφος έχει απολυμανθεί, η σπορά γίνεται από το Δεκέμβριο έως τον Μάρτιο ή και αργότερα για τις όψιμες καλλιέργειες ή και πολύ νωρίτερα (από το Σεπτέμβριο ή Οκτώβριο) εφόσον πρόκειται για πρώιμες υπό κάλυψη καλλιέργειες και, πάντως, δύο περίπου μήνες προ της εποχής κατά την οποία είναι δυνατή η φύτευση στον αγρό.

Σε σχετικός προχωρημένη εποχή ή όταν οι συνθήκες θερμοκρασίας της εποχής το επιτρέπουν, το σπορείο μπορεί να είναι υπαίθριο, προφυλασσόμενο από τους ψυχρούς άνεμους με φράχτη ή τοίχο, με έδαφος ελαφρό και καλώς λιπασμένο με κοπριά και χημικά λιπάσματα. Για πρώιμη παραγωγή φυτών σε περιοχές με κρύο χειμώνα απαιτείται η χρησιμοποίηση θερμοσπορείου, δηλαδή σπορείου προφυλαγμένου με γυάλινα πλαίσια ή με πλαστικό (πολυαιθυλένιο) και θερμαινόμενου κατά οποιοδήποτε τρόπο.

Η σπορά γίνεται συνήθως κατά γραμμές που απέχουν μεταξύ τους 10-20 εκ. και ο σπόρος καλύπτεται με κοπρόχωμα π.χ. σε βάθος μέχρι ενός εκ., ακολουθεί δε αμέσως πότισμα με ποτιστήρι. Απαιτούνται 15-20 γραμμάρια σπόρου για σπορά σπορείου 7-8 μ² και για παραγωγή 2.500-3.000 φυτών.

Για καλλιέργεια υπό κάλυψη, υψηλή ή χαμηλή (τούνελ), η σπορά μπορεί να γίνει απευθείας σε γλαστράκια ή πλαστικά σακίδια κ.λπ. πλήρη με χώμα απολυμασμένο και προστατευμένα σε κατάλληλο σπορείο ή θερμοκήπιο. Σπέρνουν τότε μέσα σε σ'αυτά από 2-3 σπόρους και αρκετές ημέρες μετά το φύτευμα αραιώνουν τα φυτά αφήνοντας ένα μόνο – το πιο εύρωστο — σε κάθε γλαστράκι.

Τα αφαιρούμενα φυτά μπορούν ασφαλώς να αξιοποιηθούν μεταφυτευμένα αλλού.

Κατά μια άλλη μέθοδο απόκτησης φυτών για τις υπό κάλυψη καλλιέργειες, σπέρνουν ή μάλλον στρωματώνουν το σπόρο σε κιβωτισπορείο και μεταφυτεύουν τα φυτάρια σε γλαστράκια, συνήθως όταν έχουν σχηματίσει πλήρως τις κοτυληδόνες τους.

Από τη στιγμή της σποράς το σπορείο έχει ανάγκη από σχολαστική παρακολούθηση. Η κανονική υγρασία του εδάφους επιτυγχανόμενη με έγκαιρα ποτίσματα και η διατήρηση της θερμοκρασίας του μεταξύ 16-25°C θα παίξουν πρωτεύοντα ρόλο στην επιτυχία φυτρώματος και ανάπτυξης των φυτών. Ο κατάλληλος αερισμός των φυτάρων τα οποία εμφανίζονται 10 περίπου ημέρες από τη σπορά, η προστασία τους από τις ηλιακές ακτίνες κατά τις θερμές ώρες της ημέρας, το αραιώμα των φυτών, η καταπολέμηση των ασθενειών ή μάλλον η προφύλαξη από αυτές, πρέπει να γίνονται επίσης με πολύ επιμέλεια, γιατί κάποια παράληψη είναι πολλάκις ικανή να προκαλέσει την καταστροφή των φυτών.

Τα φυτά είναι έτοιμα για φύτευση 1,5-2 περίπου μήνες από τη σπορά, όταν έχουν απόκτηση ύψος 15-20 εκ. εκριζώνονται τότε, ύστερα από ένα καλό πότισμα και φυτεύονται στον ετοιμασθέντα αγρό με φυτευτήρι ή σκαλιστήρι σε ικανό βάθος και κατά τρόπο ώστε να μη προξενούνται πληγές στο στέλεχος των φυτών. Τα κακώς αναπτυγμένα ή ασθενή φυτά απορρίπτονται. Κατά τη φύτευση είναι πολλές φορές αναγκαία η αφαίρεση μέρους του φυλλώματος των φυτών και κυρίως όταν φυσούν ισχυροί άνεμοι, πάντοτε όμως μετά τη φύτευση πρέπει να ακολουθεί πότισμα.

Στην περίπτωση κυρίως της βιομηχανικής τομάτας πολλοί παραγωγοί φυτεύουν αμέσως μετά από ένα καλό πότισμα στα αυλάκια. Κρατούν το φυτό από

την άκρη της ρίζας με τα δάχτυλα, το χώνουν μέσα στο λασπερό-μαλακό χώμα και προχωρούν φυτεύοντας γρήγορα προς το τέρμα του ποτισμένου αυλακιού.

Εάν τα φυτώρια έχουν αναπτυχτεί μέσα σε γλαστράκια ή σακίδια πλαστικού, η φύτευση γίνεται με μπάλα χώματος μέσα σε ανοιγμένους λακκίσκους.

Οι αποστάσεις φύτευσης κυμαίνονται αναλόγως των εφαρμοζόμενων μεθόδων καλλιέργειας και της ευρωστίας της χρησιμοποιούμενης ποικιλίας. Σε καλλιέργεια της οποίας τα φυτά θα υποστλωθούν και θα ποτίζονται, με ποικιλία συνήθους ανάπτυξης και μετρίας αυστηρότητας κλάδεμα, η φύτευση γίνεται ανά 50 εκ. περίπου επί των γραμμών που απέχουν η μια από την άλλη 80-100 εκ. εφόσον πρόκειται να εφαρμοστεί κλάδεμα αυστηρό οι αποστάσεις επί των γραμμών μπορούν να περιοριστούν και μέχρι 30 ή και 25 εκ. στις εντός θερμοκηπίων καλλιέργειες, στις οποίες τα φυτά αναπτύσσονται συνήθως μονοστέλεχα και κορυφολογούνται ίσως μετά τον τέταρτο ή πέμπτο σταυρό. Στις καλλιέργειες χωρίς υποστύλωση των φυτών, σε τραπέζια ή σαμάρια, οι αποστάσεις φύτευσης είναι 0,40-0,60 x 1,20-1,50 μ. και προκειμένου για νάνες ποικιλίες 0,30 x 0.60-0.70 μ.

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής μελέτης ήταν η διερεύνηση του γενόματος της Τομάτας για την παρουσία συστοιχιών γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών. Η εργασία πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας αλγορίθμους και λογισμικό με το οποίο προσδιορίζονται οι γενετικές σχέσεις του φυτού της τομάτας με άλλα φυτά.

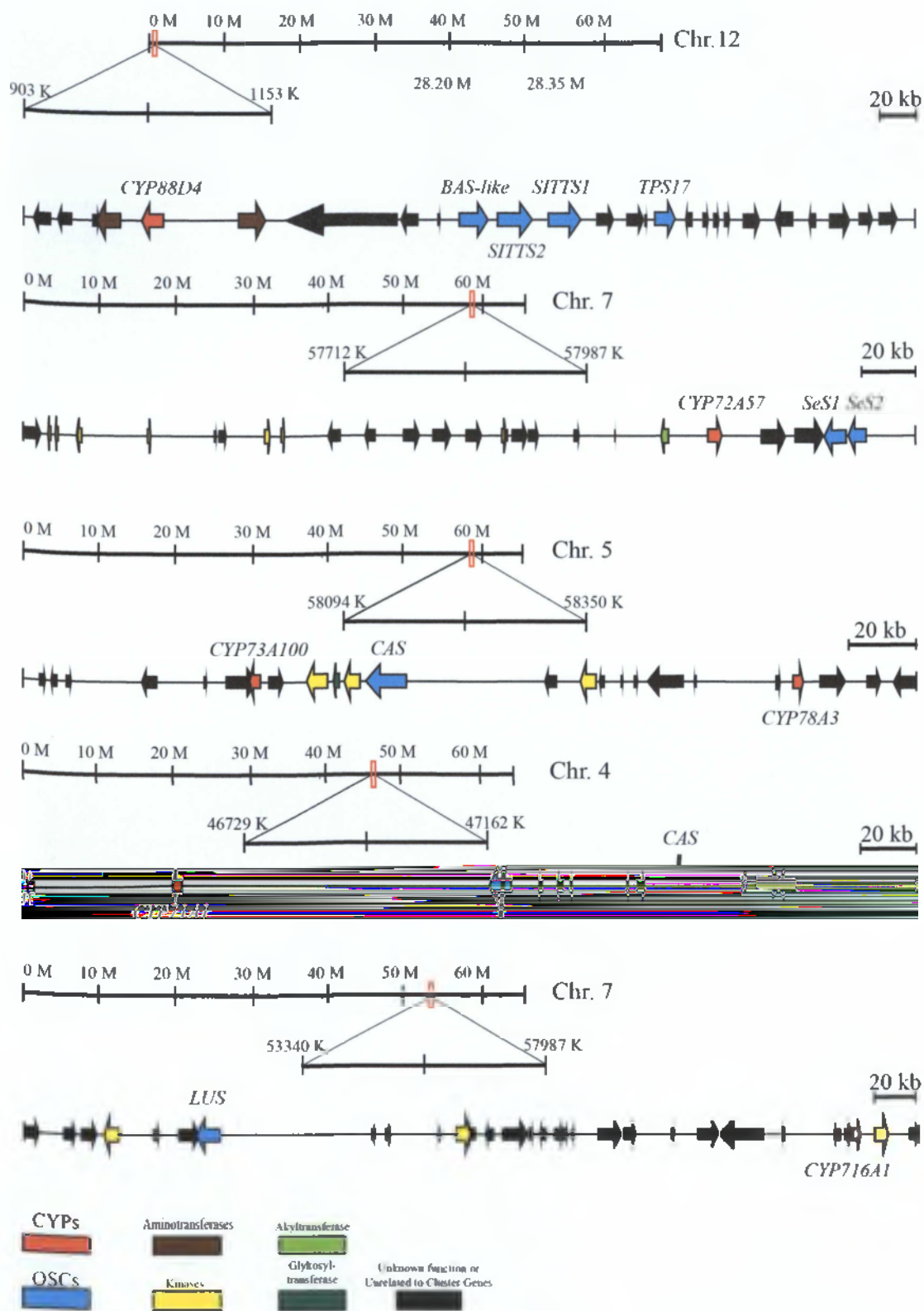
5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ανάλυση γενωματικών περιοχών της τομάτας που περιβάλλουν τα γονίδια που κωδικοποιούν για *OSCs*

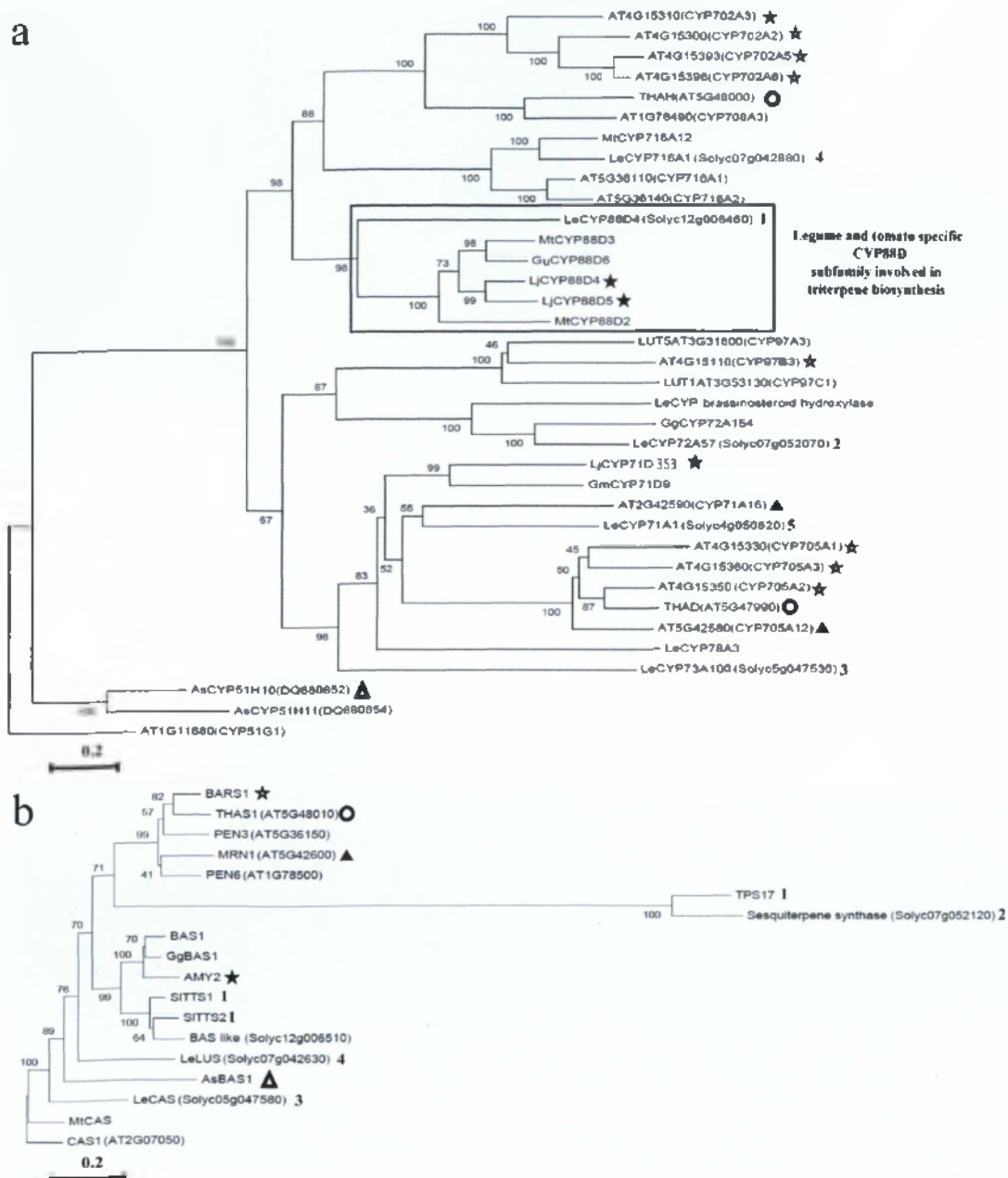
Η *in silico* ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση των δημόσια διαθέσιμων γενωματικών βιβλιοθηκών των σολανωδών <http://solgenomics.net>. Οι αλληλουχίες των *OSCs* του φυτού της τομάτας προσδιορίστηκαν μέσω του αλγόριθμου blast της μηχανής αναζήτησης του National Center for Biotechnology Information (NCBI), χρησιμοποιώντας ως αλληλουχίες ανιχνευτές ήδη χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες από άλλα φυτικά είδη όπως το *Arabidopsis* (Field and Osbourn, 2008; Field et al., 2011), το *Lotus japonicus* (Iturbe-Ormaetxe et al., 2003; Delis et al., 2011; Krokida et al., 2013). Οι αλληλουχίες για την τομάτα με προσδοκώμενη ομοιότητα με ταυτοποιημένες *OSCs* $<1\text{Xe}^{-10}$ εξαιρέθηκαν από την πιο πέρα ανάλυση. Στη συνέχεια οι θέσεις των αλληλουχιών στο γένωμα προσδιορίστηκε με τη χρήση του αλγορίθμου <http://solgenomics.net/tools/blast/index.pl> έναντι της βάσης Tomato WGS chromosomes SL 2.40. Περιοχές 300kb εκατέρωθεν των γονιδίων *OSCs* της τομάτας διερευνήθηκαν για την ύπαρξη γονιδίων που σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών. Η πρόβλεψη της ύπαρξης γονιδίων στις συγκεκριμένες περιοχές του γενώματος έγινε με τη χρήση δύο λογισμικών εντοπισμού γονιδίων. Έτσι το πρώτος αλγόριθμος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο FGENESH <http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=fgenes&group=programs&subgroup=gfind> και ο δεύτερος ο Gene-Scanwebserver <http://genes.mit.edu/GENSCAN.html> (Burge and Karlin, 1998).

Στη συνέχεια τα προβλεπόμενα από τα προγράμματα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs) διερευνήθηκαν με τον αλγόριθμο blastp του NCBI http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome ώστε να διαπιστωθεί η ομολογία τους με πρωτεΐνες ήδη χαρακτηρισμένες για τη λειτουργία τους.

Στο γένωμα της τομάτας εντοπίστηκαν πέντε περιοχές στις οποίες οι *OSCs* περιστοιχίζονται από γονίδια που πιθανά να εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών όπως κυτοχρώματα, μεταφοράσες του αμινοβουτυρικού, αμινομεταφοράσες, μεταφοράσες ακυλίων, μεταφοράσες σακχάρων, πεκτινестεράσες και κινάσες. Οι περιοχές αυτές χαρακτηρίστηκαν και παρουσιάζονται για πρώτη φορά ως οργανωμένα εργαλεία γονιδίων για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών (Εικόνα 1, 2).



Εικόνα 1. Η παρουσίαση της οργάνωσης συστοιχιών των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών σε γενετικούς τόπους των χρωμοσωμάτων της τομάτας.



Εικόνα 2. Φυλογενετικά δένδρα των πρωτεϊνικών αλληλουχιών των (a) OSCs και των (b) CYPs οι οποίες είτε σχετίζονται με τη βιοσύνθεση των τερπενοειδών είτε σχηματίζουν συστοιχίες γονιδίων για τη βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο (neighbour-joining) με 1000 bootstrap επαναλήψεις. Η κλίμακα αντιπροσωπεύει τον αριθμό αντικατάστασης των αμινοξέων σε κάθε αναλνόμενο μέλος. Τα ίδια σύμβολα και όμοιοι αριθμοί αντιστοιχούν γονίδια που βρίσκονται στις ίδιες συστοιχίες γονιδίων.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάλυση των χρωμοσωμικών περιοχών του γενώματος όπου εδράζονται τα γονίδια των OSCs έδειξε ότι υπάρχουν γειτονικά γονίδια που πιθανότατα εμπλέκονται στη βιοσύνθεση των τριτερπενοειδών και των στερολών. Τα συγκεκριμένα γονίδια μπορεί να εμπλέκονται στην τροποποίηση μορίων τριτερπενοειδών και στην ενεργοποίησή τους. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε:

- Υπάρχουν πέντε γενωματικές περιοχές στη τομάτα που συσσωρεύονται γονίδια που κωδικοποιούν για ένζυμα που συμμετέχουν στη βιοσύνθεση των τριτερπενίων και στερολών.
- Τέσσερις από τις πέντε γενωματικές περιοχές φαίνεται να είναι λειτουργικές ενώ η τελευταία φαίνεται να έχει ένα διακεκομμένο γονίδιο συνθάσης της κυκλοαρτενόλης.
- Πέρα από τις κυκλάσες και τα κυτοχρώματα εντοπίστηκαν και άλλα γονίδια όπως μεταφοράσες που εμπλέκονται στο δευτερογενή μεταβολισμό.
- Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι γονίδια που βρίσκονται στην ίδια συστοιχία δε συσχετίζονται γενετικά. Με άλλα λόγια τα φυλογενετικά δένδρα των κυκλασών και των κυτοχρωμάτων που γειτνιάζουν αποκλίνουν και δε σχετίζονται γενετικά δείχνοντας ότι οι συστοιχίες σχηματίζονται και διαμορφώνονται *de novo* στα διάφορα φυτικά είδη.
- Η γενετική θεωρία της κληροδότησης των γενετικών συστοιχιών από κοινό πρόγονο δε φαίνεται να ισχύει ενώ υπερισχύει η δημιουργία τους μέσω της εξελικτικής πίεσης.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Field, B., & Osbourn, A. E. (2008). Metabolic diversification--independent assembly of operon-like gene clusters in different plants. *Science*, 320(5875), 543-547.

Field, B., Fiston-Lavier, A. S., Kemen, A., Geisler, K., Quesneville, H., & Osbourn, A. E. (2011). Formation of plant metabolic gene clusters within dynamic chromosomal regions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(38), 16116-16121.

Guenther, A., Karl, T., Harley, P., Wiedinmyer, C., Palmer, P.I., and Geron, C., 2006. Estimates of global terrestrial isoprene emissions using MEGAN (model of emissions of gases and aerosols from nature). *Atmos. Chem. Phys.* 6, 3181–3210, 2006

Haralampidis, K., Trojanowska, M. and Osbourn, A.E. 2001a. Biosynthesis of triterpenoid saponins in plants. *Adv. Biochem. Eng./Biotechnology* 75: 31–49

Hayashi, H., Huang, P., Takada, S., Obinata, M., Inoue, K., Shibuya, M., and Herrera, J., Bartel, B., Wilson, W., and Matsuda, S., 1998. Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* lupeol synthase gene. *Phytochemistry*, 49:7: 1905- 1911.

Hostettmann, K.A. and Marston, A. 1991. Saponins (*Cambridge Univ. Press*, Cambridge, UK).

Husselstein-Muller, T., Schaller, H. and Benveniste, P. 2001. Molecular cloning and expression in yeast of 2,3-oxidosqualenetriterpenoid cyclases from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 45: 75–92.

Iturbe-Ormaetxe, I., Haralampidis, K., Papadopoulou, K., and Osbourn, A., 2003. Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Molecular Biology*, 51: 731-743.

Keeling, Cl., Bolmann, J., 2006. Genes, enzymes, and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defence of conifers against insects and pathogens. *New. Phytol.* 170: 657-675.

Kusari, S., Lamshöft, M., Zühlke, S., Spiteller, M., 2008. An endophytic fungus from *Hypericum perforatum* that produces hypericin. *Journal of Natural Products* 71, 159-162.

Kushiro, T., Shibuya, M., and Ebizuka, Y., 1999. Cryptic Regiospecificity in Deprotonation Step of Triterpene Biosynthesis Catalysed by New Members of Lupeol Synthase, *Tetrahedron Letters*, 40:30:5553-5556.

Kushiro, T., Shibuya, M., Masuda, K. and Ebizuka, Y. 2000. A novel multifunctional triterpene synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Letts.* 41: 7705–7710.

Morita, M., Shibuya, M., Kushiro, T., Masuda, K. and Ebizuka, Y. 2000. Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from pea (*Pisum sativum*) – New alpha-amyrinproducing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *Eur. J. Biochem.* 267 (12): 3453–3460.

Mugford, S. T., & Osbourn, A. (2011). Evolution of serine carboxypeptidase-like acyltransferases in the monocots. *Plant Signal Behav*, 5(2), 193-195.

Mugford, S. T., Qi, X., Bakht, S., Hill, L., Wegel, E., Hughes, R. K., Papadopoulou, K., Melton, R., Philo, M., Sainsbury, F., Lomonossoff, G. P., Roy, A. D., Goss, R. J., & Osbourn, A. (2009). A serine carboxypeptidase-like acyltransferase is required for synthesis of antimicrobial compounds and disease resistance in oats. *Plant Cell*, 21(8), 2473-2484.

Mylona, P., Owatworakit, A., Papadopoulou, K., Jenner, H., Qin, B., Findlay, K., Hill, L., Qi, X., Bakht, S., Melton, R., & Osbourn, A. (2008). Sad3 and Sad4 Are Required for Saponin Biosynthesis and Root Development in Oat. *Plant Cell*.

Orlova, I., Marshall-Colón, A., Schnepf, J., Wood, B., Varbanova, M., Fridman, E., Blakeslee, J.J., Peer, W.A., Murphy, A.S., Rhodes, D., Pichersky, E., and Dudareva, N. 2006. Reduction of Benzoid Synthesis in Petunia Flowers Reveals Multiple Pathways to Benzoic Acid and Enhancement in Auxin Transport. *The Plant Cell.*, 18:3458-3475.

Osbourn, A. (2010). Gene clusters for secondary metabolic pathways: an emerging theme in plant biology. *Plant Physiol*, 154(2), 531-535.

Osbourn, A. E., & Field, B. (2009). Operons. *Cell Mol Life Sci*, 66(23), 3755-3775.

Papadopoulou, K., Melton, R.E., Leggett, M., Daniels, M.J., and Osbourn, A.E., 1999. Compromised disease resistance in saponin-deficient plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999, 96:12923-12928.

Phillips, D., Rasbery, J., Bartel, B., Matsuda, S., 2006. Biosynthetic diversity in plant triterpene cyclization. *Current Opinion in Plant Biology*, 9:305-314.

Price, K.R., Johnson, I.T. and Fenwick, G.R. 1987. The Chemistry and biological significance of saponins in food and feedingstuffs. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 26: 27–135

Qi, X., Bakht, S., Leggett, M., Maxwell, C., Melton, R., & Osbourn, A. (2004). A gene cluster for secondary metabolism in oat: Implications for the evolution of metabolic diversity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 8233-8238.

Qi, X., Bakht, S., Qin, B., Leggett, M., Hemmings, A., Mellon, F., Eagles, J., Werck-Reichhart, D., Schaller, H., Lesot, A., Melton, R., & Osbourn, A. (2006). A different function for a member of an ancient and highly conserved cytochrome P450 family: From essential sterols to plant defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(49), 18848-18853.

Sawai, S., Shindo, T., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Ayabe, S., Aoki, T., 2005. Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus*. *Plant Science* 170 (2006) 247-257.

Sawai, S., Shindo, T., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Ayabe, S., & Aoki, T. (2006). Functional and structural analysis of genes encoding oxidosqualene cyclases of *Lotus japonicus*. *Plant Science*, 170(2), 247-257.

Shibuya, M., Xiang, T., Katsube, Y., Otsuka, M., Zhang, H., & Ebizuka, Y. (2007). Origin of structural diversity in natural triterpenes: direct synthesis of seco-triterpene skeletons by oxidosqualene cyclase. *J Am Chem Soc*, 129(5), 1450-1455.

Shibuya, Zhang, Endo, Shishikura, Kushiro, Ebizuka, 1999. Two Branches of the Lupeol Synthase gene in the Molecular Evolution of Plant Oxidosqualene Cyclases. *Eur. J. Biochem.*, 266(1):302-307.

Vincken, J.-P., Heng, L., Groot, A., Gruppen, H., 2006. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* 68 (2007) 275-297.

Wegel, E., Koumproglou, R., Shaw, P., & Osbourn, A. (2009). Cell type-specific chromatin decondensation of a metabolic gene cluster in oats. *Plant Cell*, 21(12), 3926-3936.

Zwenger S., Chhandak B., 2008. Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* Vol. 3 (1), pp. 001-007