



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
AGRICULTURAL UNIVERSITY OF ATHENS

ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ & ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

ΠΜΣ: «ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: Χατζηδημητρίου Μαριάννα



ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ Χ. ΜΠΑΣΔΕΚΗ

ΑΘΗΝΑ 2018

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Τροφίμων Βιοτεχνολογίας & Ανάπτυξης

Τμήμα Βιοτεχνολογίας

Εργαστήριο Γενετικής

ΠΜΣ: «Βιολογία Συστημάτων»

Μεταπτυχιακή διατριβή

«Μεθυλίωση σε διαφορετικούς ιστούς και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια στην ελιά-ποικιλία ‘Κορωνέικη’»

Ευαγγελία Χ. Μπασδέκη

Αθήνα 2018

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Χατζηδημητρίου Μαριάννα

Μεταπτυχιακή διατριβή

«Μεθυλίωση σε διαφορετικούς ιστούς και σε διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια στην ελιά-ποικιλία ‘Κορωνέικη’»

Ευαγγελία Χ. Μπασδέκη

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ

Χατζηδημητρίου Μαριάννα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1. Χατζόπουλος Πολυδεύκης** Καθηγητής
Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Σχολή Τροφίμων Βιοτεχνολογίας & Ανάπτυξης
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- 2. Χατζηδημητρίου Μαριάννα** Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Εργαστήριο Γενετικής
Τμήμα Βιοτεχνολογίας
Σχολή Τροφίμων Βιοτεχνολογίας & Ανάπτυξης
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

- 3. Παπαδάκης Ιωάννης** Επίκουρος Καθηγητής
Εργαστήριο Δενδροκομίας
Τμήμα Φυτικής Παραγωγής
Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών & Περιβάλλοντος
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ομοιοπολική προσθήκη μεθυλομάδων (CH_3) στον 5' C του δακτυλίου της κυτοσίνης του DNA είναι μία πολύ σημαντική χημική τροποποίηση του γονιδιώματος. Η τροποποίηση αυτή δεν επιφέρει κάποια αλλαγή στο γενετικό κώδικα αλλά είναι κληρονομήσιμη και ονομάζεται μεθυλίωση. Τα επίπεδα της μεθυλίωσης είτε συνοδεύουν είτε προαναγγέλλουν κάποια μετάβαση σε διαφορετικό αναπτυξιακό στάδιο μίας πληθώρας φυτών. Σκοπός της παρούσας εργασίας, είναι η μελέτη των επιπέδων μεθυλίωσης κατά τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια της ελιάς (*Olea europaea* L.) στην ποικιλία Κορωνέικη. Το είδος αυτό επιλέχθηκε λόγω της οικονομικής σημασίας της καλλιέργειας της ελιάς στην Ελλάδα καθώς και γιατί δεν έχει ακόμη μελετηθεί διεξοδικώς η μεθυλίωση της ελιάς. Η ελιά καλλιεργείται στη λεκάνη της Μεσογείου περίπου από το 4.000 π.Χ.. Η κοινωνικοοικονομική της σημασία για τους λαούς της περιοχής είναι πολύ μεγάλη. Η Ελλάδα κατέχει την τρίτη θέση στην παγκόσμια κατάταξη των ελαιοπαραγωγικών χωρών και τη δεύτερη θέση στην Ευρωπαϊκή Ένωση στην παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς. Για τη διερεύνηση των επιπέδων μεθυλίωσης απομονώθηκε DNA, από φύλλα, άνθη και καρπούς της ελιάς με τη μέθοδο CTAB και έγιναν πέψεις με τα ένζυμα MspI, HpaII και ClaI. Πραγματοποιήθηκε ανάλυση των προϊόντων κατά Southern και ακολούθησε ο υβριδισμός. Για τον υβριδισμό και την ανίχνευση αξιοποιήθηκε ανιχνευτής για την κωδική περιοχή του 5S rRNA στην ελιά ο οποίος ενισχύθηκε με τους εκκινητές 5S-rDNAFOe και 5S-rDNA ROe το μέγεθος του οποίου ήταν 305bp, οι 123bp είναι της κωδικής αλληλουχίας του 5S rRNA γονιδίου και οι λοιπές 182bp ανήκουν στη μη μεταγραφόμενη περιοχή πριν και μετά αυτής. Η σήμανση του ανιχνευτή και η ανίχνευση του σήματος υβριδισμού έγινε σύμφωνα με το Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II της Roche. Οι πέψεις με τα ένζυμα MspI και HpaII έδωσαν μία ζώνη υβριδισμού ίδιου μεγέθους για όλα τα δείγματα. Το μέγεθος της ζώνης υβριδισμού που ανιχνεύθηκε ήταν περίπου 390bp. Στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και στους διαφορετικούς ιστούς που πραγματοποιήθηκε ανάλυση δεν παρατηρήθηκε μεθυλίωση στην αλληλουχία CCGG εκατέρωθεν του σημείου πρόσδεσης του ανιχνευτή. Προτείνεται αλληλούχιση του 5S rRNA στη μεταγραφόμενη και μη περιοχή του και περαιτέρω διερεύνηση της μεθυλίωσης των περιοχών αυτών στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και σε διαφορετικούς ιστούς της ελιάς με sodium bisulfite.

Εργαστήριο Γενετικής, Γ.Π.Α.

Λέξεις-Κλειδιά: μεθυλίωση, ελιά, Southern, 5S rRNA

ABSTRACT

The covalent addition of methyl groups (CH₃) to the 5' C of the cytosine residue in DNA is a very important chemical modification of the genome. This modification is called methylation and while it is an inherited trait it does not alter the genetic code. Methylation levels either accompany or predict a transition to a different developmental stage in a wide range of plants. This research studies the levels of methylation in various stages of development and different tissues of the olive tree (*Olea europaea* L.) variety "Koroneiki". The olive species was selected due to its economic importance in Greece and because methylation studies in olive are limited. The olive tree has been cultivated in the Mediterranean basin approximately since 4,000 BC. Its socio-economic significance for the people of the region is great. Greece, ranks third in the world ranking of olive oil producing countries and is the second largest producer of table olives in the European Union. To investigate methylation levels, DNA was isolated from leaves, flowers and drupes according to the CTAB method and it was then digested with the enzymes MspI, HpaII and ClaI. Southern product analysis was performed, followed by hybridization. Hybridization and detection utilized a probe for the 5S rRNA coding region in olive tree which was amplified with the engineered 5S-rDNAFOe and 5S-rDNAROe primers. The size of the probe is 305bp, 123bp is the 5S rRNA's coding region and the rest 182bp belong to the non-transcribed region before and after the coding sequence. The probe labeling as well as the detection of the hybridization signal took place according to Roche's Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II. Digestions with the enzymes MspI and HpaII detected one hybridization band of the same size for all samples. The size of the hybridization band is approximately 390bp. In different developmental stages and in different tissues no methylation was observed in the CCGG sequence on either side of the probe's binding site. Sequencing of the transcribed and non-transcribed regions of 5S rRNA in olive tree is recommended as well as a further investigation of these regions' methylation at different developmental stages and in different tissues with the usage of sodium bisulfite method.

Laboratory of Genetics, A.U.A

Keywords: methylation, olive, Southern, 5S rRNA

Ευχαριστίες

Η ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την βοήθεια ορισμένων ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα Αναπληρώτρια Καθηγήτριά κα. Μαριάννα Χατζηδημητρίου για την ανάθεση της παρούσας μελέτης και την καθοδήγησή της κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω για τις διορθώσεις, τις συμβουλές και την καθοδήγησή του στην παρούσα εργασία τον Καθηγητή κο Πολυδεύκη Χατζόπουλο. Για τις διορθώσεις του θα ήθελα να ευχαριστήσω και τον Επίκουρο Καθηγητή κο Ιωάννη Παπαδάκη. Όπως επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω και όλα τα άτομα του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας για την πολύτιμη βοήθειά και καθοδήγησή τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου και τους φίλους μου για την κατανόησή τους τόσο κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης της μεταπτυχιακής μου μελέτης όσο και κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο- ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	9
1.1 Καταγωγή και εξάπλωση της ελιάς	9
1.2 Σημασία της ελαιοκαλλιέργειας.....	14
1.3 Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς και περιγραφή των κύριων χαρακτηριστικών του ελαιόδενδρου	18
1.3.1 Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς.....	18
1.3.2 Περιγραφή των κύριων χαρακτηριστικών του ελαιόδενδρου	19
1.4 Μεθυλίωση του DNA	23
1.5 CpG νησίδες, CpHpG & CpHpH.....	27
1.6 Μεθυλίωση σε φυτικά κύτταρα	28
1.7 Τεχνικές ανίχνευσης μεθυλίωσης	31
1.8 Ένζυμα περιορισμού	34
1.8.1 Δράση ενζύμων περιορισμού.....	36
1.8.2 Πέψεις με ένζυμα περιορισμού.....	37
1.9 PCR.....	38
1.9.1 Τα στάδια της PCR	40
1.9.2 Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PCR	41
1.10 Southern blot.....	41
1.11 Υβριδισμός.....	45
1.12 Σήμανση και ανίχνευση	47
1.13 Ανιχνευτής	48
1.14 Το 5S rRNA ως ανιχνευτής	50
1.15 TEMPRANILLO και anthocyanidin synthase.....	52

1.16 Σκοπός του πειράματος.....	53
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	54
2.1 Φυτικό υλικό	54
2.2 Συσκευές	55
2.3 Απομόνωση DNA	56
2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA	57
2.5 Ένωση δειγμάτων	60
2.6 Συγκέντρωση των δειγμάτων.....	61
2.7 Ενίσχυση TEMPRANILLO και anthocyanidin synthase	63
2.8 Sodium bisulfite	64
2.9 Ενίσχυση του 5S rRNA ανιχνευτή	68
2.10 Απομόνωση του ανιχνευτή από πηκτή αγαρόζης	73
2.11 Σήμανση του ανιχνευτή	74
2.12 Έλεγχος απόδοσης του Kit	75
2.13 Καθορισμός αποδοτικότητας της σήμανσης.....	78
2.14 Πέψεις	81
2.15 Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης	84
2.16 Μεταφορά νουκλεϊκών οξέων κατά Southern	86
2.17 Υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων	87
2.18 Ανίχνευση σήματος υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων	88
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο – ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	90
3.1 ClaI.....	90
3.2 MspI.....	93
3.3 HpaII	95

3.4 5S rRNA στην ελιά	97
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο – ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	101
4.1 Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	101
4.2 Γενικά Συμπεράσματα	107
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	109
Ξένη βιβλιογραφία.....	109
Ελληνική βιβλιογραφία.....	115
Διαδίκτυο	116
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	117

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καταγωγή και εξάπλωση της ελιάς

Η ιστορία της ελιάς χάνεται στα βάθη του χρόνου. Το ελαιόδενδρο αποτέλεσε ένα σημαντικό και αναπόσπαστο στοιχείο στην εξέλιξη των πολιτισμών της Μεσογείου (Βασιλακάκης, 2016). Η ελιά αποτελούσε ένα βασικό στοιχείο της διατροφής αυτών των λαών, το ξύλο και το λάδι της έπαιζαν σημαντικό ρόλο στην καθημερινότητά τους αλλά και στην οικονομία τους. Η ελιά, στους περισσότερους αρχαίους πολιτισμούς, οι οποίοι πλαισίωναν την Μεσόγειο, κατείχε κεντρικό ρόλο στην εκάστοτε θρησκεία.

Στην Ελληνική μυθολογία η σημασία της ελιάς είναι ολοφάνερη. Το όνομα της μεγαλύτερης πόλης-κράτους της εποχής, της Αθήνας, είναι άρρηκτα συνδεδεμένο με την παρουσία της ελιάς. Σύμφωνα με το μύθο, η θεά Αθηνά και ο θεός Ποσειδώνας ήθελαν και οι δύο την θέση του προστάτη της πόλης. Γι' αυτό το λόγο εμφανίστηκαν στον Κέκροπα –τον πρώτο βασιλιά της Αθήνας- ο οποίος κλήθηκε βάσει του δώρου



που θα προσέφεραν οι θεοί, να διαλέξει το καλύτερο. Ο θεός Ποσειδώνας προσέφερε άφθονο νερό στην πόλη-κράτος καθώς με ένα κτύπημα της τρίαινάς του, εμφανίστηκαν γαργαριστά νερά σε

ρυάκια. Η θεά Αθηνά χτυπώντας το δόρυ της στη γη παρουσίασε στον Κέκροπα την ελιά. Ο βασιλιάς Κέκροπας διάλεξε το δώρο της θεάς Αθηνάς καθιστώντας την ταυτόχρονα και προστάτιδα της πόλης. Ο θεός Ποσειδώνας θυμωμένος αναίρεσε με ένα χτύπημα της τρίαινάς του το δώρο του, οδηγώντας έτσι την πόλη σε λειψυδρία. Η Μυρία ελαιά, όπως ονομάστηκε το δώρο της θεάς Αθηνάς, αποτέλεσε ιερό σημείο για τους πιστούς του δωδεκαθέου για πολλά χρόνια. Μία άλλη εκδοχή αυτής της ιστορίας υποστηρίζει και αυτή ότι ο βασιλιάς Κέκροπας ήταν εκείνος που έφερε την ήμερη ελιά στην Αθήνα. Ο Κέκροπας, σύμφωνα με αυτήν την εκδοχή, όταν γύρισε από ταξίδι του στην Αίγυπτο έφερε μαζί του το πρώτο δένδρο ήμερης ελιάς στην πόλη του. Στην συνέχεια, η Αθήνα αποτέλεσε (και στις δύο εκδοχές) το κεντρικό σημείο διάδοσης της ελιάς, τόσο σε άλλα σημεία του ελλαδικού χώρου όσο και της Ευρώπης (Ποντίκης, 2000, Θεριός, 2005).

Τους μύθους όμως και τους θρύλους υποστηρίζουν διάφορα αρχαιολογικά ευρήματα. Σε ανασκαφές, έχουν βρεθεί απολιθωμένα φύλλα ελιάς των οποίων η ηλικία υπολογίστηκε στα 50.000-60.000 έτη. Στα νησιά Σαντορίνη και Νίσυρος έχουν εντοπιστεί απολιθωμένα φύλλα παρόμοιας ηλικίας (Friedrich & Velitzelos, 1986). Παρομοίως, η ύπαρξη ξύλου ελαιόδενδρου από την κοιλάδα του Ιορδάνη χρονολογήθηκε από το 42.980 π.Χ. (Θεριός, 2005).

Από τα αρχαιότερα έγγραφα στα οποία γίνεται αναφορά στην καλλιέργεια της ελιάς, είναι ένας Αιγυπτιακός πάπυρος του 16^{ου} αιώνα π.Χ.. Στον ελλαδικό χώρο, οι αντίστοιχες γραπτές αναφορές (σε γλώσσα γραμμική Β'), χρονολογήθηκαν στον 14^ο αιώνα π.Χ. σε εύρημα της Κνωσού και στον 13^ο αιώνα π.Χ. σε εύρημα το οποίο ανακαλύφθηκε στην Πήλο. Τα ιδεογράμματα αυτών των ευρημάτων παρουσιάζουν την παραγωγή και διακίνηση ελαιόλαδου. Τα ίδια ιδεογράμματα επιβεβαιώνουν την ύπαρξη αρωματικών ελαιόλαδων, τα οποία φαίνεται ότι αποτελούσαν κύριο στοιχείο εμπορίας για τους αρχαίους Έλληνες (Θεριός, 2005).

Υπάρχουν πολλά ακόμη αρχαιολογικά ευρήματα τα οποία ενισχύουν την ύπαρξη και τη σημασία της ελιάς για τους αρχαίους Έλληνες. Κατά καιρούς, έχουν βρεθεί νομίσματα διαφόρων ιστορικών περιόδων τα οποία αναπαριστούν την ελιά. Επιπλέον, υπάρχουν καντήλια και λυχνάρια του 4^{ου} αιώνα π.Χ. κατασκευασμένα από μέταλλο ή χαλκό στα οποία έχουν βρεθεί υπολείμματα λαδιού. Ο Σοφοκλής και ο Αριστοφάνης έκαναν συχνά λόγο για την ελιά και την καλλιέργειά της, στοιχείο που υποδεικνύει ότι τον 5^ο αιώνα π.Χ. οι κάτοικοι της Αθήνας επιδίδονταν στην ελαιοκαλλιέργεια (Θεριός, 2005).



Από την 4^η χιλιετηρίδα π.Χ. έχουν βρεθεί κατάλοιπα ελιάς σε νεολιθικό οικισμό της Μάνης, ενώ από την 3^η χιλιετηρίδα π.Χ. υπάρχουν ενδείξεις οι οποίες υποστηρίζουν την έναρξη της καλλιέργειας στον ελλαδικό χώρο. Η εντατικοποίηση όμως της καλλιέργειας έχει καταγραφεί σε αναπαραστάσεις της ύστερης εποχής του χαλκού (1.600-1.100 π.Χ.) (Θεριός, 2005).

Η σημασία της ελαιοκαλλιέργειας για τους αρχαίους Έλληνες, μπορεί να γίνει εύκολα αντιληπτή μέσα από μία πληθώρα στοιχείων. Από την εποχή του Σόλωνα υπήρχε σε ισχύ ένας νόμος ο οποίος αφορούσε την διαχείριση των ελαιόδενδρων. Απαγορευόταν πυκνότερη φύτευση του 1 ελαιόδενδρου ανά 9μ., όπως απαγορευόταν το ξερίζωμα περισσότερων των 2 ελαιόδενδρων ανά έτος. Ακόμα, ο αρχαιολόγος P.Warrey κατά τις ανασκαφές και μελέτες που διεξήγαγε στην Μύρτο της Ιεράπετρας, συγκέντρωσε πληροφορίες για το σύστημα της καλλιέργειας ελαιόδενδρων από την πρώιμη εποχή του χαλκού. Ένα ακόμη αδιάψευστο στοιχείο, είναι η διάκριση της ποιότητας του ελαιόλαδου σε τρεις κλίμακες. Το λάδι άριστης ποιότητας, το οποίο προέρχονταν από άγουρες ελιές, ονομάζονταν “ωμοτιβές” ή “ωμωάκινον”. Το καλής ποιότητας λάδι ονομαζόταν “δεύτερον γεύματος”. Ενώ το κατώτερης ποιότητας λάδι, το οποίο προέρχονταν από υπερώριμες ή χτυπημένες ελιές ονομαζόταν “χυδαίον έλαιον” (Θερίος, 2005).

Η σημασία όμως της ελιάς για τους αρχαίους πολιτισμούς προέκυψε από τον ρόλο που κατείχε στην καθημερινότητά τους. Η ελιά αποτελούσε βασικό στοιχείο διατροφής για τους Μεσογειακούς λαούς εξαιτίας τόσο του καρπού της όσο και του λαδιού το οποίο προκύπτει από τη σύνθλιψη αυτών. Τα οφέλη της ελιάς όμως δεν περιορίζονταν στην διατροφή των ανθρώπων. Το ξύλο των δένδρων αποτελούσε συχνά καύσιμη ύλη για τη θέρμανση των σπιτιών, ενώ το λάδι αξιοποιούνταν πέραν της μαγειρικής και για φωτισμό σε λυχνάρια (Θερίος, 2005).

Επιπροσθέτως, το λάδι χρησιμοποιούνταν για τη σωματική υγιεινή τόσο των αντρών όσο και των γυναικών. Υπάρχουν αναφορές οι οποίες υποδεικνύουν ότι η χρήση του ελαιόλαδου είχε ως στόχο την προστασία από τον ήλιο ή το ψύχος. Τα πιο εύπορα άτομα της εποχής, μετά το λουτρό τους χρησιμοποιούσαν σε σώμα και κόμη αρωματικό λάδι. Αργότερα, με την πάροδο των χρόνων, το λάδι άρχισε να χρησιμοποιείται ως βάση για την κατασκευή αρωμάτων. Οι θεραπευτικές ιδιότητες του λαδιού δεν άργησαν να γίνουν αντιληπτές από τους αρχαίους οι οποίοι το χρησιμοποιούσαν για δερματικές παθήσεις, αλλά και ως επουλωτικό και αντισηπτικό τραυμάτων. Τα φύλλα και τα άνθη της ελιάς δεν έμεναν ανεκμετάλλευτα, αντιθέτως χρησιμοποιούνταν για την παρασκευή αφεψημάτων τα οποία χρησιμοποιούνταν ως κολλύριο (Θερίος, 2005).

Η σημασία της ελιάς για τον άνθρωπο δεν εξαλείφθηκε με την πάροδο των αιώνων, ενώ οι τρόποι χρήσης της αυξάνονταν συνεχώς. Ακόμη και με την αλλαγή σημαντικών πτυχών της ζωής των ανθρώπων, όπως η σταδιακή υποχώρηση του δωδεκάθεου και η ταυτόχρονη εξάπλωση του Χριστιανισμού, ο ρόλος που κατείχε η ελιά στην καθημερινότητα των ανθρώπων δεν άλλαξε. Το ελαιόλαδο κατά την αρχαιότητα αποτελούσε πολύτιμο αφιέρωμα για τις θεότητες. Με την έλευση του Χριστιανισμού αυτό δεν άλλαξε καθώς το ελαιόλαδο ενσωματώθηκε σε πολλά στοιχεία των τελετουργιών της νέας θρησκείας. Αλλά και το ελαιόδενδρο δεν έχασε την σημασία του κατά την μετάβαση αυτή. Η ελιά κατά τους αρχαίους αποτελούσε ένα σύμβολο σοφίας, ειρήνης και νίκης γι' αυτό άλλωστε στους Ολυμπιονίκες προσφέρονταν ένα κλαδί από την ιερή ελιά ως στεφάνι. Για τον χριστιανισμό, το κλαδί της ελιάς το οποίο έφερε το περιστέρι στο Νώε, συνεχίζει να είναι ένα σύμβολο γαλήνης και ειρήνης. Παρατηρείται μία παρόμοια πορεία στην χρήση του ελαιόλαδου και στις δύο θρησκείες. Αρχικά, οι προσφορές των πιστών του δωδεκάθεου αποτελούνταν από απλό αγνό ελαιόλαδο, όπως αρχικά και το Άγιο Μύρο αποτελούνταν από απλό αγιασμένο λάδι πάνω στην Αγία Τράπεζα. Στη συνέχεια όμως-και στις δύο περιπτώσεις- το λάδι πριν προσφερθεί στις θεότητες ή χρησιμοποιηθεί στις τελετές αντιστοίχως, εμπλουτιζόταν με αρώματα όπως μοσχοκάρυδο, ροδέλαιο, λάβδανο, κάρδαμο κ.λπ. (Θεριός, 2005).

Φυσικά, η ελιά δεν επηρέασε μόνο τον αρχαίο ελληνικό πολιτισμό στην εξέλιξή του, αλλά όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως και άλλους λαούς. Υπάρχει πληθώρα αντίστοιχων αρχαιολογικών ευρημάτων τα οποία υποστηρίζουν την ύπαρξη της ελιάς αλλά και την εκμετάλλευσή της σε άλλες αρχαίες πόλεις και οικισμούς. Έχει αναφερθεί η ύπαρξη αιγυπτιακού παπύρου από τον 16^ο αιώνα π.Χ. ο οποίος αναφέρεται στην καλλιέργεια της ελιάς. Πληθώρα αναφορών στην ελιά και την καλλιέργειά της εντοπίζονται και στην Παλαιά Διαθήκη. Οι αναφορές αυτές κατά κύριο λόγο αφορούν περιοχές της Μέσης Ανατολής και ιδιαίτερα του Ισραήλ.

- Τους ελαιώνες και αμπελώνες παραγγέλλει ο Θεός στο Μωσή να αφήνει κάθε έβδομο χρόνο στη διάθεση των φτωχών για τη συλλογή του καρπού.
- Ο Θεός υπόσχεται στους Ισραηλίτες να ποτίσει τη γη με βροχή για να συλλέξουν λάδι και σιτάρι.

Αλλά και η Καινή Διαθήκη συνεχίζει τις αναφορές στην ελιά στην περιοχή του Ισραήλ (Θεριός, 2005).

- Λαμπάδες και λάδι κρατούν στο χέρι οι πέντε φρόνιμες παρθένες όταν πήγαν να υποδεχθούν τον Ιησού, ενώ οι μωρές μόνο λαμπάδες. Αργότερα οι μωρές ζητούσαν από τις πέντε φρόνιμες λάδι γιατί θα έσβηναν οι λαμπάδες τους.
- Στο όρος των Ελαιών παρουσιάστηκε ο Ιησούς στους μαθητές του μετά την Ανάσταση και από το όρος των Ελαιών αναλήφθηκε στους ουρανούς.

Ο τόπος προέλευσης της ελιάς ακόμα και σήμερα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως. Οι περισσότεροι βοτανολόγοι θεωρούν ότι ο πιθανότερος τόπος προέλευσης της ελιάς είναι οι μεσογειακές χώρες, αν και διαφωνούν στο ποιες είναι αυτές οι χώρες. Σύμφωνα με τον A. De Candole (1880), πατρίδα της ελιάς πιθανολογείται πως είναι η περιοχή της Συρίας και της Μ. Ασίας. Η θεωρία αυτή βασίστηκε σε παρατηρήσεις της τοπογραφίας της περιοχής αλλά και του κυριότερου τύπου ελιάς ο οποίος παρατηρείται στην περιοχή αυτή. Οι πλαγιές των βουνών στη Β. Συρία, οι οποίες εντοπίζονται κοντά στην Τουρκία, είναι σκεπασμένες με άγριες ελιές. Επιπλέον, στην περιοχή που εκτείνονται η Συρία, η Παλαιστίνη και το Ισραήλ, έχει παρατηρηθεί η μεγαλύτερη γενετική παραλλακτικότητα της ελιάς· στοιχείο που υποστηρίζει την θεωρία καταγωγής της ελιάς από τη Συρία (Damania, 1995). Το 1974, ο Camps βασιζόμενος σε αναλύσεις άνθρακα και γύρης δειγμάτων από Ιβηρο-Μαυριτανικές περιοχές υποστήριξε ότι στη Β. Αφρική υπήρχαν αγριελιές από την 12^η χιλιετηρίδα. Αντίθετος με τις παραπάνω απόψεις υπήρξε ο Fisher, ο οποίος υποστήριξε το 1904 ότι η ελιά διαδόθηκε στην ανατολική Μεσόγειο δια μέσου του Ιράν έχοντας όμως ως τόπο καταγωγής την Β.Δ. Ινδία. Η θεωρία του βασίστηκε στο γεγονός ότι στην Β.Δ. Ινδία το γένος *Olea* εκπροσωπείται από ένα σεβαστό αριθμό διαφορετικών ειδών. Παρόλα αυτά, οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν ότι η παρουσία άγριων ελαιόδενδρων είναι ο καλύτερος βιοδείκτης προσδιορισμού των περιοχών που καλύπτονται από Μεσογειακή χλωρίδα (Rubio et al., 2002).

Στην διαμόρφωση του σημερινού τοπίου έχει παίξει σημαντικό ρόλο ο χρόνος και οι καιρικές συνθήκες. Η τεταρτογενής Μεσογειακή ζώνη, άνηκε παλαιότερα στην τροπική ζώνη και η ελιά ευδοκίμούσε σε αυτή. Η ξηρασία και οι παγετώνες όμως της πλειστοκαινίου περιόδου αποτέλεσαν τρόπους φυσικής επιλογής για σκληρόφυλλα φυτά με ικανότητα αποφυγής των παγετών. Με αυτόν τον τρόπο, ο αρχικός πληθυσμός της ελιάς μειώθηκε αφήνοντας πίσω μόνο τα άτομα τα οποία είχαν την ικανότητα να επιβιώσουν στους -5°C ή ακόμα και στους -12°C. Τέτοιες ακραίες θερμοκρασιακές

καταστάσεις, περιόρισαν την φυσική κατανομή της ελιάς και καθόρισαν την διάδοσή της (Θεριός, 2005).

Η διάδοση της ελιάς έγινε σταδιακά, ακολουθώντας διαφορετικές διαδρομές κάθε φορά. Από την Ελλάδα η ελιά κατευθύνθηκε στην Ιταλία και τη Γαλλία. Από την Αίγυπτο έφτασε στη Ν.Δ. Μεσόγειο και την Ισπανία. Παρόλο που η αμερικάνικη ήπειρος έχει παρόμοιο κλίμα με το μεσογειακό, η ελιά δεν ήταν αυτοφυής σε αυτή. Στο Νέο Κόσμο η ελιά μεταφέρθηκε τον 16^ο αιώνα από Ισπανούς αποίκους. Η ελιά από την Ευρώπη εξαπλώθηκε στην Καλιφόρνια και τη Ν. Αμερική. Αργότερα η καλλιέργειά της εισήχθη στην Αυστραλία και αρκετά πρόσφατα στην Κίνα, την Κορέα και την Ιαπωνία (Θεριός, 2005).

1.2 Σημασία της ελαιοκαλλιέργειας

Το ελαιόδενδρο είναι ένα υποτροπικό είδος, τυπικό της λεκάνης της Μεσογείου όπου αποτελεί το πιο σημαντικό ελαιοπαραγωγικό φυτό. Γι' αυτό το λόγο, η αξία της καλλιέργειάς του είναι ιδιαίτερα σημαντική. Από τα 800 εκατομμύρια ελαιόδενδρα τα οποία υπάρχουν στην υφήλιο, περίπου το 98% αυτών καλλιεργούνται στη λεκάνη της Μεσογείου. Η καλλιέργεια της ελιάς εντοπίζεται στην περιοχή αυτή εξαιτίας των άριστων εδαφοκλιματικών συνθηκών που επικρατούν οι οποίες είναι κατάλληλες για την ανάπτυξή της (Ποντίκης, 2000). Η παραγωγή του ελαιόλαδου εντοπίζεται στη Μεσόγειο και κυρίως στην Ισπανία, την Ιταλία, την Ελλάδα, την Τυνησία, τη Συρία, το Μαρόκο, την Τουρκία και την Πορτογαλία. Αυτές οι οκτώ χώρες καλύπτουν πάνω από το 90% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιόλαδου.

Πίνακας 1.1: Έκταση της περιοχής συγκομιδής ελιάς σε εκτάρια (ha) σύμφωνα με στοιχεία του FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations).

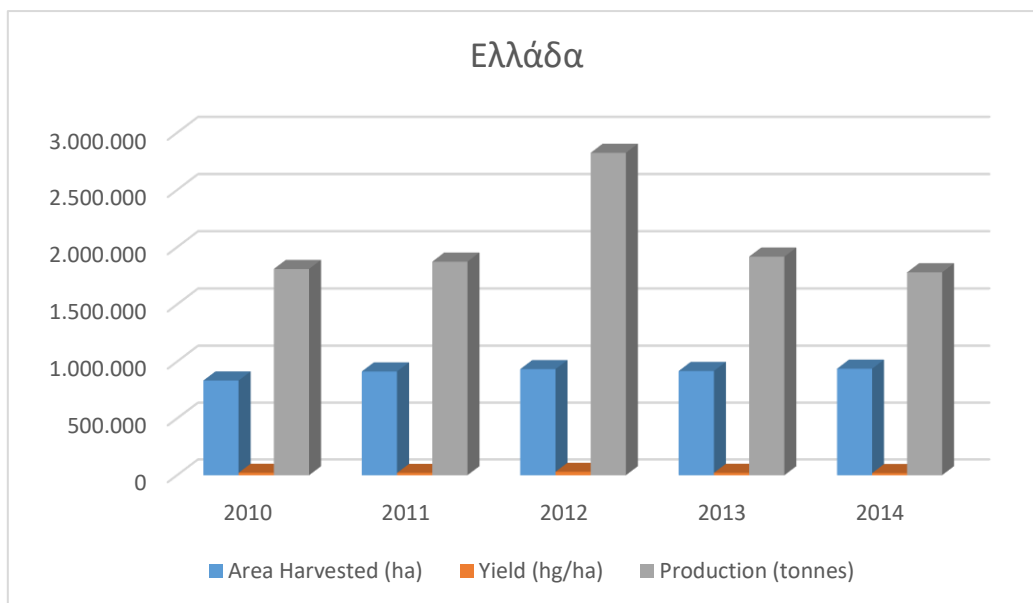
Area Harvested (ha)					
Year	2010	2011	2012	2013	2014
Spain	2.475.466	2.503.675	2.504.261	2.506.979	2.515.800
Italy	1.190.800	1.144.422	1.125.382	1.146.863	1.156.784
Greece	834.200	913.800	934.400	918.100	938.270
Tunisia	1.763.450	1.763.450	1.810.550	1.822.820	1.588.620
Syrian Arab Republic	647.458	684.490	695.711	697.442	697.028
Morocco	830.481	900.743	968.123	922.235	946.818
Turkey	742.700	786.300	805.500	825.827	826.092
Portugal	343.219	343.200	347.292	351.771	352.351

Πίνακας 1.2: Απόδοση της καλλιέργειας ελιάς σε hg/ha σύμφωνα με στοιχεία του FAO.

Yield (hg/ha)					
Year	2010	2011	2012	2013	2014
Spain	29.076	31.234	15.371	36.899	18.127
Italy	26.627	27.806	26.813	25.640	16.975
Greece	21.696	20.507	30.237	20.887	18.977
Tunisia	4.951	3.187	5.319	6.035	2.367
Syrian Arab Republic	14.833	15.998	15.089	12.074	5.627
Morocco	18.140	15.719	13.591	12.813	16.616
Turkey	19.052	22.256	22.595	20.295	21.402
Portugal	12.974	12.931	12.379	18.527	12.924

Πίνακας 1.3: Παραγωγή της καλλιέργειας ελιάς σε τόνους σύμφωνα με στοιχεία του FAO.

Production (tonnes)					
Year	2010	2011	2012	2013	2014
Spain	7.197.600	7.820.060	3.849.300	9.250.610	4.560.400
Italy	3.170.700	3.182.204	3.017.537	2.940.545	1.963.676
Greece	1.809.900	1.873.900	2.825.320	1.917.623	1.780.560
Tunisia	873.000	562.000	963.000	1.100.000	376.000
Syrian Arab Republic	960.403	1.095.043	1.049.761	842.098	392.214
Morocco	1.506.473	1.415.902	1.315.794	1.181.676	1.573.206
Turkey	1.415.000	1.750.000	1.820.000	1.676.000	1.768.000
Portugal	445.301	443.800	429.922	651.741	455.373



Γράφημα 1.1: Έκταση της περιοχής συγκομιδής ελιάς σε εκτάρια (ha), απόδοση της καλλιέργειας ελιάς σε hg/ha και παραγωγή της καλλιέργειας ελιάς σε τόνους σύμφωνα με στοιχεία του FAO για την Ελλάδα.

Η Ελλάδα, σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία του FAO, κατατάσσεται στην τέταρτη θέση ανάμεσα στις οκτώ προαναφερθείσες χώρες ελαιοπαραγωγής ως προς τις καλλιεργούμενες εκτάσεις της, τρίτη ως προς την απόδοση της καλλιέργειας ανά εκτάριο αλλά και την παραγωγή. Τα στατιστικά στοιχεία των **πινάκων 1.1, 1.2 & 1.3** εμφανίζουν κάποια παραλλακτικότητα ανά έτος. Η παραλλακτικότητα αυτή εντοπίζεται σε ένα σύνολο αιτιών, όπως το ότι δεν καλλιεργούνται κάθε χρόνο οι ίδιες εκτάσεις γης, είτε λόγω ανανέωσης των ελαιόδενδρων, είτε λόγω ασθενειών κ.ά. γι' αυτό και ο αριθμός των εκταρίων δεν είναι ο ίδιος κάθε χρόνο. Επίσης, η παραγωγή των ελαιόδενδρων επηρεάζεται από τις επικρατούσες καιρικές συνθήκες του κάθε έτους αλλά και από τις καλλιεργητικές φροντίδες που δέχονται τα δένδρα από τους παραγωγούς οπότε και η απόδοση των ελαιόδενδρων ανά εκτάριο διαφέρει αρκετά από έτος σε έτος.

Στην Ελλάδα, κατά την περίοδο 1987-1993 παρατηρήθηκε μία φθίνουσα πορεία για τις εκτάσεις (ha) της ελιάς. Η πραγματικότητα πίσω από αυτό το φαινόμενο αφορά κατά κύριο λόγο την εγκατάλειψη των καλλιεργούμενων εκτάσεων λόγω του οικονομικού κόστους της καλλιέργειάς τους και καλύτερων προσφορών εργασίας σε άλλο αντικείμενο. Τα κτήματα τα οποία όντως καταστράφηκαν λόγω πυρκαγιών ή άλλου τύπου καταστροφών είναι ελάχιστα. Την περίοδο αυτή καταγράφηκαν επίσης

μειώσεις τόσο στις αποδόσεις στην καλλιέργεια (hg/ha) όσο και στην παραγωγή ελιάς (tonnes) (FAO).

Την περίοδο 1994-2008, παρατηρήθηκε μία τάση αύξησης τόσο στις καλλιεργούμενες εκτάσεις της ελιάς (ha) όσο και στις αποδόσεις αυτής (hg/ha) και στην παραγωγή ελιάς (tonnes) (FAO). Κατά πολλούς, η αύξηση με την ενασχόληση της ελαιοκαλλιέργειας σχετίζεται με την υψηλή σχετικά οικονομική ενίσχυση που λάμβαναν έως το 1998 οι παραγωγοί για την καλλιέργεια της ελιάς. Υψηλή οικονομική ενίσχυση δίνονταν στη συνέχεια και έως το 2008 σε όσους είχαν βιολογικούς ελαιώνες. Επίσημα στοιχεία τα οποία να επιβεβαιώνουν αυτή την άποψη δεν υπάρχουν.

Από το 2009 και μετά οι εκτάσεις ελαιώνων οι οποίοι καλλιεργούνται (ha) έχουν μειωθεί συγκριτικά με την προηγούμενη περίοδο (1994-2008). Η μείωση αυτή πιθανότατα οφείλεται στη μείωση των οικονομικών ενισχύσεων που δέχονταν οι παραγωγοί. Ενώ οι καλλιεργούμενες εκτάσεις μειώθηκαν, η παραγωγή της ελιάς (tonnes) παραμένει σχεδόν σταθερή στα ίδια υψηλά επίπεδα με αυτά της προηγούμενης περιόδου (FAO). Η υψηλής ποσότητας και ποιότητας παραγωγή αυτής της περιόδου σχετίζεται άμεσα με την ενασχόληση νεαρών ατόμων με την ελαιοκαλλιέργεια οι οποίοι φαίνεται να ασκούν υψηλού επιπέδου καλλιεργητικές φροντίδες στους ελαιώνες τους.

Μέχρι πρότινος, η ελαιοκαλλιέργεια στην Ελλάδα αναπτυσσόταν κυρίως σε ορεινές και ημιορεινές περιοχές όπου δύσκολα επιβιώνουν άλλες καλλιέργειες λόγω φτωχών εδαφών και συχνά έλλειψης νερού. Η καλλιέργεια της ελιάς αποτελεί συχνά το κύριο εισόδημα για τους κατοίκους των περιοχών αυτών. Για τους κατοίκους όμως νησιών και παραθαλάσσιων περιοχών, η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί ένα συμπληρωματικό εισόδημα καθώς η κύρια ασχολία τους είναι συνήθως συνυφασμένη με τον τουρισμό. Η σημασία λοιπόν της ελαιοκαλλιέργειας για τους Έλληνες, είναι αρκετά εμφανής καθώς ολόκληρες οικογένειες στηρίζονται οικονομικά σε αυτή.

Το μεγαλύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι παραγωγοί στη χώρα μας είναι ο κατακερματισμός της γης. Οι καλλιεργούμενες εκτάσεις είναι πολύ μικρού μεγέθους ενώ συχνά, το ίδιο άτομο βρίσκεται να έχει στην κατοχή του κτήματα τα οποία είναι απομακρυσμένα μεταξύ τους. Η μικρή έκταση και οι μεγάλες αποστάσεις μεταξύ των κτημάτων οδηγούν στο αυξημένο κόστος καλλιέργειας των ελαιώνων (και όχι μόνο). Με την επανένταξη πολλών νέων στην ελαιοκαλλιέργεια λόγω της

οικονομικής κρίσης, είναι εμφανής η προσπάθεια επίλυσης όλων αυτών των θεμάτων. Σε κάποιες περιοχές, οι νέοι παραγωγοί ιδρύουν συνεταιρισμούς με στόχο να μειώσουν τα καλλιεργητικά έξοδα αλλά και να πετύχουν καλύτερες τιμές στην αγορά για τα προϊόντα τους (μειώνοντας ταυτόχρονα και τον μεταξύ τους ανταγωνισμό).

Παλαιότερα, οι ελαιοπαραγωγοί στην Ελλάδα αντιμετώπιζαν προβλήματα στο να πετύχουν καλές τιμές στη διεθνή αγορά καθώς είχαν απέναντί τους άλλες ελαιοπαραγωγικές χώρες. Χώρες όπως η Ισπανία και η Ιταλία, οι οποίες είναι ικανές να παράγουν μεγάλες ποσότητες λαδιού και να καταλάβουν το μεγαλύτερο μέρος της αγοράς. Οι καταναλωτές όμως πλέον είναι πιο ευαισθητοποιημένοι και ενήμεροι για τις τροφές που θέλουν να έχουν στο τραπέζι τους, γι' αυτό και επικεντρώνονται στην ποιότητα των τροφίμων. Ευτυχώς για τη χώρα μας, το πρόβλημα που πάντα αντιμετώπιζε ήταν η ποσότητα παραγωγής και όχι η ποιότητα, έτσι κατάφερε να ισχυροποιήσει την θέση της στις διεθνείς αγορές.

Υπάρχουν πολλά θετικά γεγονότα τα οποία έχουν συμβάλει στην άνοδο των επιπέδων κατανάλωσης ελαιοκομικών προϊόντων. Το κυριότερο στοιχείο το οποίο έχει οδηγήσει στην παγκόσμια ανοδική τάση κατανάλωσης ελαιοκομικών προϊόντων, είναι η αναγνώριση από επίσημους φορείς όπως ο Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων των Η.Π.Α (FDA), της υψηλής διατροφικής αξίας τους καθώς και των ευεργετικών ιδιοτήτων τους στην ανθρώπινη υγεία. Ενδεικτικό της αναγνώρισης της αξίας του ελαιόλαδου στην ανθρώπινη διατροφή, είναι το γεγονός ότι ο FDA δέχθηκε να αναγράφεται στην συσκευασία προϊόντων που περιέχουν ελαιόλαδο, η ευεργετική επίδρασή του στις καρδιαγγειακές παθήσεις. Έτσι, η παγκόσμια αγορά διευρύνεται, καθιστώντας την ελαιοκαλλιέργεια μία βασική πηγή εσόδων για τις χώρες της Μεσογείου.

1.3 Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς και περιγραφή των κύριων χαρακτηριστικών του ελαιόδενδρου.

1.3.1 Βοτανική ταξινόμηση της ελιάς

Η ελιά ανήκει στα Αγγειόσπερμα Δικότυλα φυτά και συγκεκριμένα κατατάσσεται στην τάξη *Scrophulariales* και στην οικογένεια *Oleaceae* (Ελαϊδες). Η οικογένεια *Oleaceae* περιλαμβάνει φυτά μεγάλης οικονομικής σημασίας για τους κατοίκους των θερμών και εύκρατων περιοχών. Τα φυτά αυτά διαχωρίζονται σε 30 γένη με 600 περίπου είδη κοσμοπολίτικης εξάπλωσης. Οι ποικιλίες της οικογένειας

Oleaceae είναι κυρίως διπλοειδείς με $2x=24$ χρωμοσώματα. Στην Ελλάδα, η οικογένεια των Ελαϊδων αντιπροσωπεύεται από τα ακόλουθα γένη *Fraxinus*, *Olea*, *Phillyrea*, *Ligustrum*, *Syringa*, *Jasminum* και *Forsythia* (Στεφανάκη-Νικηφοράκη, 1999).

Στο γένος *Olea* ανήκει η υποοικογένεια *Oleoideae*. Στην υποοικογένεια αυτή ανήκει τόσο η αγριελιά (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) όσο και η καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*), είδη τα οποία έχουν $2x=46$ χρωμοσώματα (Green, 2002). Η καλλιεργούμενη ελιά είναι ένα αειθαλές δένδρο με τάση παρενιαυτοφορίας. Ως είδος αποτελείται από περισσότερες από 2.600 καταγεγραμμένες ποικιλίες ανά τον κόσμο. Τα τροπικά και υποτροπικά είδη *O.chrysophilla* και *O.excelsa* που προέρχονται από την Αφρική και την Ασία, θεωρείται ότι έχουν λάβει μέρος στην εξέλιξη της *O.europaea* (Θεριός, 2005).

1.3.2 Περιγραφή των κύριων χαρακτηριστικών του ελαιόδενδρου

Η ελιά είναι ένα αειθαλές καρποφόρο δένδρο το οποίο ευδοκίμει στην Μεσόγειο (Βασιλακάκης, 2016). Έχει μικτούς βλαστούς και ασθενικούς βλαστούς. Οι μικτοί βλαστοί έχουν μήκος 10-30 εκ. και φέρουν βλαστοφόρους και ανθοφόρους οφθαλμούς. Αντίθετα, οι ασθενικοί βλαστοί έχουν μήκος μικρότερο των 10 εκ. και φέρουν περισσότερους βλαστοφόρους οφθαλμούς από ότι ανθοφόρους (Θεριός, 2005).



Η ελιά καρποφορεί σε βλαστούς του προηγούμενου έτους οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μέτρια ζωηρότητα. Το έτος της καρποφορίας σχηματίζει βλαστούς μήκους 10-30 εκ., οι οποίοι είναι εκείνοι οι οποίοι θα ανθοφορήσουν το επόμενο έτος. Η ελιά έχει την τάση να παρενιαυτοφορεί, ένα φαινόμενο το οποίο εκφράζεται πιο έντονα σε ξηρά και άγονα εδάφη (Ποντίκης, 2000, Θεριός, 2005, Βασιλακάκης, 2016).

Η διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών λαμβάνει χώρα στα τέλη του χειμώνα ή την άνοιξη μετά το πέρας των χαμηλών θερμοκρασιών. Οι οφθαλμοί δεν είναι διαφοροποιημένοι αρχικά, η διαφοροποίησή τους συντελείται κατά την έκθεσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. Έτσι, με το πέρας των χαμηλών θερμοκρασιών και την έλευση της άνοιξης, εκπύσσονται οι ταξιανθίες από τους οφθαλμούς της

προηγούμενης βλαστικής περιόδου (Θερίος, 2005). Η διαδικασία αυτή μπορεί να διαχωρισθεί στα ακόλουθα στάδια, σύμφωνα με τον Θερίο (2005):

- Στάδιο επαγωγής: Σε αυτό το στάδιο οι οφθαλμοί δέχονται την επίδραση των χαμηλών θερμοκρασιών και υφίστανται φυσιολογικές μεταβολές οι οποίες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό της ταξιανθίας. Δεν λαμβάνουν χώρα μορφολογικές μεταβολές σε αυτό το στάδιο. Συνήθως, το στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα κατά τους μήνες Οκτώβριο με Φεβρουάριο, με αναμενόμενες χρονικές διαφοροποιήσεις ανά περιοχές λόγω διαφορετικών κλιματικών συνθηκών.
- Στάδιο μορφολογικών μεταβολών: Σε αυτό το στάδιο, σχηματίζεται εντός των οφθαλμών ο κεντρικός άξονας με τις πλάγιες διακλαδώσεις της ταξιανθίας καθώς και των μεριστωμάτων που θα διαφοροποιηθούν σε άνθη.
- Στάδιο διαφοροποίησης ανθικών καταβολών: Αρχικά, σχηματίζονται οι καταβολές των σεπάλων. Στη συνέχεια, σχηματίζονται οι καταβολές των πετάλων, των στημόνων και των καρπόφυλλων.
- Στάδιο ολοκλήρωσης ανάπτυξης των οργάνων των ανθέων: Σε αυτό το στάδιο, οι καταβολές που είχαν σχηματιστεί προηγουμένως παίρνουν την τελική τους μορφή. Το στάδιο αυτό φτάνει στο τέλος του με την πλήρη άνθηση.



Η ταξιανθία της ελιάς είναι βότρυς (Ποντίκης, 2000, Βασιλακάκης, 2016). Ο αριθμός των ανθέων ανά ταξιανθία εξαρτάται από την καλλιεργούμενη ποικιλία, την υγρασία του εδάφους αλλά και την αζωτούχο λίπανση. Σπάνια θα βρεθούν στην ελιά επάκρια άνθη, αλλά η άνθηση σε βλαστούς δύο ετών είναι συνήθης. Τα άνθη της ελιάς διακρίνονται σε τέλεια,

τα οποία έχουν και στήμονες και ύπερο, και σε ατελή, τα οποία φέρουν στήμονες και ατροφικό ύπερο. Εξαιτίας της φυσιολογίας των ανθέων της, η ελιά χαρακτηρίζεται ως ανδρομόνοικο δένδρο.

Η τελειότητα των ανθέων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες. Η αυξημένη αναλογία φύλλων προς οφθαλμούς στην ελιά οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερων

τέλειων ανθέων. Η ελλιπής υγρασία την περίοδο της άνοιξης, οδηγεί στον σχηματισμό ατροφικών υπέρων και κατ' επέκταση στο μειωμένο ποσοστό τέλειων ανθέων. Η άσχημη κατάσταση της βλάστησης του δένδρου, η υπερβολική φυλλόπτωση από ποικίλα αίτια όπως το κυκλοκόνιο, καθώς και η έλλειψη της επαρκούς χειμερινής ψύξης ($<7^{\circ}\text{C}$) είναι κάποια ακόμη αίτια για τον σχηματισμό ατελών ανθέων. Παρότι οι χαμηλές θερμοκρασίες τον χειμώνα είναι απαραίτητες για τον σχηματισμό τέλειων ανθέων, οι θερμοκρασιακές διακυμάνσεις την περίοδο της άνοιξης δεν έχει παρατηρηθεί να επηρεάζουν την τελειότητα των ανθέων. Τέλος, η ύπαρξη συγκεκριμένης αναλογίας ατελών και τέλειων ανθέων μπορεί να αποτελεί ένα από τα χαρακτηριστικά της εκάστοτε ποικιλίας (Ποντίκης, 2000, Θεριός, 2005).

Τόσο η διαφοροποίηση των ανθέων όσο και άνθηση επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από την σκίαση και τον αριθμό των φύλλων. Η σκίαση, έχει την ικανότητα να μειώνει τον ρυθμό της διαφοροποίησης των ανθέων. Όμως η δράση της δε σταματά εκεί, τόσο η σκίαση όσο και η αφαίρεση φύλλων μπορούν να οδηγήσουν την ελιά σε αναστολή της άνθησης. Η ελιά είναι δένδρο ανεμόφιλο στο οποίο το μεγαλύτερο ποσοστό διάρρηξης ανθέρων παρατηρείται στο διάστημα μεταξύ 10 π.μ. και 1 μ.μ.. Η γύρη της ελιάς μπορεί να μεταφερθεί με τον άνεμο σε απόσταση έως και 500μ.. Το χαρακτηριστικό αυτό ευνοεί την επικονίαση της ελιάς μέσω του ανέμου καθώς οι περισσότερες ποικιλίες ελιάς είναι αυτόσπειρες (Θεριός, 2005).

Ένα ακόμη ιδιαίτερο χαρακτηριστικό της ελιάς είναι η ασύγχρονη άνθησή της. Ακόμα και τα άνθη της ίδιας ταξιανθίας δεν ανθίζουν ταυτοχρόνως. Το χαρακτηριστικό αυτό σε συνδυασμό με την αυτοστεριότητα της ελιάς, θα αποτελούσε τροχοπέδη για την επικονίαση των δένδρων αν δεν συνέβαλε στην διαδικασία ο άνεμος. Αντιθέτως, επειδή η επικονίαση γίνεται με τον άνεμο, τα ποσοστά επιτυχίας της αυξάνονται καθώς ο άνεμος εφοδιάζεται με γύρη καθόλη την περίοδο της υποδεκτικότητας του στίγματος (Θεριός, 2005).

Η καρπόδεση επομένως επηρεάζεται τόσο από τα χαρακτηριστικά του ίδιου του δένδρου (π.χ. ύπαρξη επαρκούς φυλλώματος) όσο και από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες (π.χ. θερμοκρασία και άνεμοι). Το ποσοστό της καρπόδεσης είναι πολύ μικρό, από ένα συνολικό αριθμό 500.000 ανθέων ανά δένδρο, δίνει μόνο ένα μικρό ποσοστό. Στις ποικιλίες οι οποίες παράγουν μεσαίου ή μεγάλου μεγέθους καρπούς, η καρπόδεση είναι αρκετά ικανοποιητική έως πάρα πολύ καλή αν από κάθε ταξιανθία

προκύψει ένας καρπός (Βασιλακάκης, 2016). Στις μικρόκαρπες ποικιλίες ο αντίστοιχος αριθμός καρπών ανά ταξιανθία, ποικίλει από ένα έως τρεις για μία πολύ καλή καρπόδεση (Θεριός, 2005).

Το φαινόμενο της παρενιαιοφορίας, όπου το δέντρο δίνει ικανοποιητική παραγωγή την μία χρονιά και μειωμένη παραγωγή την επόμενη, οφείλεται κυρίως στην εξάντληση των δένδρων λόγω κατανάλωσης μεγάλου ποσοστού θρεπτικών αποθεμάτων τη χρονιά της υψηλής παραγωγής (Ψυχογιού, 2007). Η υψηλή ανθοφορία και καρπόδεση του παραγωγικού έτους αφαιρεί πολλούς υδατάνθρακες και αζωτούχα συστατικά από το δένδρο μειώνοντας τις αποθησαυριστικές ουσίες για την επόμενη χρονιά. Το φαινόμενο αυτό είναι πιο έντονο σε μη ποτιστικούς ελαιώνες. Μείωση της έντασης του φαινομένου της παρενιαιοφορίας μπορεί να γίνει με κατάλληλες τεχνικές κλαδέματος και λίπανσης από τον παραγωγό· έτσι ώστε να μειωθεί η υπερβολική καρπόδεση και να αναπληρωθεί μέρος των χαμένων θρεπτικών στοιχείων (Θεριός, 2005, Ψυχογιού, 2007). Οι παράγοντες που επιδρούν στην παρενιαιοφορία είναι η θερμοκρασία, οι βροχοπτώσεις, διάφορα ορμονικά αίτια, η ηλικία δένδρων αλλά και οι καλλιεργητικές φροντίδες (Ψυχογιού, 2007).



Το επόμενο στάδιο το οποίο απαιτεί προσοχή μετά την καρπόδεση, είναι η καρποφορία των ελαιόδενδρων. Η καρποφορία επηρεάζεται από μία σειρά παραγόντων οι οποίοι εντοπίζονται ακόμα και σε προηγούμενα φυσιολογικά στάδια του δένδρου. Ο αριθμός των ωρών κατά τις οποίες εκτίθεται το δένδρο σε χαμηλές θερμοκρασίες επηρεάζει άμεσα την διαφοροποίηση των ανθοφόρων οφθαλμών. Αν οι ανθοφόροι οφθαλμοί δεν διαφοροποιηθούν επαρκώς, το ποσοστό καρπόδεσης μειώνεται περαιτέρω του φυσιολογικού. Ένας άλλος παράγοντας ο οποίος επηρεάζει την καρποφορία της ελιάς είναι το αυτοασυμβίβαστο. Για να γίνει επιτυχής καρπόδεση και καρποφορία, είναι απαραίτητο να γίνονται συνδυασμοί ποικιλιών σε καλλιεργούμενους ελαιώνες. Η κάθε ποικιλία έχει έναν αριθμό συμβατών επικονιαστών, δηλαδή έναν ικανοποιητικό αριθμό ποικιλιών των οποίων η γύρη είναι ικανή να γονιμοποιήσει τα άνθη της καλλιεργούμενης ποικιλίας έτσι ώστε αυτή να δώσει παραγωγή. Τροχοπέδη στην καρποφορία της ελιάς είναι και τα ατελή άνθη. Οι καιρικές συνθήκες κατά την ανθοφορία είναι εξίσου σημαντικές για την καρποφορία. Δυσμενείς καιρικές συνθήκες σε αυτό το στάδιο μπορεί να οδηγήσουν στο φαινόμενο

της σχινοκαρπίας. Οι σχινόκαρποι είναι μικροί και στρογγυλοί καρποί, οι οποίοι δεν έχουν σπέρμα και φτάνουν μόνο μέχρι το στάδιο της ωρίμανσης. Η λίπανση παίζει σημαντικό ρόλο στην καρποφορία. Η τροφοπενία βορίου οδηγεί σε μείωση της άνθησης. Η τροφοπενία καλίου σχετίζεται με την μείωση της βλάστησης και την ελάττωση της παραγωγής. Το κυκλοκόνιο, όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, μπορεί να συντελέσει στον σχηματισμό ατελών ανθέων, μπορεί ακόμα να οδηγήσει και σε ακαρπία. Την ίδια επίδραση στην καρποφορία μπορεί να έχουν και άλλες ασθένειες αλλά και προσβολές από εχθρούς της ελιάς. Συχνά, σε ελαιώνες συναντιούνται γηραιά και πυκνά φυτεμένα δένδρα στα οποία η καρποφόρος δυναμικότητα έχει περιοριστεί σημαντικά. Επιπλέον, η καρποφόρος επιφάνεια τέτοιων δένδρων εντοπίζεται μόνο στην κορυφή τους (Ποντίκης, 2000, Θεριός, 2005).

1.4 Μεθυλίωση του DNA

Ο όρος μεθυλίωση αφορά την ομοιοπολική προσθήκη μεθυλομάδων (CH_3) στον 5' C του δακτυλίου της κυτοσίνης του DNA (Jin et al., 2011). Η προσθήκη μεθυλομάδων σε νουκλεοτίδια κυτοσίνης λαμβάνει χώρα κατά τον σχηματισμό της κάθε πολυνουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA από ειδικά ένζυμα (Μολφέτας et al., 1994). Πρόκειται δηλαδή για μία μετα-αντιγραφική τροποποίηση καθώς πρώτα γίνεται η ενσωμάτωση των νουκλεοτιδίων σε αλυσίδα DNA και μετά γίνεται η τροποποίησή τους.

Η μεθυλίωση εντοπίζεται σε πολλούς οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων προκαρυωτών, μυκήτων, φυτών και ζώων. Αν και εντοπίζεται σε όλες αυτές τις κατηγορίες οργανισμών, σε κάθε μία πιστεύεται ότι παρουσιάζει κάποια διαφορετική λειτουργία (Doerfler & Bohm, 2006). Η μεθυλίωση αφορά μία σημαντική χημική τροποποίηση του DNA η οποία δεν επιφέρει κάποια αλλαγή στην ακολουθία του γενετικού κώδικα, έχει όμως την δυνατότητα να κληρονομείται μέσω μιτωτικών και μειωτικών διαιρέσεων σε φυτικά γονιδιώματα (Niederhuth et al., 2013) για αυτό και χαρακτηρίζεται ως επιγενετικός κώδικας.

Ο όρος επιγενετική χρησιμοποιήθηκε και περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1942 από τον Conrad Waddington. Ο όρος αυτός αρχικά χρησιμοποιήθηκε για την περιγραφή των περιστασιακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ γονιδίων και των προϊόντων τους, οι οποίες είναι ικανές να οδηγήσουν σε φαινοτυπική έκφραση. Σήμερα ο όρος

αυτός έχει χαρακτηριστεί με περισσότερες λεπτομέρειες. Η επιγενετική χαρακτηρίζει το σύνολο των κληρονομήσιμων αλλαγών στο φαινότυπο εξαιτίας των διαδικασιών οι οποίες λαμβάνουν χώρα ανεξάρτητα από την αρχική αλληλουχία του DNA (Chong, et al., 2004, Liu, et al., 2008, Jin et al., 2011). Η επιγενετική διαδικασία μπορεί να μεταφερθεί σε οργανισμούς από τη μία γενιά στην επόμενη (Tollefsbol, 2011). Η επιγενετική ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης επιτυγχάνεται με μεθυλίωση του DNA, τροποποιήσεις ιστονών ή χρωματίνης, αναδιαμόρφωση χρωματίνης κ.ά. (Reinders et al., 2015). Η παρούσα μελέτη αναφέρεται στη μεθυλίωση των κυτοσινών.

Από εξελικτική οπτική γωνία, η μεθυλίωση του DNA θεωρείται ότι αντιπροσωπεύει ένα αρχαίο μηχανισμό και στους περισσότερους ευκαρυώτες απαρτίζεται από την μεταφορά μίας μεθυλομάδας από την SAM (S-adenosylmethione) στην θέση του πέμπτου άκρου της κυτοσίνης σε συγκεκριμένα CpG δινουκλεοτίδια. Η διαδικασία αυτή καταλύεται από την ομάδα ενζύμων DNA μεθυλοτρανσφεράσες (DNMTs). Η καταλυτική τους περιοχή παρουσιάζεται συντηρημένη από προκαρυώτες έως και τον άνθρωπο (Kumar et al., 1994). Έχει παρατηρηθεί ότι ισχύει ένας γενικός κανόνας ο οποίος υποστηρίζει ότι όσο περισσότερο μεθυλωμένη είναι η περιοχή της γονιδιακής ρύθμισης, τόσο πιο πιθανή είναι η μειωμένη γονιδιακή δραστηριότητα και το αντίστροφο. Φυσικά υπάρχουν κάποιες εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα (Tollefsbol, 2011).

Στη δεκαετία του 1960, είχαν προταθεί δύο πιθανές δράσης για τη μεθυλίωση του DNA. Σύμφωνα με την πρώτη υπόθεση η μεθυλίωση εμπλέκεται σε μηχανισμό προστασίας ενάντια στην ενσωμάτωση ξένου DNA. Η δεύτερη υπόθεση, αποδίδει στο DNA του ξενιστή ανθεκτικές DNases οι οποίες κατευθύνονται εναντίον ξένου DNA (Srinivasan & Borek, 1964). Σήμερα είναι γνωστό ότι η μεθυλίωση του DNA εμπλέκεται σε πολλές κυτταρικές διαδικασίες όπως είναι η αποσιώπηση μεταθετών στοιχείων και περικεντρομερικών περιοχών, η απενεργοποίηση του X χρωμοσώματος και το γονιδιωματικό εντύπωμα. Πρόκειται για ένα σχετικά σταθερό επιγενετικό σήμα το οποίο όμως εξακολουθεί να ρυθμίζεται δυναμικά. Το χαρακτηριστικό αυτό προκύπτει άμεσα από το γεγονός ότι για να διατηρηθεί η μεθυλίωση σε συγκεκριμένα επίπεδα, θα πρέπει να γίνει σωστά διατήρηση των μεθυλοτρανσφερασών του DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής του.

Σε επίπεδο γονιδιώματος, η μεθυλίωση είναι αξιοσημείωτα σταθερή. Ιδιαίτερα η μεθυλίωση των μεταθετών στοιχείων είναι η πιο σταθερή και συνεπής όλων, όπως αυτό αποδείχθηκε μέσα από πείραμα σε 30 συνεχόμενες φυτικές γενεές στο φυτό *Arabidopsis thaliana* (Niederhuth et al., 2013). Πειράματα έχουν δείξει έντονη μεθυλίωση στα CpG σημεία των αγγειόσπερμων, στα οποία ανήκει και η ελιά. Συγκρίσεις που έλαβαν χώρα μεταξύ αργά εξελισσόμενων ειδών, παρουσίασαν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα συντήρησης της μεθυλίωσης μεταξύ των ορθόλογων γονιδίων τους. Ακόμη από τις συγκρίσεις αυτές υποστηρίζεται ότι η μεθυλίωση και η σίγηση των μεταθετών στοιχείων, είναι μία αρχαία διαδικασία για τα φυτά (Niederhuth et al., 2013). Το χαρακτηριστικό αυτό επιβεβαιώνεται και από τους Barghini et al. (2017), οι οποίοι μελέτησαν ένα τύπο μεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα της ελιάς. Η έρευνά τους επικεντρώθηκε στα SINEs (Short Interspersed Nuclear Elements) τα οποία είναι μεταθετά στοιχεία των ευκαρυωτικών οργανισμών και τα οποία θεωρείται ότι προηγούνται της εμφάνισης των LTRs (Long Terminal Repeats). Οι δύο αυτοί τύποι μεταθετών στοιχείων θεωρείται ότι επεκτάθηκαν στο εκάστοτε γονιδίωμα από την αρχαιότητα και εξαιτίας αυτού του στοιχείου έχει ενισχυθεί η άποψη ότι από τότε πρέπει να έκανε και την εμφάνισή της η μεθυλίωση,

Η μεθυλίωση όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, σχετίζεται με τη γονιδιακή μεταγραφή καθώς και με τη διάθρωση της χρωματίνης. Στην περίπτωση των φυτών η μεθυλίωση του DNA συνδέεται στενά με τις τροποποιήσεις των ιστονών. Ακόμη, φαίνεται ότι επηρεάζει τη σύνδεση ειδικών πρωτεϊνών στο DNA καθώς και τον σχηματισμό των αντίστοιχων συμπλοκών μεταγραφής στη χρωματίνη. Επιπλέον, σύμφωνα με τους Bitonti et al. (2002), η μεθυλίωση θεωρείται ότι είναι υπεύθυνη όχι μόνο για την ρύθμιση του επιπέδου της γονιδιακής έκφρασης αλλά και για την διατήρηση των επιγενετικών αλλαγών. Τα χαρακτηριστικά αυτά έχουν οδηγήσει στη αντίληψη ότι η μεθυλιωμένη κυτοσίνη είναι ένα πολύ καλό υποψήφιο χαρακτηριστικό για τον έλεγχο των γονιδίων των οποίων η έκφραση είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη ενός συγκεκριμένου κυτταρικού τύπου.

Σύμφωνα με τους Hasbun et al. (2007), η μεθυλίωση του DNA μπορεί να λειτουργήσει ως μοριακός δείκτης για συγκεκριμένες διαδικασίες ανάπτυξης του φυτού. Οι διαδικασίες αυτές μπορεί να σχετίζονται με τη γήρανση, την αναγέννηση αλλά και με την αλλαγή των φάσεων ανάπτυξης των φυτών. Οι λειτουργίες αυτές αφορούν τόσο τα γυμνόσπερμα όσο και τα αγγειόσπερμα φυτά. Η γήρανση συνδέθηκε

με αυξημένο περιεχόμενο μεθυλιωμένων κυτοσινών. Το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης κατά τον λήθαργο των οφθαλμών διαδέχθηκε μία μείωσή του κατά την διαφοροποίηση των οφθαλμών. Η ερευνητική ομάδα αναλύοντας τα δεδομένα της οδηγήθηκε στο συμπέρασμα ότι ο λήθαργος των οφθαλμών συνοδεύεται από καθολική αύξηση της μεθυλίωσης ανεξάρτητα από τη γήρανση του φυτού. Επιβεβαίωσαν επίσης ότι η μεθυλίωση εμπλέκεται στο μηχανισμό μεταγραφής του DNA καθώς μπορεί να οδηγήσει σε γονιδιακή σίγηση. Κατά τη διάρκεια του λήθαργου, τα μεριστώματα παραμένουν ανενεργά εξαιτίας μίας τέτοιας αλλαγής στη μεταγραφική δραστηριότητα του DNA. Φαίνεται ότι η μεθυλίωση επηρεάζει άμεσα την φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών κάτι που υποστηρίζεται από την ανώμαλη και μη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών στην περίπτωση που υπάρξουν αλλαγές στο μοτίβο της μεθυλίωσής τους (Hasbun et al., 2007).

Οι Bitonti et al. (2002) κινούμενοι σε παρόμοια πλαίσια με τους Hasbun et al. (2007), εξέτασαν τις αλλαγές των επιπέδων μεθυλίωσης σε κορυφαία μεριστώματα της ροδακινιάς. Τα μεριστώματα στην έρευνα διακρίνονταν σε τρεις ομάδες: στα νεανικά, σε αυτά που μοιάζουν στα νεανικά ως προς τα μακροσκοπικά χαρακτηριστικά (juvenile-like) και στα ενήλικα. Παρατηρήθηκε ότι κατά την βλαστική ανάπτυξη της ροδακινιάς (περίοδος Μαρτίου- Ιουνίου) τα επίπεδα της μεθυλίωσης του πυρηνικού DNA ήταν υψηλότερα στα ενήλικα μεριστώματα σε σχέση με τα νεανικά και τα juvenile-like. Επιβεβαιώθηκαν έτσι κάποιες βασικές δράσεις της μεθυλίωσης όπως η εμπλοκή της στην γονιδιακή ρύθμιση και έκφραση καθώς και οι μεταβολές που επιφέρει στην δομή της χρωματίνης. Παρατηρήθηκαν επίσης μεταβολές στα επίπεδα μεθυλίωσης κατά την αλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων της ροδακινιάς. Οι Bitonti et al. (2002) κατέληξαν στο ότι οι μεταβολές των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA είτε ρυθμίζουν την αλλαγή των αναπτυξιακών φάσεων των ανώτερων φυτών είτε απλώς λαμβάνουν χώρα τις περιόδους αυτές.

Τα συμπεράσματα αυτά ενισχύονται από την δράση του γονιδιωματικού εντυπώματος και την αναγνώριση της δράσης της επιγενετικής στους οργανισμούς. Το γονιδιωματικό εντύπωμα έχει και αυτό επιγενετική βάση και λαμβάνει χώρα σε φυτά με ανάλογες διαδικασίες με αυτές των θηλαστικών. Μπορεί να συμβεί σε συγκεκριμένους τύπους ιστών ή κατά τη διάρκεια αναπτυξιακών σταδίων τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη ενός οργανισμού. Δεν είναι τυχαίο ότι η

επιγενετική παίζει τόσο σημαντικό ρόλο για την εξέλιξη και την δημιουργία νέων ειδών όπως και για την επίδραση των μεταλλάξεων (Tollefsbol et al., 2011).

Η μεθυλίωση των κυτοσινών σε ευκαρυωτικά γονιδιώματα έχει βρεθεί ότι σχετίζεται συχνά με τις επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, συμπεριλαμβανομένων των τρανσποζονίων και των παραγώγων τους. Τέτοιες ακολουθίες εντοπίζονται συχνά σε κεντρομερικές και περικεντρομερικές περιοχές και συνοδεύονται από υψηλά ποσοστά μεθυλίωσης (Reinders et al., 2015). Οι επαναλήψεις αυτές έχουν δύο πιθανές επιβλαβείς επιδράσεις τις οποίες και ελέγχει η μεθυλίωση. Η μεθυλίωση συχνά αποτρέπει την ανεξέλεγκτη μεταγραφή γονιδίων η οποία είναι δυνατόν να διαταράξει την έκφραση άλλων γειτονικών γονιδίων. Ακόμη, ελέγχει πιθανές αλλαγές στη δομή του γονιδιώματος μέσω μετάθεσης και έκτοπου ανασυνδυασμού. Η απώλεια της μεθυλίωσης θεωρείται αρκετή για την κινητοποίηση των τρανσποζονίων και τις πιθανώς αρνητικές επιδράσεις αυτής (Kato et al., 2003, Tahilliani et al., 2009).

1.5 CpG νησίδες, CpHpG & CpHpH

Η μεθυλίωση των βάσεων κυτοσίνης, λαμβάνει χώρα κατεξοχήν σε κατάλοιπα CpG και σε συγκεκριμένες περιοχές του γονιδιώματος οι οποίες ονομάζονται CpG νησίδες. Οι νησίδες δινουκλεοτιδίων CpG (κυτοσίνη C ενωμένη με φωσφοδιεστερικό δεσμό 3'-5' με την γουανίνη G) έχουν μήκους περίπου 1-2 kb. Οι αλληλουχίες CpG περιέχουν υψηλότερο ποσοστό κυτοσινών και γουανινών από το μέσο όρο. Οι CpG νησίδες βρίσκονται συχνά κοντά σε σημεία έναρξης μεταγραφής και όταν είναι μεθυλιωμένες λειτουργούν κατασταλτικά για την έκφραση των πλησιέστερων γονιδίων (Νικολάου, 2015).

Σε αντίθεση με τα θηλαστικά, η μεθυλίωση στους μύκητες και στα φυτά, δε περιορίζεται στα CpG σημεία αλλά εντοπίζεται και σε CpNpG αλληλουχίες οι οποίες είναι μεθυλιωμένες (Doerfler & Bohm, 2006). Παρότι προηγούμενες έρευνες έδειξαν ότι υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των CpG νησίδων και των μεθυλιωμένων κυτοσινών, είναι πλέον γνωστό ότι στα φυτά η μεθυλίωση του DNA εντοπίζεται συχνά τόσο σε κατάλοιπα αλληλουχιών CpG όσο και σε κατάλοιπα αλληλουχιών CpHpG και CpHpH με το H να αντιπροσωπεύει μία εκ των ακόλουθων βάσεων: A (αδενίνη), T (θυμίνη) ή C (κυτοσίνη) (Kavarik et al., 1997, Lister et al., 2009, Niederhuth et al., 2013).

Τα αποτελέσματα του πειράματος των Cokus et al. (2008) στο φυτό *Arabidopsis thaliana*, ήταν σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα καθώς έδειξαν ότι η μεθυλίωση λαμβάνει χώρα τόσο σε αλληλουχίες CpG, όσο και σε αλληλουχίες CpHpG και CpHpH (H=A, C, T). Το μεγαλύτερο ποσοστό μεθυλίωσης παρατηρήθηκε στα κατάλοιπα τύπου CpG (24%). Ακολουθούσε με ποσοστό 6,7% η μεθυλίωση σε σημεία CpHpG και τέλος η μεθυλίωση των CpHpH σημείων ανερχόταν σε ποσοστό 1,7%. Οι διαφορές οι οποίες παρατηρήθηκαν στην μεθυλίωση αυτών των διαφορετικών ομάδων νουκλεϊκών καταλοίπων, υπογραμμίζουν το διαφορετικό γενετικό έλεγχο που ασκείται σε κάθε μία από αυτές τις περιπτώσεις (Cokus et al., 2008).

Τα siRNAs (small interfering RNAs) είναι μία ομάδα RNA μορίων διπλής αλυσίδας, μήκους 20-25bp τα οποία συμμετέχουν σε πολλά βιολογικά μονοπάτια όπως το RNAi (RNA interference) μονοπάτι. Στα φυτά, τα siRNAs μπορούν να οδηγήσουν, μέσω της διαδικασίας RdDM (RNA-directed DNA Methylation), στη DNA μεθυλίωση κάποιων γενετικών τόπων με τους οποίους παρουσιάζουν ομολογία των ακολουθιών τους. Για να εξασφαλιστεί αυτό, τα siRNAs προκύπτουν από την ίδια την ακολουθία την οποία στη συνέχεια θα μεθυλιώσουν (Xie & Yu, 2015). Το RdDM μονοπάτι αφορά κυρίως τα σημεία ασύμμετρης μεθυλίωσης (CpHpH) και σε πολύ σπάνιες περιπτώσεις σε συμμετρικά σημεία μεθυλίωσης (CpG). Συνήθως στα σημεία μεθυλίωσης τύπου CpG και CpHpG παρατηρείται η δράση άλλων μηχανισμών μεθυλίωσης οι οποίοι περιλαμβάνουν τη δράση των ενζύμων MET1 και CMT3 (Xie & Yu, 2015).

Η μεθυλίωση των CpG, CpHpG και CpHpH σημείων είναι έντονη σε περικεντρομερικές περιοχές, οι οποίες περιέχουν υψηλό ποσοστό επαναλαμβανόμενων ακολουθιών. Στο κυρίως όμως τμήμα των γονιδίων εντοπίζεται αποκλειστικά ο CpG τύπος μεθυλίωσης για αυτό και το ποσοστό μεθυλίωσής του είναι τόσο υψηλό σε σύγκριση με αυτό των CpHpG και CpHpH (Cokus et al., 2008). Εφόσον στο κυρίως τμήμα των γονιδίων εντοπίζεται ο CpG τύπος μεθυλίωσης είναι λογικό να είναι περιορισμένη η παρουσία των siRNAs τα οποία επιδρούν ελάχιστα σε αυτόν (Cokus et al., 2008).

1.6 Μεθυλίωση σε φυτικά κύτταρα

Το 1-6% των νουκλεοτιδίων σε φυτικά και ζωικά γονιδιώματα αποτελείται από 5-μεθυλ-κυτοσίνη, κοινώς γνωστή ως DNA μεθυλίωση. Παρόλα αυτά, τα φυτά

παρουσιάζουν αρκετές διαφορές ως προς τη μεθυλίωση σε σχέση με τα ζώα. Η μεθυλίωση της κυτοσίνης του DNA σε φυτά είναι πιο πλούσια σε σύγκριση με την αντίστοιχη στα ζώα. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η μεθυλίωση στα φυτά μπορεί να λάβει χώρα σε τρεις διαφορετικές ομάδες καταλοίπων βάσεων σε αντίθεση με τα ζώα στα οποία η μεθυλίωση απαντάται αποκλειστικά σε CpG νησίδες (Cokus et al., 2008, Lister et al., 2009).

Η DNA μεθυλίωση εγκαθιδρύεται *de novo* στα φυτά με τα ορθόλογα γονίδια Domains Rearranged Methyltransferase 1/2 γνωστά και ως DRM 1/2. Στα φυτά απαντώνται οι ακόλουθες μεθυλοτρανσφεράσες: MET1, DRM1, DRM2 και CMT3. Τα γονίδια αυτά στοχεύουν συγκεκριμένους μεθυλιωμένους τόπους με μικρά RNA μόρια στα πλαίσια της RNA κατευθυνόμενης DNA μεθυλίωσης. Η MET1 (Methyltransferase 1) είναι αντίστοιχη της DNMT1 η οποία συναντάται στα ζώα και είναι υπεύθυνη για την μετα-αντιγραφική συντήρηση της DNA μεθυλίωσης των CpG σημείων στα φυτά. Απώλεια της MET1 οδηγεί μεταξύ άλλων στην σχεδόν πλήρη διαγραφή της CpG μεθυλίωσης, στην καταστολή των αντιδράσεων απομεθυλίωσης, την αλλαγή δράσης της RNA κατευθυνόμενης μεθυλίωσης, καθώς και στην ανακατανομή άλλων κατασταλτικών επιγενετικών μηχανισμών (Reinders et al., 2015). Η Chromomethylase 3 (CMT3) είναι απαραίτητη για την διατήρηση της DNA μεθυλίωσης των CpHpG σημείων στους φυτικούς οργανισμούς.

Τέλος, η μεθυλίωση των σημείων CpHpH είναι σε αφθονία στα φυτά και διατηρείται από το RdDM (RNA-directed DNA Methylation) μονοπάτι το οποίο στοχεύει η DNA μεθυλτρανσφεράση DRM2 (Domains Rearranged Methyltransferase 2), η οποία είναι ομόλογη της DNMT3 η οποία απαντάται στα ζώα (Cokus et al., 2008, Jin et al., 2011, Niederhuth et al., 2013,). Η RdDM είναι υπεύθυνη για την διατήρηση της μεθυλίωσης των προσφάτων αντιγράφων του DNA. Η δράση αυτή των φυτών στοχεύει στο να μην αντιγράφεται ολόκληρο το γονιδίωμα ανεξέλεγκτα και ταυτόχρονα. Ακόμη, στοχεύει στη σίγηση γονιδίων μέχρι να κριθεί απαραίτητη η συνέκφρασή τους με άλλα γονίδια ή η εκ νέου έκφρασή τους ή η τελική τους απορρόφηση στο γονιδίωμα (Niederhuth et al., 2013, Zhang et al., 2014). Επιπλέον, η RNA κατευθυνόμενη μεθυλίωση είναι δυνατόν να αποκαταστήσει τα επίπεδα της μεθυλίωσης μετά από διαταραχές του οργανισμού ή το πέρας της μετάβασής του από ένα αναπτυξιακό στάδιο σε ένα άλλο (Reinders et al., 2015).

Οι φυτικοί οργανισμοί έχουν και μηχανισμούς απομεθυλίωσης. Τα ένζυμα ROS1 (Repressor or Silencing 1), DME (Demeter), DML2 (Demeter Like 2) και DML3 (Demeter Like 3) αναγνωρίζουν και αφαιρούν τις μεθυλιωμένες κυτοσίνες με αποτέλεσμα να δημιουργούν κενά νουκλεοτιδίων στη διπλή έλικα του DNA. Στη συνέχεια, ένζυμα επιδιόρθωσης και ενοποίησης του DNA θεωρητικά γεμίζουν τα κενά με μη μεθυλιωμένα νουκλεοτίδια κυτοσινών (Cokus et al., 2008, Lister et al., 2009, Jin et al., 2011, Niederhuth et al., 2013). Οι ROS1, DML2 και DML3 πρωτεΐνες λειτουργούν κυρίως στους βλαστικούς ιστούς και γονιδιωματικές έρευνες έχουν δείξει ότι απομεθυλιώνουν εκατοντάδες στοχευμένες περιοχές κατά μήκος του γονιδιώματος, έχοντας όμως προτίμηση στις περιοχές των γονιδίων (Lister et al., 2009, Penterman et al., 2007). Η DME πρωτεΐνη εκφράζεται κυρίως στο κεντρικό κύτταρο πριν τη γονιμοποίηση και έτσι μόνο το μητρικό γένωμα απομεθυλιώνεται οδηγώντας σε εξειδικευμένη έκφραση των γονιδίων τα οποία προέρχονται από το μητρικό αλληλόμορφο στο ενδοσπέρμιο (Huh et al., 2008). Η διαφοροποίηση αυτή, δηλαδή η εξειδικευμένα ενεργοποίηση γονιδίων στα θηλυκά γαμετικά κύτταρα λόγω της δράσης της πρωτεΐνης DME, ονομάζεται εντύπωμα.

Σύμφωνα με τη μελέτη των Lister et al. (2009), εντοπίστηκε μία περιοδικότητα 167 νουκλεοτιδίων μεταξύ των σημείων μεθυλίωσης. Η απόσταση αυτή είναι πολύ κοντινή με την απόσταση μεταξύ των σημείων πρόσδεσης των νουκλεοσωμάτων στα φυτά. Το στοιχείο αυτό υποδεικνύει ότι οι αλληλουχίες σύνδεσης είναι περισσότερο εκτεθειμένες στις DNA μεθυλοτρανσφεράσες ή ότι η μεθυλίωση σχετίζεται λειτουργικά με την τοποθέτηση νουκλεοσωμάτων. Πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το νουκλεοσωμικό DNA είναι ένα σημαντικό υπόστρωμα για τις DNMTs *in vivo* (Jin et al., 2011). Από την ίδια ερευνητική ομάδα, αλληλουχήθηκε το μεθυλίωμα ενός μεταλλαγμένου ατόμου ως προς τα ένζυμα ROS1, DML2 και DML3. Βρέθηκαν εκατοντάδες διακριτές υπερμεθυλιωμένες περιοχές σε όλο το γονιδίωμα αυτού του μεταλλαγμένου ατόμου σε σχέση με το γονιδίωμα του ατόμου αγρίου τύπου. Οι υπερμεθυλιωμένες περιοχές εντοπίζονται κυρίως σε περιοχές εκκινητών και των 3' UTRs. Το στοιχείο αυτό υποδεικνύει ότι οι απομεθυλάσες, προστατεύουν ενεργά τις περιοχές αυτές από τη μεθυλίωση, πιθανότατα προς αποφυγή της παρέμβασης των DNA δεσμευόμενων πρωτεϊνών ή προς αποφυγή διαδικασιών μεταγραφικής εκκίνησης ή λήξης όταν αυτό δεν είναι επιθυμητό.

1.7 Τεχνικές ανίχνευσης μεθυλίωσης

Με την πάροδο των χρόνων έχει αναπτυχθεί ένας πλήθος τεχνικών για την ανίχνευση της μεθυλίωσης. Κάποιες από αυτές τις τεχνικές στοχεύουν στην διερεύνηση συγκεκριμένων γενετικών τόπων ως προς τη μεθυλίωση του DNA ενώ κάποιες άλλες, στοχεύουν στην διερεύνηση των επιπέδων μεθυλίωσης ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού (Song et al., 2005, Laird, 2010). Κάποιες από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές μελέτης των επιπέδων μεθυλίωσης είτε ολόκληρου γονιδιώματος είτε συγκεκριμένου μέρους του παρουσιάζονται στη συνέχεια.

Η σύλληψη του μεθυλιωμένου DNA μέσω MeCP2 (MeCapSeq). Πρόκειται για μία μέθοδο τύπου ChIP στην οποία χρησιμοποιείται ένα ειδικό αντίσωμα για την δέσμευση της πρωτεΐνης MeCP2 και κατ' επέκταση και των σημείων στα οποία αυτή είναι προσδεσμένη. Η συγκεκριμένη πρωτεΐνη, της οποίας το πλήρες όνομα είναι Methyl-CpG-Binding-Protein 2, αναγνωρίζει και προσδένεται σε μεθυλιωμένες CpG νησίδες. Ως αποτέλεσμα η απομόνωσή της οδηγεί σε εμπλουτισμό του δείγματος σε μεθυλιωμένο DNA (Νικολάου, 2015).

Η MeDIPSeq, κατακρήμνιση του μεθυλιωμένου DNA, είναι μία ακόμη παραλλαγή της ChIP μεθόδου. Σε αυτή τη προσέγγιση, χρησιμοποιείται ένα ειδικό αντίσωμα για μεθυλιωμένα κατάλοιπα DNA. Ο συνδυασμός της με ένα προσεκτικό κατακερματισμό του γονιδιωματικού DNA οδηγεί σε απομόνωση των τμημάτων του γονιδιώματος τα οποία είναι κατά προτίμηση μεθυλιωμένα (Νικολάου, 2015).

Η επεξεργασία με θειώδη άλατα (SO_3^{2-} , bisulfites) και η παράλληλη αλληλούχιση των προϊόντων της (bisulfite sequencing, BSSeq) είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική. Πρόκειται για μία τεχνική η οποία μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε γονιδιωματική κλίμακα (WGBS, Whole Genome Bisulfite Sequencing) όσο και σε συγκεκριμένες περιοχές αλληλουχιών (Cokus et al., 2008, Niederhuth et al., 2013). Η επιτυχία της τεχνικής αυτής εντοπίζεται στην εκμετάλλευση μίας χημικής ιδιότητας των βάσεων κυτοσίνη (C) και ουρακίλη (U). Η δράση των θειωδών αλάτων βασίζεται στην απαμίνωση της κυτοσίνης σε ουρακίλη μέσω μίας ηλεκτρονιόφιλης προσθήκης. Ουσιαστικά η αντίδραση αυτή, οδηγεί στη μετατροπή των καταλοίπων κυτοσίνης σε κατάλοιπα ουρακίλης. Από τη δράση αυτή των θειωδών αλάτων εξαιρούνται τα κατάλοιπα κυτοσίνης τα οποία είναι μεθυλιωμένα (μεθυλ-κυτοσίνη). Η

επίδραση των θειωδών αλάτων, μετατρέπει όλες τις κυτοσίνες του δείγματος σε ουρακίλες αφήνοντας όμως τις μεθυλ-κυτοσίνες ανέπαφες. Αν γίνει μία σύγκριση δύο δειγμάτων εκ των οποίων το ένα έχει υποστεί επεξεργασία με θειώδη και το άλλο όχι, είναι δυνατή η ταυτοποίηση των μεθυλιωμένων καταλοίπων κυτοσίνης (Lister et al., 2009, Tollefsbol et al., 2011, Zhang et al., 2014, Νικολάου, 2015, Kurdyukov et al., 2016).

Πίνακας 1.4: Μετατροπή αλληλουχίας βάσει της μεθυλίωσης.

	Αρχική αλληλουχία	Μετά τη μεταχείριση με bisulfite
Μη μεθυλιωμένη αλληλουχία	N-C-G-N-C-G-N-C-G-N	N-U-G-N-U-G-N-U-G-N
Μεθυλιωμένη αλληλουχία	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N	N- C -G-N- C -G-N- C -G-N

Η MSAP (Methylation Sensitive Amplified Polymorphism) είναι μία τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για την εύρεση των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA ενός οργανισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για το διαχωρισμό δειγμάτων, καθώς βασίζεται στη μεθυλίωση του DNA η οποία διερευνάται με διάφορα ένζυμα πέψης. Πρόκειται για μία χρήσιμη μέθοδο χαρτογράφησης και κλωνοποίησης μεθυλιωμένων γονιδίων. Το γονιδιωματικό DNA πέπτεται με ένα ένζυμο πέψης όπως το HpaII και έπειτα τα θραύσματα του DNA συνδέονται σε ένα προσαρμογέα για να ξεκινήσει ο πολλαπλασιασμός τους. Στη συνέχεια, τα θραύσματα αυτά πολλαπλασιάζονται επιλεκτικά με μαρκαρισμένους φθορίζοντες οδηγούς. Τα προϊόντα της PCR από διαφορετικά δείγματα συγκρίνονται μεταξύ τους και όταν αναγνωριστεί ένας πολυμορφικός γονιδιακός τύπος, το επιθυμούμενο θραύσμα DNA μπορεί να απομονωθεί σε μία πηκτή πολυακρυλαμίδης. Τέλος, το απομονωμένο θραύσμα αλληλουχείται και αναγνωρίζεται με βάση την ομοιότητα της DNA αλληλουχίας του σε σχέση με άλλες αλληλουχίες διαθέσιμες σε βάσεις δεδομένων. Παρότι η τεχνική αυτή είναι αξιόπιστη για την εύρεση πολυμορφικών μεθυλιωμένων γενετικών τόπων, η δύναμή της περιορίζεται στις περιοχές αναγνώρισης των ενζύμων πέψης που χρησιμοποιούνται (Yaish et al., 2014).

Με την πάροδο των χρόνων έχουν λάβει χώρα διάφορες τροποποιήσεις και βελτιστοποιήσεις της παραπάνω μεθόδου. Τα ένζυμα HpaII και MspI χρησιμοποιούνται κυρίως για τέτοιου τύπου πέψεις καθώς έχουν διαφορετικό βαθμό

ευαισθησίας στη μεθυλίωση του ίδιου σημείου αναγνώρισης. Η κοπή του DNA από το ένζυμο HpaII αποτρέπεται από την παρουσία μίας 5-μεθυλομάδας στο εσωτερικό κατάλοιπο κυτοσίνης C της αλληλουχίας αναγνώρισης CCGG. Το ισοσχιζομερές του HpaII, το MspI κόβει το DNA ανεξάρτητα της παρουσίας της μεθυλομάδας σε αυτή τη θέση (Waalwijk et al., 1978, Meissner et al., 2008, Lister et al., 2009). Η αναγνώριση των σημείων κοπής στη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης όμως ήταν αρκετά δύσκολη καθώς οποιαδήποτε βάση κυτοσίνης C εντός του μοτίβου CCGG μπορεί να είναι μεθυλιωμένη εντός του φυτικού γονιδιώματος. Μία βελτιστοποίηση που έλαβε χώρα στα πλαίσια αυτής της τεχνικής αφορούσε τη προσθήκη μίας επιπλέον λωρίδας στη πηκτή ηλεκτροφόρησης, στην οποία φορτώνεται δείγμα DNA το οποίο έχει πεφθεί και με τα δύο ένζυμα πέψης. Με αυτόν τον τρόπο είναι εύκολο να γίνει η διάκριση ανάμεσα σε όλα τα σημεία πέψης που εντοπίζονται εντός των CCGG μοτίβων (Fulnecek et al., 2014).

Μία ακόμη τεχνική η οποία χρησιμοποιείται αρκετά συχνά είναι η Methylation-Specific PCR (MSP). Πρόκειται για μία εναλλακτική μέθοδο ανάλυσης της μεθυλίωσης η οποία χρησιμοποιεί DNA που έχει επεξεργαστεί με bisulfite. Η μέθοδος αυτή δεν προχωρά σε αλληλούχιση της περιοχής ενδιαφέροντος, αντιθέτως οι εκκινητές οι οποίοι έχουν σχεδιαστεί είναι ειδικοί ως προς τη μεθυλίωση. Συγκεκριμένα, οι αλληλουχίες αυτών των εκκινητών συμπληρώνουν μόνο τις 5'-μεθυλκυτοσίνες οι οποίες δεν έχουν μετατραπεί σε θυμίνες. Οι εκκινητές σε άλλες περιπτώσεις είναι δυνατόν να είναι ειδικοί ως προς τις μη μεθυλιωμένες βάσεις κυτοσίνης, οπότε και συμπληρώνουν αντίστοιχα τις θυμίνες που έχουν προκύψει από αυτές (Herman et al., 1996). Η μεθυλίωση σε αυτές τις περιπτώσεις προσδιορίζεται από την ικανότητα των συγκεκριμένων εκκινητών να πολλαπλασιάζονται. Πρόκειται για μία ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική για την διερεύνηση των νησίδων CpG με υψηλή συχνότητα μεθυλίωσης καθώς η ύπαρξη ζευγών CpG στον εκκινητή αυξάνει την εξειδίκευσή του, ενώ η τοποθέτηση του ζεύγους CpG στο 3' άκρο του εκκινητή αυξάνει την ευαισθησία του.

Για να επιλεχθεί η σωστή μέθοδος ανάλυσης της DNA μεθυλίωσης πρέπει να ληφθούν υπόψη οι κάτωθι παράγοντες:

- I. Ο στόχος της έρευνας.
- II. Η ποσότητα και η ποιότητα των δειγμάτων DNA.

- III. Η ευαισθησία και η εξειδίκευση των απαιτήσεων της έρευνας.
- IV. Οι δυνατότητες και η απλότητα της μεθόδου.
- V. Η διαθεσιμότητα βιοπληροφορικού υλικού και λογισμικού για την ανάλυση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.
- VI. Η διαθεσιμότητα ειδικού εξοπλισμού και αντιδραστηρίων.
- VII. Το κόστος (Kurdyukov et al., 2016).

1.8 Ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι βακτηριακά ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες 4-8 βάσεων, οι οποίες ονομάζονται σημεία περιορισμού (restriction sites). Τα ένζυμα, αναγνωρίζοντας τα σημεία περιορισμού, κόβουν και τις δύο αλυσίδες του DNA. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται και περιοριστικές ενδονουκλεάσες καθώς κόβουν εντός του μορίου DNA και όχι στα άκρα του όπως οι εξωνουκλεάσες. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για τα βακτήρια καθώς εξασφαλίζουν ότι το εκάστοτε βακτήριο προστατεύει το χρωμοσωμικό του DNA από αποικοδόμηση εξαιτίας ενδογενών περιοριστικών ενδονουκλεασών. Η προστασία αυτή προκύπτει από τροποποιήσεις στις αλληλουχίες αναγνώρισης των ενδονουκλεασών π.χ. μεθυλίωση των κυτοσινών στον 5' C, οι οποίες επιτρέπουν στο ίδιο το βακτήριο να ξεχωρίζει το ξένο γενετικό υλικό και να το ανοικοδομεί τη στιγμή που το δικό τους γενετικό υλικό παραμένει ακέραιο (Waalwijk et al., 1978, Lodish et al., 2000).

Αρκετά από τα σημεία περιορισμού είναι σύντομες, ανεστραμμένες και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (όπως αυτή του EcoRI). Η αλληλουχία είναι ίδια και στις δύο αλυσίδες του DNA καθώς διαβάζεται με φορά 5'→3'. Υπάρχει μία πληθώρα ενζύμων περιορισμού καθώς αυτά προέρχονται από εκατοντάδες διαφορετικά είδη βακτηρίων. Για αυτό και είναι δυνατή η κοπή μορίων DNA σε ένα πλήθος διαφορετικών ακολουθιών οι οποίες ανταποκρίνονται στα αντίστοιχα σημεία περιορισμού αυτών των ενζύμων (Lodish et al., 2000).

Ορισμένα ένζυμα περιορισμού κόβουν στο μέσο της θέσης αναγνώρισης, οπότε και δημιουργούνται λεία άκρα (blunt ends). Άλλα ένζυμα κόβουν και τις δύο αλυσίδες του DNA σε συμμετρικά έκκεντρα σημεία (staggered cuts) μία ή δύο βάσεις από το μέσο, οπότε και δημιουργούνται προεξέχοντα άκρα 2 ή 4 βάσεων αντίστοιχα. Τα

προεξέχοντα άκρα είναι προς την 5' ή την 3' κατεύθυνση, ανάλογα με το ένζυμο. Επειδή η αλληλουχία της μονόκλωνης προέκτασης είναι παλινδρομική, μπορεί να συσχετίζεται με τον εαυτό της και έτσι αυτά τα άκρα αποκαλούνται κολλώδη άκρα (sticky ends).

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού ταξινομούνται σε τέσσερις κύριες ομάδες σύμφωνα με την αλληλουχία αναγνώρισης και τομής, τον αριθμό των υπομονάδων, την αναγκαιότητα παροχής ενέργειας και συνενζύμων για δράση κλπ. (Χατζόπουλος, 2001).

Ομάδα I: Τα ένζυμα αυτής της ομάδας αποτελούνται από τρεις υπομονάδες, δηλαδή τρεις διαφορετικές πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Η μία υπομονάδα είναι αυτή της εξειδίκευσης η οποία προκαθορίζει την εξειδικευμένη αναγνώριση της αλληλουχίας του DNA. Η δεύτερη υπομονάδα είναι αυτή της τροποποίησης, πρόκειται για μία μεθυλάση. Η τρίτη και τελευταία υπομονάδα είναι αυτή του περιορισμού, η ενδονουκλεάση. Για την δράση των τριών αυτών υπομονάδων απαιτείται η παρουσία κατιόντων μαγνησίου (Mg^{2+}), ενέργεια (ATP) καθώς και το συνένζυμο SAM (S-αδενοσυλο-μεθειονίνη) το οποίο παρέχει το μεθύλιο.

Ομάδα II: Στην ομάδα αυτή ανήκουν ένζυμα τα οποία αναγνωρίζουν συμμετρικές αλληλουχίες, αποτελούνται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα και απαιτούν για τη δράση τους κατιόντα μαγνησίου (Mg^{2+}). Τα ένζυμα αυτά, αναγνωρίζουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία και κόβουν τη δίκλωνη αλυσίδα είτε μέσα στην αλληλουχία αυτή είτε πολύ κοντά της. Παράγουν διακριτά τμήματα DNA ορισμένου μεγέθους και αλληλουχίας άκρων. Το σύστημα τροποποίησης εξαρτάται από μία ανεξάρτητη μεθυλάση.

Ομάδα III: Οι ενδονουκλεάσες αυτής της ομάδας είναι σπάνιες και αποτελούνται από δύο υπομονάδες. Η υπομονάδα M αναγνωρίζει την αλληλουχία του DNA και την τροποποιεί, ενώ η υπομονάδα R κόβει το DNA. Οι θέσεις αναγνώρισης είναι ασύμμετρες και απαιτείται για την δράση των δύο υπομονάδων η παρουσία κατιόντων μαγνησίου (Mg^{2+}), ενέργεια (ATP) καθώς και το συνένζυμο SAM.

Ομάδα IV: Τα ένζυμα της ομάδας αυτής μοιάζουν με εκείνα της ομάδας II. Αναγνωρίζουν όμως ασύμμετρες αλληλουχίες ενώ η μία πολυπεπτιδική αλυσίδα η οποία κάνει την τροποποίηση, κάνει και την ενδονουκλεοτιδική τομή η οποία διεγείρεται από την παρουσία του SAM.

Οι πιο συνήθεις ενδονουκλεάσες είναι αυτές της ομάδας II, οι οποίες επί των πλείστων αναγνωρίζουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία. Οι αλληλουχίες αυτές συγκροτούνται από 4, 5, 6, 8 ή 10 νουκλεοτίδια που είναι και συνήθως παλίνδρομα. Οι πιο κοινές ενδονουκλεάσες είναι εκείνες οι οποίες αναγνωρίζουν τέτρα-, έξα- ή όκτα-νουκλεοτίδια παλίνδρομης αλληλουχίας (Χατζόπουλος, 2001).

Η ονοματολογία των ενζύμων προκύπτει από το πρώτο γράμμα του γένους και δύο ακόμη γράμματα από την αρχή του ονόματος του είδους. Πέραν των τριών αυτών γραμμάτων υπάρχει ένα ακόμη το οποίο προκύπτει είτε από τον τύπο, είτε το στέλεχος του βακτηρίου είτε ακόμη και τη θέση όπου εδράζεται το γονίδιο. Στην περίπτωση που ένα στέλεχος έχει περισσότερα του ενός ένζυμα περιορισμού, αυτά κατατάσσονται με λατινικούς αριθμούς π.χ. HpaI, HpaII (Χατζόπουλος, 2001).

1.8.1 Δράση ενζύμων περιορισμού

Η δράση των ενζύμων περιορισμού είναι δυνατόν να ανασταλεί αν η αλληλουχία που αναγνωρίζουν είναι μεθυλιωμένη. Η γνώση της ευαισθησίας των περιοριστικών ενδονουκλεασών ως προς τη μεθυλίωση αυτών των αλληλουχιών θεωρείται απαραίτητη καθώς μπορεί να αξιοποιηθεί σε μελέτες μεθυλίωσης (Doerfler & Bohm, 2006).

Υπάρχει μία πληθώρα ενζύμων περιορισμού τα οποία αναγνωρίζουν την ίδια αλληλουχία και ονομάζονται ισοσχιζομερή. Συχνά όμως τέτοια ζεύγη ισοσχιζομερών διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους στην μεθυλίωση και κατ' επέκταση στη δράση την οποία επιδεικνύουν σε ένα γονιδίωμα. Τα HpaII και MspI είναι ένα τέτοιο ζεύγος ενζύμων. Τα δύο αυτά ένζυμα αναγνωρίζουν την αλληλουχία CCGG και δεν κόβουν αν κάποια από τις δύο ή και οι δύο κυτοσίνες είναι τροποποιημένες με υδροξυ-μεθυλουρακίλη ($^{hm5}C^{hm5}CGG$). Το MspI κόβει την αλληλουχία CCGG στις ακόλουθες περιπτώσεις $^{m4}CCGG$, $C^{m4}CGG$ και $C^{m5}CGG$ στις οποίες όμως το HpaII αδυνατεί να δράσει (Waalwijk et al., 1978, McClelland et al., 1994, Kato et al., 2003, Meissner et al., 2008). Ομοίως, τα ένζυμα MboI και Sau3AI αναγνωρίζουν και τα δύο την αλληλουχία GATC. Στις περιπτώσεις $GAT^{m4}C$ και $GAT^{m5}C$ το MboI διατηρεί την ικανότητά του να πέπτει την αλληλουχία ενώ το ένζυμο Sau3AI όχι (Walder et al., 1983, McClelland et al., 1994, Kavarik et al., 1997, Katsiotis et al., 1998, Eifer et al., 2005). Υπάρχουν και ένζυμα περιορισμού τα οποία δεν είναι ευαίσθητα σε site-specific

μεθυλιώσεις και θεωρούνται ως ιδιαίτερα χρήσιμα όταν είναι επιθυμητή η πλήρης πέψη μεθυλιωμένου DNA (McClelland et al., 1994).

Για να δράσει ένα ένζυμο περιορισμού, δηλαδή να αναγνωρίσει και να “κόψει” μία νουκλεοτιδική αλληλουχία, απαιτούνται συγκεκριμένες συνθήκες θερμοκρασίας, pH κλπ. Όταν τα ένζυμα βρεθούν σε διαφορετικές συνθήκες από τις βέλτιστες, χάνουν την εξειδίκευσή τους και κόβουν το DNA σε παρόμοιες θέσεις αλληλουχίας και όχι μόνο στα σημεία κοπής τους (Χατζόπουλος, 2001).

Το προς μελέτη DNA θα πρέπει να περιλαμβάνει την αλληλουχία αναγνώρισης και κοπής του συγκεκριμένου ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί. Η εξέλιξη της αντίδρασης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την καθαρότητα του υποστρώματος καθώς συχνά κατά την απομόνωση και τον καθαρισμό του DNA διάφοροι παράγοντες οι οποίοι περιορίζουν την δράση των ενζύμων μεταφέρονται στο υπόστρωμα εργασίας. Σημαντική επίσης είναι τόσο η ποιότητα όσο και η ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) του ενζύμου που χρησιμοποιείται. Τις περισσότερες φορές τα ρυθμιστικά διαλύματα παρέχονται έτοιμα με το ένζυμο περιορισμού από την εταιρεία προέλευσης ενώ η ποσότητα που χρησιμοποιείται δεν ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης από 10X buffer. Τέλος, σημαντικό ρόλο παίζει και η ποσότητα του ενζύμου η οποία χρησιμοποιείται σε κάθε αντίδραση. Η ποσότητα του ενζύμου η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μία αντίδραση περιορίζεται από την ποσότητα της γλυκερόλης που περιέχεται στο διάλυμα συντήρησης του ενζύμου. Η γλυκερόλη δε θα πρέπει να υπερβαίνει το 5% του τελικού όγκου της αντίδρασης. Συνήθως, ο όγκος μίας αντίδρασης πέψης κυμαίνεται μεταξύ 30 και 50μl.

1.8.2 Πέψεις με ένζυμα περιορισμού

Η προετοιμασία της πέψης γίνεται αυστηρά πάνω σε πάγο καθώς όλα τα συστατικά πρέπει να διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες. Για κάθε συστατικό το οποίο προστίθεται στο μίγμα της πέψης πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή να μην σχηματιστούν φυσαλίδες κατά την ανάδευση με την πιπέτα. Τελευταίο στο μίγμα της πέψης προστίθεται το ένζυμο το οποίο έως τότε διατηρείται στους -20°C (Southern, 2006).

Η ποσότητα των ενζύμων που χρησιμοποιείται σε μία αντίδραση πέψης πρέπει να είναι σε περίσσεια έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η πλήρης πέψη. Αυτό είναι ένα κρίσιμο στοιχείο σε αυτή την διαδικασία καθώς τα προϊόντα της μερικής πέψεως

μπορεί να λειτουργήσουν παρεμποδιστικά σε ανάλυση τύπου Southern blot (Southern, 2006).

Η επώαση της πέψης γίνεται συνήθως στους 37°C κατά προτίμηση σε υδατόλουτρο. Στην περίπτωση που το DNA έχει κλωνοποιηθεί 1-2 h αρκούν για την ολοκλήρωση της πέψης. Για γονιδιωματικό DNA, η πλήρης πέψη επιτυγχάνεται συνήθως με πέψη καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight). Το ένζυμο είναι δυνατόν να προστεθεί σε δύο δόσεις. Η μισή ποσότητα προστίθεται στην αρχή, κατά την ετοιμασία της αντίδρασης της πέψης και η υπόλοιπη κατά το μέσο του χρόνου της πέψης ή στην περίπτωση της overnight πέψης προστίθεται το πρωί και η πέψη αφήνεται να συνεχιστεί για 1h ακόμα (Aljanabi & Martinez, 1997, Southern, 2006).

1.9 PCR

Το επίτευγμα της PCR οφείλεται στον Δρ. Kary Mullis ο οποίος εμπνεύστηκε την τεχνική της τον Δεκέμβριο του 1983 και βραβεύτηκε για αυτήν το 1993 με το Nobel Χημείας. Πρόκειται για μία τεχνική με άπειρες εφαρμογές στις βιολογικές επιστήμες η οποία μπορεί να χαρακτηριστεί απλή και οικονομική (Χατζηαντωνίου, 2004).

Οποιοδήποτε τμήμα DNA γνωστής αλληλουχίας είναι δυνατόν να πολλαπλασιαστεί παρουσία DNA πολυμεράσης μέσω της τεχνικής της PCR. Η DNA πολυμεράση είναι ουσιαστικά μία κατηγορία ενζύμων η οποία έχει την ιδιότητα να καταλύει τη σύνθεση του DNA. Για να επιτευχθεί λοιπόν ένας *in vitro* πολλαπλασιασμός, απαιτείται εκτός της μήτρας DNA και της DNA πολυμεράσης και ένα ζεύγος εκκινητών (primers). Οι εκκινητές ή εκκινητικά μόρια είναι ζεύγη ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία έχουμε συνθέσει και χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διαδικασία γιατί υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA (Πελεκάνος, Russell, 2013).

Η επιτυχής λειτουργία της PCR βασίζεται στην απαραίτητη παρουσία τεσσάρων βασικών συστατικών και αν κάποιο από αυτά απουσιάζει δεν πραγματοποιείται σύνθεση του DNA. Τα στοιχεία αυτά είναι:

1. Τα τέσσερα dNTPs (δηλαδή οι τέσσερις τριφωσφορικοί δεσοξυριβονουκλεοζίτες – dATP, dGTP, dTTP, dCTP). Αν κάποιο από αυτά λείπει, είναι αδύνατο να ολοκληρωθεί η σύνθεση νέας αλυσίδας DNA.

2. Τμήμα του DNA το οποίο λειτουργεί ως μήτρα αντιγραφής και πολλαπλασιασμού.
3. Το ένζυμο της πολυμεράσης
4. Ιόντα μαγνησίου τα οποία βελτιστοποιούν την ενεργότητα του ενζύμου (Πελεκάνος, Russell, 2013).

Το ένζυμο το οποίο χρησιμοποιείται συνήθως στις αντιδράσεις PCR ονομάζεται *TaqI* και έχει απομονωθεί από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Έχει την ικανότητα να διατηρεί την δραστικότητα του σε θερμοκρασία 95°C για τουλάχιστον 40 λεπτά (Brown, 1994). Το χαρακτηριστικό της αυτό έχει διευκολύνει κατά πολύ την χρήση της PCR καθώς δεν απαιτείται μετά από κάθε κύκλο η εκ νέου προσθήκη πολυμεράσης. Βέβαια, για την δράση της *TaqI* απαιτείται και ένα κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) το οποίο συνήθως παρέχεται από τις εταιρείες μαζί με το ένζυμο σε συγκέντρωση 10X. Πέραν της *TaqI* έχουν πλέον απομονωθεί και άλλα ένζυμα αντίστοιχης δράσης από άλλα βακτήρια όπως παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα (Griffin & Griffin, 1994).

Enzyme (DNA pol)	Source	Molecular weight (kDa)	Optimum range of reaction conditions				Exonuclease activity		General applications	Ref.
			MgCl ₂ (mM)	KCl (mM)	pH	Temperature (°C)	5' → 3'	3' → 5'		
<i>Taq</i> TM	<i>Thermus aquaticus</i>	94	2–4	50–55	7.8–9.4	70–80	Yes	No	PCR, cloning, direct sequencing, mutagenesis	2-4
<i>Stoffel</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	61.3	2–10	10	8.3	70–80	No	No	DNA sequencing, PCR of template with secondary structures, amplification of large quantity of PCR product, higher thermostability allows greater number of amplification cycles	29
<i>Tth</i> TM	<i>Thermus thermophilus</i>	110–120	1.5–2.5	100	8–9.3	50–60	Yes	No	PCR from mRNA template with high sensitivity (Mn ²⁺ is required for reverse transcription), cloning genes from cellular and viral RNA, PCR detection from blood samples	5,6
<i>Tli/Vent</i> TM	<i>Thermococcus litoralis</i>	92–97	2–8	0–50	8–9	72–80	No	Yes	PCR DNA synthesis with high fidelity, ligation of blunt-end DNA fragments, DNA sequencing, gene cloning, and site-directed mutagenesis	7–9
<i>pfu</i> TM	<i>Pyrococcus furiosus</i>	92	1.5–8	10	8–9	70–80	Yes	Yes	PCR DNA synthesis with high fidelity, cloning, sequencing, and site-directed mutagenesis	10-14
<i>Bst</i> TM	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	95	10–30	100–200	8–9	60–65	No	No	PCR and general sequencing with high sensitivity	15,16
<i>Sac</i>	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	100	2–8	ND	7–8	70–80	No	Yes	DNA sequencing, site-directed mutagenesis, gene fusions by PCR	17–19
<i>Tac</i>	<i>Thermoplasma acidophilum</i>	88	2–4	ND ^c	8–9	65	No	Yes	PCR for A-T rich templates in shorter cycling time	20
<i>Tfi/Tub</i> TM	<i>Thermus flavus</i>	66	10–15	5–10	7–8	70 ^a 50 ^a	No	No	PCR amplification of large-template DNA (>10 kb)	21–23
<i>Tru</i>	<i>Thermus ruber</i>	70	2–3	15	7–12	50	No	No	Potential for PCR amplification of contaminated samples, DNA sequencing	24
<i>Tsp</i>	<i>Thermotoga</i> sp.	85	10	10	7.5–8	80	No	No	Potential for PCR amplification	25
<i>Mth</i>	<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	72	10–20	100–300	7–9	65	Yes	Yes	Potential for DNA sequencing, gene cloning, site-directed mutagenesis, PCR amplification of A-T rich DNA	26

^a *Taq*TM, *Tth*TM, and *Stoffel* *Fragment*TM DNA pols are registered trademarks of Perkin Elmer Corporation, 761 Main Ave., Norwalk, CT 06859.
^b *Vent*TM DNA pol is a registered trademark of New England Biolabs, Inc., 32 Tozer Rd., Beverly, MA 01915-5599.
^c *pfu*TM DNA pol is a registered trademark of Stratagene Cloning Systems, Inc., 11099 N. Torrey Pines Rd., La Jolla, CA 92037.
^d *Bst*TM DNA pol is a registered trademark of BioRad Laboratories, 3300 Regatta Blvd., Richmond, CA 94804.
^e *Tfi/Tub*TM DNA pol is a registered trademark of Promega Corporation, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399.
^f ND = not determined.
^g DNA template.
^h RNA template.

Πίνακας 1.5: Comparisons of the Properties and Application of Various
Thermostable DNA Polymerase

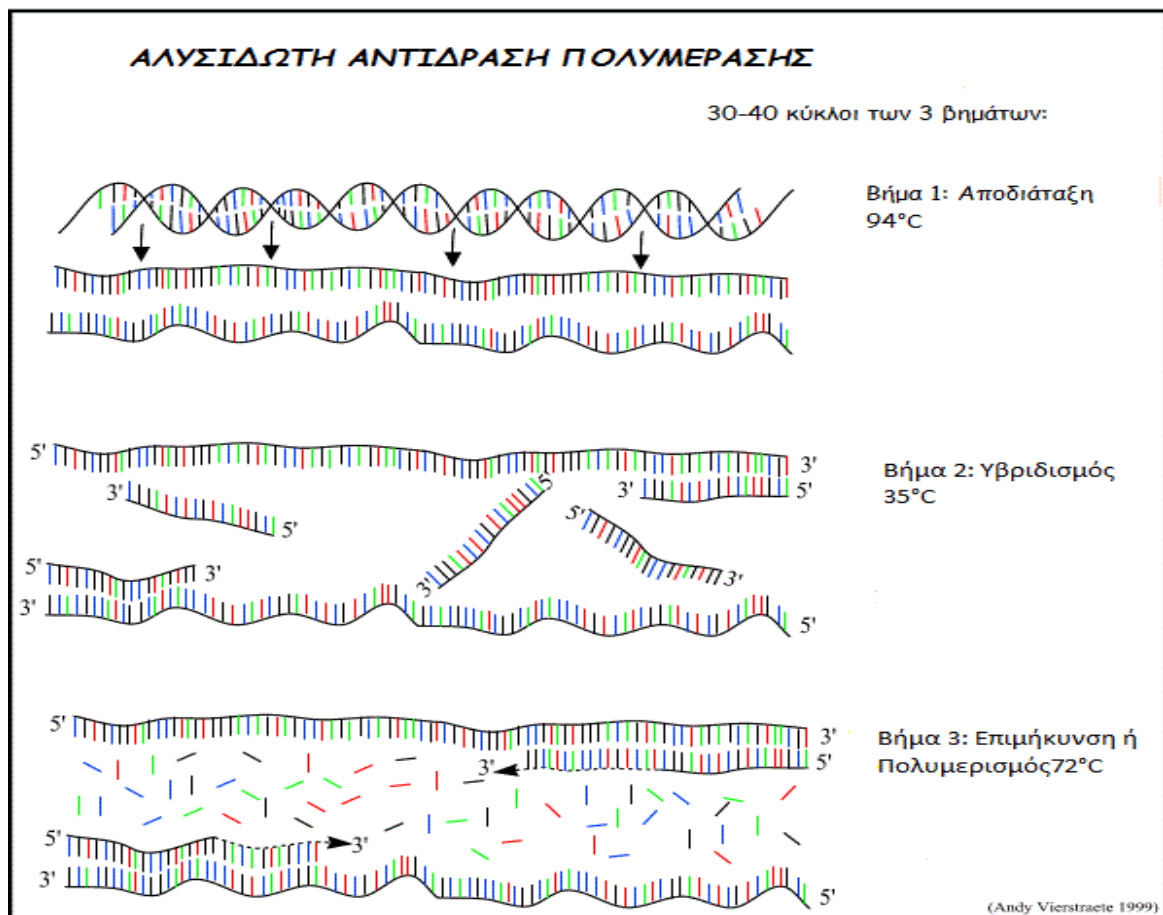
1.9.1 Τα στάδια της PCR

Πρώτο στάδιο – Αποδιάταξη του DNA: Η θερμοκρασία αυξάνεται στους 94-95°C και το δίκλωνο DNA οδηγείται σε αποδιάταξη (Φανουράκης, 2002). Η αποδιάταξη αυτή λαμβάνει χώρα καθώς οι δεσμοί υδρογόνου οι οποίοι έχουν αναπτυχθεί μεταξύ των βάσεων του DNA σπάνε εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας. Με αυτό τον τρόπο προκύπτουν πλέον δύο μονόκλωνες αλυσίδες. Επιπλέον, εξαιτίας των υψηλών θερμοκρασιών που επικρατούν παύουν και οι ενζυματικές αντιδράσεις.

Δεύτερο στάδιο – Υβριδισμός: Τα δείγματα ψύχονται στους 37-65°C. Η θερμοκρασία καθορίζεται από την αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιούνται καθώς και από την μέθοδο που εφαρμόζεται (Φανουράκης, 2002). Η θερμοκρασία αυτή είναι κατάλληλη για τη πρόσδεση των εκκινητών στο αποδιατεταγμένο DNA με προσανατολισμό των 3' άκρων τους στο εσωτερικό της αλληλουχίας στόχου. Η πρόσδεση αυτή είναι δυνατή εξαιτίας των ιοντικών δεσμών οι οποίοι αναπτύσσονται παροδικά (Πελεκάνος, Russell, 2013). Η συμπλήρωση μερικών βάσεων της αλληλουχίας μέσω της δράσης της πολυμεράσης ισχυροποιεί αυτούς τους δεσμούς και ο κίνδυνος να ξανασπάσουν είναι μειωμένος (Griffin & Griffin, 1994). Ο ένας εκκινητής υβριδοποιείται στο 3' άκρο της μίας αλυσίδας του DNA ενώ ο άλλος στο αντίστοιχο σημείο της συμπληρωματικής αλυσίδας. Η περίσσεια του εκκινητή αποτρέπει την υβριδοποίηση του αρχικού DNA με τον εαυτό του και γι' αυτό είναι επιθυμητή.

Τρίτο στάδιο – Πολυμερισμός: Η θερμοκρασία ανέρχεται στους 70-75°C (Φανουράκης, 2002). Όσα μόρια εκκινητών έχουν αποκτήσει ισχυρούς δεσμούς με το DNA συνεχίζουν να επιμηκύνονται υπό την δράση της πολυμεράσης. Όσοι όμως εκκινητές δεν έχουν προσδεθεί καλά στην αλυσίδα του γενετικού υλικού αποκολλούνται από αυτή εξαιτίας της σχετικά υψηλής θερμοκρασίας (Πελεκάνος, Russell, 2013).

Τα τρία αυτά στάδια επαναλαμβάνονται αρκετές φορές (30-40 συνήθως) και έχουν ως αποτέλεσμα τα τμήματα-στόχοι του DNA να πολλαπλασιάζονται εκθετικά. Με το πέρας αυτών των τριών σταδίων, λαμβάνει χώρα η τελική επιμήκυνση των σχηματισθέντων προϊόντων στους 70-72°C για 5-10 min μέχρι την τελική κατανάλωση του ενζύμου το οποίο έχει προστεθεί.



Εικόνα 1.1: Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR), Andy Vierstraete, 1999.

1.9.2 Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της PCR

Η PCR είναι μία μέθοδος πολλαπλασιασμού τμημάτων DNA η οποία χαρακτηρίζεται από ταχύτητα και απλότητα. Είναι πιο ευαίσθητη και ταχεία ως διαδικασία σε σύγκριση με αυτή της κλωνοποίησης. Η αξιοπιστία της τεχνικής αυτής αυξάνεται με τη χρήση θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης. Για την πραγματοποίησή της, απαιτείται μία μικρή ποσότητα DNA τη στιγμή που σε άλλες μεθόδους απαιτείται η τριπλάσια ή και τετραπλάσια ποσότητα DNA. Το τμήμα του DNA όμως το οποίο μπορεί να αντιγραφεί, είναι περιορισμένου μεγέθους. Ο περιορισμός αυτός οφείλεται στην αδυναμία του ενζύμου να συνθέσει μεγαλύτερες αλυσίδες των 20kb σε *in vitro* συνθήκες (Cox et al., 1992, Ponce et al., 1992, Rashtchian A., 1995, Πελεκάνος, Russell, 2013).

1.10 Southern blot

Πρόκειται για μία τεχνική της μοριακής βιολογίας η οποία πήρε το όνομά της από το Βρετανό βιολόγο Edwin Southern και χρησιμοποιείται για την ανίχνευση

συγκεκριμένων μορίων μέσα από ένα μίγμα μορίων με τη χρήση ηλεκτροφόρησης πηκτής αгарόζης. Τα μόρια μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης μεταφέρονται από την πηκτή σε μία πορώδη μεμβράνη μέσω τριχοειδούς δράσης (Brown, 1999). Η μεταφορά μέσω τριχοειδούς ροής επιτυγχάνεται με τη χρήση πολλών απορροφητικών χαρτιών. Με την απορρόφηση του υγρού μεταφοράς από το πακέτο με τα απορροφητικά χαρτιά, πραγματοποιείται ταυτόχρονα και η κίνηση των μορίων από την πηκτή αгарόζης προς τη μεμβράνη.

Συνήθως η μεμβράνη η οποία χρησιμοποιείται σε αυτή τη μέθοδο είναι από νάilon (Bej et al., 1990, Southern, 2006). Οι νάilon μεμβράνες, σε σχέση με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης, έχουν μεγαλύτερη μηχανική δύναμη, μεγαλύτερη χωρητικότητα νουκλεϊκών οξέων ενώ δεσμεύουν μικρότερα τμήματα ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία και συγκρατούν καλύτερα. Η UV ακτινοβολία καταλύει την ομοιοπολική δέσμευση νουκλεϊκών οξέων στη νάilon μεμβράνη και ουσιαστικά μας παρέχουν τα πλεονεκτήματα της νιτροκυτταρίνης χωρίς τα μειονεκτήματά της. Οι νάilon μεμβράνες μπορεί να είναι θετικά φορτισμένες ή μπορεί να μη φέρουν φορτίο (Reed & Mann, 1985, Brown, 1999).

Το Southern blot είναι μία τεχνική η οποία χρησιμοποιείται για την ανάλυση της γονιδιωματικής οργάνωσης και έκφρασης και που χαρακτηρίζεται από υψηλή εξειδίκευση (Reed & Mann, 1985, Albers et al., 2017). Το πρωτόκολλο το οποίο χρησιμοποιείται δεν είναι ακριβό, απαιτεί βασικό εργαστηριακό εξοπλισμό και είναι δυνατόν να εκτελεστεί εντός 1-5 ημερών. (Southern, 2006). Για αυτούς τους λόγους, η ανάλυση κατά Southern αποτελεί μία δημοφιλή μέθοδο για την ανίχνευση και την ανάλυση της μεθυλίωσης παρά την αυξημένη δημοτικότητα κάποιων τεχνικών, όπως η μεταχείριση με bisulfite (Moore, 2018).

Η όλη διαδικασία περιλαμβάνει εν συντομία τα παρακάτω βήματα:

1. Καθαρισμός του DNA το οποίο πρόκειται να χρησιμοποιηθεί.
2. Πένση με ένζυμα περιορισμού (2-24 ώρες).
3. Ηλεκτροφόρηση πηκτής αгарόζης (1-6 ώρες).
4. Μεταφορά των μορίων από την πηκτή αгарόζης στη μεμβράνη (νάilon, νιτροκυτταρίνη κ.λπ.): Προετοιμασία μεταφοράς (2-3 ώρες). Transfer setup (15 λεπτά). Μεταφορά (3-16 ώρες για μεταφορά και 1-2 ώρες οι λοιπές διαδικασίες

μετά τη μεταφορά). Blocking (1 ώρα). Υβριδοποίηση (1-16 ώρες ανάλογα με την πολυπλοκότητα του ανιχνευτή και τη συγκέντρωση).

5. Προετοιμασία και σήμανση του ανιχνευτή (ο οποίος μπορεί να είναι DNA ή RNA).

6. Ανίχνευση (1-48 ώρες, ανάλογα με την απόδοση του υβριδίου και την εξειδικευμένη δραστηριότητα του ανιχνευτή).

Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες χρησιμοποιούνται για τον κατακερματισμό υψηλού μοριακού βάρους DNA. Αν το DNA είναι γονιδιωματικό και δεν προέρχεται από κλωνοποίηση, η πέψη θα πρέπει να διαρκέσει όλη τη νύχτα (Southern, 2006).

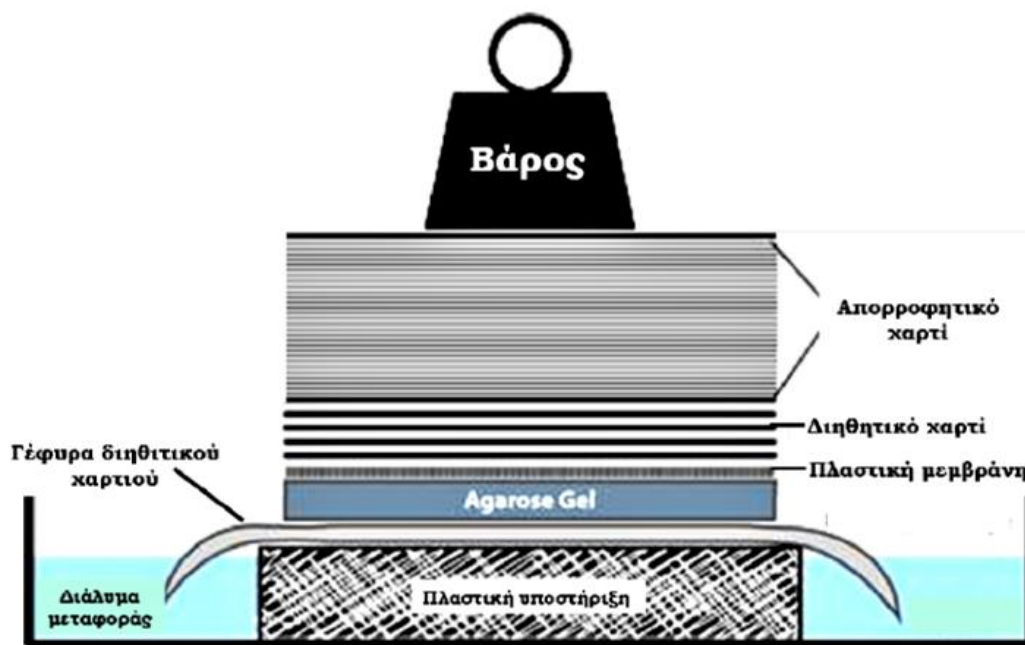
Η συγκέντρωση της πηκτής αгарόξης εξαρτάται από το μέγεθος των τμημάτων του DNA τα οποία θα διαχωρισθούν. Γενικά προτιμώνται οι μεγαλύτερου μήκους πηκτές έτσι ώστε να διασφαλίζεται ο επαρκής διαχωρισμός του γονιδιωματικού DNA και των πολλαπλών τμημάτων παρόμοιου μεγέθους. Εάν η ηλεκτροφόρηση είναι μικρής διάρκειας προτιμάται το TAE ενώ για ηλεκτροφόρηση μεγαλύτερης διάρκειας των 2h προτιμάται το TBE. Όταν η ηλεκτροφόρηση έχει προγραμματιστεί να διαρκέσει αρκετές ώρες, το ρυθμιστικό διάλυμα της ηλεκτροφόρησης προστίθεται σε μεγάλες ποσότητες. Το διάλυμα σχεδόν γεμίζει τη θήκη ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε να μειωθεί η πιθανότητα να λιώσει η πηκτή από την αύξηση της θερμοκρασίας (Southern, 2006).

Η πηκτή αгарόξης μεταφέρεται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός και φωτογραφίζεται δίπλα από ένα χάρακα. Αν το DNA έχει κλωνοποιηθεί θα πρέπει να εμφανίζεται ως διακριτές μπάντες ενώ αν είναι γονιδιωματικό ως μία συνεχόμενη αχνή λωρίδα (smear) με πιο έντονα σημεία τα οποία αντιπροσωπεύουν επαναλαμβανόμενα στοιχεία (de Muro et al., 2002, Southern, 2006, Albers et al., 2017, Tarik et al., 2018). Μετά από την φωτογράφιση της πηκτής παρουσία χάρακα αποκόπτονται τα περιττά τμήματά αυτής.

Στη συνέχεια, γίνεται μία σειρά εμβάπτισεων της πηκτής με στόχο την αποπουρίνωση, την αποδιάταξη και την ουδετεροποίηση των μορίων του DNA. Η αποπουρίνωση λαμβάνει χώρα κατά την εμβάπτιση της πηκτής σε αραιό διάλυμα HCl. Με την αποπουρίνωση ουσιαστικά απομακρύνονται τυχαίες βάσεις πουρινών (A & G) δημιουργώντας έτσι τυχαίες θραύσεις στο DNA. Αυτές οι τυχαίες θραύσεις διευκολύνουν την μεταφορά των μορίων του DNA από την πηκτή στη μεμβράνη σε

επόμενο στάδιο (Τσουμάνη & Ματθιόπουλος, 2014). Ακολουθεί η εμβάπτιση της πηκτής σε διάλυμα αποδιάταξης το οποίο συμβάλει στην αποδιάταξη των διπλών αλυσίδων των μορίων του DNA. Οι μονές πλέον αλυσίδες είναι κατάλληλες για το στάδιο του υβριδισμού. Τέλος, η πηκτή εμβαπτίζεται σε διάλυμα ουδετεροποίησης του οποίου η δράση στοχεύει στη ρύθμιση του pH, το οποίο πρέπει να είναι μικρότερο από 9. Το στάδιο αυτό είναι κρίσιμο γιατί αν δεν μειωθεί το pH δε θα δεσμευθούν τα μόρια του DNA στην μεμβράνη, ειδικά αν αυτή είναι νιτροκυτταρίνη (Brown, 1999).

Το επόμενο στάδιο στο Southern blotting είναι η μεταφορά των μορίων DNA από την πηκτή αгарόζης στην μεμβράνη. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει να γίνει σωστό στήσιμο του «σάντουιτς» μεταφοράς, όπως αυτό παρουσιάζεται στην ακόλουθη εικόνα. Σε αυτό το στάδιο είναι ιδιαίτερα σημαντικό να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες που μπορεί να σχηματιστούν καθώς τοποθετούνται τα διάφορα «στρώματα». Το βάρος που τοποθετείται στη κορυφή αυτής της κατασκευής πρέπει είναι ικανό να εξασφαλίζει την καλή επαφή των υπόλοιπων στρωμάτων μεταξύ τους, χωρίς όμως να οδηγεί σε παραμορφώσεις λόγω υψηλής πίεσης ή ακόμα και στην παρεμπόδιση της μεταφοράς (Brown, 1999).



Εικόνα 1.2: Συναρμολόγηση του «σάντουιτς» για τη μεταφορά νουκλεϊκών οξέων κατά Southern.

1.11 Υβριδισμός

Μία βασική δομή για τον υβριδισμό ανιχνευτών, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως, αφορά την ακινητοποίηση του νουκλεϊκού στόχου σε ένα στερεό μέσο τη στιγμή που ανιχνευτής βρίσκεται σε υγρό διάλυμα. Το στερεό μέσο είναι συνήθως μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή νάilon, αλλά μπορεί να είναι λατέξ, μαγνητικές χάντρες ή ακόμη και microtiter plates. Τα μέσα αυτά χρησιμοποιούνται κυρίως σε χρωματογραφικού τύπου ανίχνευση και όταν δεν πρόκειται να γίνει αφαίρεση του ανιχνευτή (stripping) και ανίχνευση σήματος με έναν νέο ανιχνευτή (reprobing).

Στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η αφαίρεση του ανιχνευτή και η εκ νέου ανίχνευση του σήματος με κάποιο άλλο ανιχνευτή, συνιστάται η χρήση θετικά φορτισμένων νάilon μεμβρανών. Οι μεμβράνες αυτές μπορούν και εξασφαλίζουν μία επιθυμητή αναλογία σήματος–υποβάθρου στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το σύστημα σήμανσης και ανίχνευσης DIG. Οι θετικά φορτισμένες νάilon μεμβράνες προτιμώνται σε σύγκριση με τις μεμβράνες νιτροκυτταρίνης καθώς οι δεύτερες μπορούν να συγκρατήσουν μεγάλες ποσότητες DNA, αλλά σταδιακά καθίστανται όλο και πιο εύθραυστες και απελευθερώνουν όλο και μεγαλύτερες ποσότητες DNA στο στάδιο του υβριδισμού (Brown, 1999, de Muro et al., 2002).

Υπάρχουν πολλές διαθέσιμες μέθοδοι υβριδισμού ανιχνευτών σε υγρό διάλυμα οι οποίοι εφαρμόζονται σε στερεά μέσα στα οποία έχει ακινητοποιηθεί ο νουκλεϊκός στόχος. Οι μέθοδοι αυτές διαφέρουν στα διαλύματα που χρησιμοποιούν, στις θερμοκρασίες που απαιτούν, στον χρόνο υβριδισμού κ.λπ. Παρόλα αυτά όλες οι μέθοδοι έχουν κάποια κοινά βασικά χαρακτηριστικά.

Αρχικά, ο νουκλεϊκός στόχος μεταφέρεται και ακινητοποιείται σε μεμβράνη. Η μεταφορά γίνεται συνήθως σύμφωνα με την τεχνική του Southern blotting (όπως αυτή περιγράφηκε προηγουμένως), ενώ η ακινητοποίηση μπορεί να λάβει χώρα είτε με ξήρανση της μεμβράνης είτε με έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (Τσουμάνη & Μαθιόπουλος, 2014). Η ξήρανση γίνεται με θέρμανση στους 80°C για 30min-2h ενώ συχνά η ξήρανση ακολουθείται από την έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία. Η έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία εφαρμόζεται μόνο σε στεγνές μεμβράνες και προτιμάται η εφαρμογή της σε περίπτωση χρήσης νάilon μεμβρανών. Η έκθεση σε UV φως οδηγεί στην ομοιοπολική δέσμευση των νουκλεϊκών μορίων στις μεμβράνες την ίδια στιγμή που αυτές καθίστανται επιδεκτικές σε πολλαπλές επανασημάνσεις (Brown, 1999).

Η μεμβράνη προϋβριδίζεται με διάλυμα όμοιο με αυτό του υβριδισμού το οποίο όμως δεν περιέχει ανιχνευτή. Το διάλυμα προϋβριδισμού αποτρέπει τη μη ειδική δέσμευση DNA στην επιφάνεια της μεμβράνης οδηγώντας στη μείωση της έντασης του υποβάθρου. Τα μη ειδικά σημεία δέσμευσης DNA στη μεμβράνη είναι συνήθως κορεσμένα με carrier DNA και συνθετικά πολυμερή. Στη συνέχεια, το ρυθμιστικό διάλυμα προϋβριδισμού αντικαθίσταται από ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού. Αυτό το στάδιο διαφέρει ανάλογα με τον τύπο του ανιχνευτή που αξιοποιείται στο εκάστοτε πείραμα. Σε όλες τις περιπτώσεις πρέπει να είναι γνωστή η επιθυμητή συγκέντρωση του ανιχνευτή στο διάλυμα υβριδισμού που θα χρησιμοποιηθεί. Αν ο σημασμένος ανιχνευτής είναι RNA, οπότε και μονής αλυσίδας, το μόνο που χρειάζεται να γίνει είναι σωστός υπολογισμός της ποσότητάς του που πρέπει να προστεθεί στο διαθέσιμο διάλυμα υβριδισμού. Στην περίπτωση όμως που ο σημασμένος ανιχνευτής είναι μορφής dsDNA, δηλαδή DNA διπλής αλυσίδας, η αποδιάταξή του πριν τη χρήση του είναι απαραίτητη. Η αποδιάταξη γίνεται συνήθως μέσω ενός θερμικού σοκ (βρασμός για 5-10min). Στόχος της αποδιάταξης είναι τα μόρια του ανιχνευτή που είναι διπλής αλυσίδας να τραπούν σε μονής αλυσίδας έτσι ώστε να καταστεί δυνατός ο υβριδισμός τους με τον νουκλεϊκό στόχο. Η επώαση της μεμβράνης στο διάλυμα υβριδισμού λαμβάνει χώρα σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight). Ο χρόνος αυτός θεωρείται κατάλληλος για τον επιτυχή υβριδισμό του σημασμένου ανιχνευτή στον ακινητοποιημένο νουκλεϊκό στόχο του (Brown, 1993).

Μετά τον υβριδισμό ακολουθούν εκπλύσεις κατάλληλες για τον χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή (de Muro et al., 2002). Οι εκπλύσεις στοχεύουν στην απομάκρυνση των πιο χαλαρά δεσμευμένων μορίων του ανιχνευτή από τη μεμβράνη. Στο τέλος των εκπλύσεων παραμένουν συνδεδεμένα στη μεμβράνη μόνο τα μόρια του ανιχνευτή που έχουν σχηματίσει πολύ ισχυρά υβρίδια με το νουκλεϊκό στόχο (υβρίδια με πλήρως ομόλογες αλληλουχίες μεταξύ στόχου και ανιχνευτή). Αν οι εκπλύσεις που γίνουν είναι λιγότερο αυστηρών συνθηκών τότε είναι δυνατόν να ανιχνευθούν συγγενικές αλλά όχι πανομοιότυπες αλληλουχίες. Η δυναμικότητα των εκπλύσεων εξαρτάται άμεσα από την ιονική δύναμη του τελικού διαλύματος έκπλυσης αλλά και από την θερμοκρασία που αυτή λαμβάνει χώρα (Brown, 1993).

1.12 Σήμανση και ανίχνευση

Το πιο απλό, κατανοητό, αποτελεσματικό και μη ραδιενεργό σύστημα σήμανσης και ανίχνευσης DNA, RNA και ολιγονουκλεοτιδίων θεωρείται το σύστημα DIG. Το DIG (digoxigenin) όπως και η βιοτίνη, μπορεί να ενωθεί χημικά με linkers και νουκλεοτίδια. Ακόμη, DIG-υποκατεστημένα νουκλεοτίδια είναι δυνατόν να ενσωματωθούν σε ανιχνευτές νουκλεϊκών οξέων μέσω καθορισμένων ενζυματικών μεθόδων. Το πλεονέκτημα αυτών των DIG-σημασμένων ανιχνευτών έναντι εκείνων που σημαίνονται με βιοτίνη, είναι το πιο καθαρό φόντο. Γενικά όμως τα μη ραδιενεργά μέσα σήμανσης μειονεκτούν στο ότι προσφέρουν ένα συγκριτικά πιο έντονο και μη συγκεκριμένο υπόβαθρο (Solanas & Escrich, 1997).

Για τη δέσμευση ενός DIG-σημασμένου ανιχνευτή είναι απαραίτητο το anti-digoxigenin-αντίσωμα το οποίο έχει ενωθεί με αλκαλική φωσφατάση. Το σήμα αυτών μπορεί να ανιχνευθεί χρωματογραφικά ή χημειοφωταυγικά εξαιτίας της αλκαλικής φωσφατάσης. Στην περίπτωση κατά την οποία χρησιμοποιηθεί υλικό για χρωματογραφική ανίχνευση, το σήμα αναπτύσσεται κατευθείαν στην μεμβράνη. Στην περίπτωση όμως που χρησιμοποιηθεί υλικό για χημειοφωταυγική ανίχνευση, το σήμα αναπτύσσεται σε φιλμ ακτίνας X (Bej et al., 1990, de Muro et al., 2002).

Ένα πρόβλημα το οποίο εντοπίζεται στην περίπτωση χημειοφωταυγικής ανίχνευσης, αφορά το υγρό με ονομασία CSPD το οποίο προκαλεί την αντίδραση της χημειοφωταύγειας. Το CSPD ως υγρό διάλυμα περιέχει την ακέραιη μορφή του και το αποφωσφορυλιωμένο ανιόν του. Τα δύο αυτά συστατικά είναι αμφιφιλικά, γεγονός που εξηγεί την δημιουργία συσσωματωμάτων τους σε υδατικά διαλύματα. Αυτή η ιδιότητά τους ευθύνεται για την καθυστέρηση της σταθερότητας της εκπομπής του φωτός. Ως συνέπεια, απαιτούνται μεγάλοι χρόνοι έκθεσης των φιλμ ακτινών X στις μεμβράνες αυτές για τη λήψη μιας ικανοποιητικής εικόνας (Solanas & Escrich, 1997).

Η αποφυγή τόσο μεγάλων χρόνων έκθεσης είναι δυνατή. Για να επιτευχθεί, θα πρέπει να προηγηθεί επώαση των μεμβρανών για κάποια λεπτά σε θερμοκρασία γύρω στους 37°C. Η επώαση αυτή, εξασφαλίζει τη μείωση του σχηματισμού συσσωματωμάτων και ο χρόνος έκθεσης που απαιτείται για μία ικανοποιητική λήψη είναι σαφώς μικρότερος (Solanas & Escrich, 1997).

1.13 Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής, για τον οποίον έχει γίνει λόγος τόσες φορές, είναι ένα μόριο νουκλεϊκών οξέων –ds/ssDNA ή RNA- ποικίλου μεγέθους (100-1.000bp συνήθως) το οποίο είναι δεκτικό σε σήμανση και έχει υψηλού βαθμού συγγένεια με ένα συγκεκριμένο στόχο (αλληλουχία DNA ή RNA) (de Muro et al., 2002, Southern, 2006).

Ένας RNA ανιχνευτής μπορεί να απομονωθεί από κύτταρα ή και να κατασκευαστεί με *in vitro* μεταγραφή από κλώνους ή προϊόντα PCR. Ένας DNA ανιχνευτής μπορεί και αυτός να προέρχεται και αυτός από κλώνους, προϊόντα PCR κ.λπ. Η σήμανση ενός ανιχνευτή, οποιασδήποτε μορφής, μπορεί να γίνει με ποικίλους τρόπους (Eifert et al., 2005, Southern, 2006).

Ο ανιχνευτής με το νουκλεϊκό στόχο του πρέπει να είναι συμπληρωματικοί ως προς την αλληλουχία τους. Αυτό βέβαια εξαρτάται και από άλλους παράγοντες οπότε η συμπληρωματικότητά τους μπορεί να μην ανέρχεται σε ποσοστό 100%. Όταν όμως αυτά τα δύο συνδεθούν σχηματίζουν ένα υβρίδιο το οποίο είναι δυνατόν να αποκαλυφθεί όταν χρησιμοποιηθούν τα κατάλληλα συστήματα σήμανσης και ανίχνευσης (de Muro et al., 2002).

Ο σχεδιασμός ενός ανιχνευτή εξαρτάται κυρίως από τον πειραματικό στόχο που επιθυμούμε να επιτύχουμε. Κατ' επέκταση αυτού του στόχου γίνεται και η επιλογή του κατάλληλου είδους ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί. Ο ανιχνευτής μπορεί να είναι ανιχνευτής-γονίδιο ή ανιχνευτής-ολιγονουκλεοτιδίων. Στην περίπτωση του ανιχνευτή-γονιδίου, γίνεται λόγος για ανιχνευτή μεγέθους που ξεπερνά συνήθως τις 500bp και περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος ενός συγκεκριμένου γονιδίου αν όχι και ολόκληρο το γονίδιο. Οι ανιχνευτές-γονίδια έχουν μεγαλύτερη εξειδίκευση σε σχέση με τους ανιχνευτές-ολιγονουκλεοτίδια εξαιτίας των μεγαλύτερων αλληλουχιών τους. Επιπλέον, είναι δυνατόν στους ανιχνευτές-γονίδια να γίνει ενσωμάτωση περισσότερων ανιχνεύσιμων μορίων από ότι στους ανιχνευτές-ολιγονουκλεοτιδίων (de Muro et al., 2002).

Οι ανιχνευτές-γονιδίων μπορούν να παραχθούν με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος είναι με κλωνοποίηση στην περίπτωση που υπάρχουν διαθέσιμοι κλώνοι ή που η αλληλουχία DNA είναι άγνωστη και απαιτείται χαρτογράφηση και αλληλούχισή της. Ο δεύτερος τρόπος είναι με PCR. Είναι δυνατόν σε αυτή τη περίπτωση να γίνει ταυτόχρονα ενίσχυση και σήμανση μεγάλων τμημάτων DNA. Αυτό επιτυγχάνεται με

χρήση χρωμοσωμικού ή πλασμιδιακού DNA ως μήτρα και με σημασμένα νουκλεοτίδια τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στο στάδιο της επιμήκυνσης (Aquino de Muro et al., 2002). Διαφορετικά, είναι δυνατόν να προηγηθεί η ενίσχυση του ανιχνευτή μέσω της PCR και να ακολουθήσει σε δεύτερο χρόνο η σήμανση των προϊόντων της με κατάλληλες διαδικασίες π.χ. σήμανση με το Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Cat. No. 11 585 614 910) της Roche.

Οι ανιχνευτές-ολιγονουκλεοτιδίων στοχεύουν σε συγκεκριμένες αλληλουχίες εντός των γονιδίων. Κατά κύριο λόγο τέτοιου είδους ανιχνευτές απαρτίζονται από 18-30bp αλλά είναι δυνατόν να αποτελούνται και από περισσότερες των 100bp. Αυτή η κατηγορία ανιχνευτών δημιουργεί υβρίδια με 100% συμπληρωματικότητα μεταξύ ανιχνευτή και στόχου. Επιπλέον, το μέγεθός τους επαρκεί για να αποφευχθεί ο υβριδισμός με συγγενικές αλληλουχίες καθιστώντας δυνατή την αναγνώριση και ανίχνευση DNA με μικρές διαφορές αλληλουχίας μέσα σε ένα καλά συντηρημένο γονίδιο (de Muro et al., 2002).

Η σωστή επιλογή ανιχνευτή-ολιγονουκλεοτιδίων από γνωστή αλληλουχία ενός γονιδίου βασίζεται στα κάτωθι κριτήρια:

- Το μήκος της αλληλουχίας συνιστάται να κυμαίνεται μεταξύ 18 και 50bp για να επιτυγχάνεται η μέγιστη αποδοτικότητα κατά τη σύνθεση του ανιχνευτή αλλά και αργότερα κατά τον υβριδισμό. Φυσικά, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως είναι δυνατό το μέγεθος αυτού του είδους ανιχνευτή να ξεπερνά τις 100bp.
- Το ποσοστό των βάσεων GC πρέπει να κυμαίνεται από 40 έως 60%.
- Εντός της αλληλουχίας του ανιχνευτή συστήνεται να μην υπάρχουν συμπληρωματικές περιοχές προς αποφυγή σχηματισμού hairpins.
- Θα πρέπει να αποφεύγονται αλληλουχίες οι οποίες περιέχουν περισσότερες από τέσσερις ίδιες βάσεις στη σειρά π.χ. AAAAAA.
- Η αλληλουχία η οποία θα πληροί τα άνωθεν χαρακτηριστικά θα πρέπει να υπόκειται και σε υπολογιστική ανάλυση. Θα πρέπει να γίνει σύγκριση της αλληλουχίας της με την αλληλουχία της περιοχής του γονιδιώματος από το οποίο προέρχεται καθώς και με την αντίστροφη συμπληρωματική αλληλουχία της περιοχής. Στην περίπτωση που ανιχνευτεί ομολογία σε κάποια περιοχή η οποία να

ξεπερνά το 70% ή περισσότερες των οκτώ βάσεων στη σειρά, τότε η αλληλουχία αυτή δε πρέπει να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή του ανιχνευτή.

Τα κριτήρια αυτά χρησιμοποιούνται και για τον σχεδιασμό του ζεύγους εκκινητών (forward & reverse) για την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου γονιδίου ενδιαφέροντος το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός ανιχνευτή-γονιδίου. Φυσικά είναι σημαντικό τα 3' άκρα των εκκινητών αυτών να μην έχουν ομολογία με το DNA σε άλλα σημεία πέραν των επιθυμητών, τα οποία πλαισιώνουν το γονίδιο ενδιαφέροντος (de Muro et al., 2002).

1.14 Το 5S rRNA ως ανιχνευτής

Το γονίδιο 5S rRNA συναντάται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς και κατά κύριο λόγο συναντάται σε επαναλήψεις τοποθετημένες σε σειρά (Campell et al., 1992, Cox et al., 1992, Szymanski et al., 2016, Locati et al., 2017). Οι επαναλαμβανόμενες σε σειρά μονάδες του 5S rRNA, αποτελούνται από μία κωδική αλληλουχία 120bp κατά μέσο όρο και μία μη κωδική αλληλουχία ποικίλου μεγέθους. Ο κύριος όγκος αυτών των επαναλήψεων του 5S rRNA εντοπίζεται σε ένα μικρό αριθμό τόπων κάποιων χρωμοσωμάτων του εκάστοτε οργανισμού. Αξιοσημείωτο είναι ότι την ίδια στιγμή που τα γονίδια παρουσιάζουν μεγάλο βαθμό συντήρησης της κωδικής τους αλληλουχίας, η μη μεταγραφόμενη αλληλουχία διαφέρει πολύ μεταξύ των οργανισμών γεγονός που οφείλεται κατά πάσα πιθανότητα στο ότι δεν υπόκειται στην ίδια υψηλή πίεση επιλογής (Cox et al., 1992, Cloix et al., 2001).

Τα 5S rRNA γονίδια σε πολλά είδη είναι παρόντα σε μεγάλο αριθμό αντιγράφων. Κάποια από αυτά τα καταγεγραμμένα είδη ανήκουν στο φυτικό βασίλειο. Στο είδος *Arabidopsis thaliana* έχουν βρεθεί περίπου 1.000 αντίγραφα του γονιδίου ανά απλοειδές γονιδίωμα. Τα αντίγραφα αυτά τοποθετούνται στην περικεντρομερική ετεροχρωματίνη στα χρωμοσώματα 3, 4 και 5 του *Arabidopsis thaliana*. Η κωδική αλληλουχία του 5S rRNA σε αυτό το φυτικό είδος έχει μέγεθος 121bp και ακολουθείται από μία μη μεταγραφόμενη περιοχή περίπου 380bp (Cloix et al., 2001). Η κωδική αλληλουχία του γονιδίου παρουσιάζει, σύμφωνα με τους Campell et al. (1992), υψηλό βαθμό ομολογίας με την κωδική αλληλουχία του 5S rRNA άλλων αγγειόσπερμων. Τα γονίδια αυτά είναι μεθυλιωμένα σε ποσοστό περίπου 79%, το οποίο είναι σχετικά υψηλό σε σχέση με τα χαμηλά επίπεδα μεθυλίωσης του γονιδιώματος της *Arabidopsis thaliana* τα οποία κυμαίνονται γύρω στο 6,3%. Παρόλα τα υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης,

τα γονίδια αυτά είναι ενεργά χωρίς να επηρεάζεται η μεταγραφή τους από την RNA πολυμεράση III (Mathieu et al., 2002).

Η ακολουθία του 5S rRNA χρησιμοποιείται ως δείκτης μεθυλίωσης του γονιδιώματος της *Arabidopsis thaliana* (Μαργαριτοπούλου, 2012) καθώς και για άλλους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Gerlach & Dyer, 1980). Μπορεί να αξιοποιηθεί με αυτό τον τρόπο γιατί υπάρχει σε πολλαπλές επαναλήψεις εντός των γονιδιωμάτων και είναι πλούσια η αλληλουχία του σε CG (κυτοσίνη-γουανίνη). Επιπλέον, η ακολουθία αυτή είναι μεθυλιωμένη υπό φυσιολογικές συνθήκες ενώ σε τροποποιημένα γονιδιώματα της *Arabidopsis thaliana* παρατηρείται αλλαγή του προτύπου μεθυλίωσης αυτών. Το 5S rRNA έχει βρεθεί ότι είναι μεθυλιωμένο σε αρκετά φυτικά είδη όπως στον αραβόσιτο, το φασόλι και το λινάρι (Mathieu et al., 2002).

Η 5SrRNadb είναι μία βάση δεδομένων αφιερωμένη στις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των 5S ριβοσωμικών RNAs και των γονιδίων τους για τα βακτήρια, τα αρχαία και τους ευκαρυώτες. Οι πληροφορίες της συγκεκριμένης βάσης δεδομένων, έχουν συλλεχθεί από πολλές μελέτες και έρευνες και κυρίως τα βιοπληροφορικά στοιχεία αυτών. Η συλλογή των πληροφοριών δεν ήταν εύκολη καθώς οι επαναλαμβανόμενες ακολουθίες των γονιδιωμάτων αργούν να αλληλουχηθούν. Οι νέες τεχνολογίες έχουν ατέλειες όταν πρόκειται για την ανάλυση αλληλουχιών με μεγάλο βαθμό επαναλήψεων. Ακόμα και όταν γίνεται αυτή η αλληλούχιση των επαναλαμβανόμενων ακολουθιών, υπάρχουν αμφιβολίες σχετικά με την ακεραιότητα των λειτουργικών μονάδων επανάλυσης rDNA ή αν άλλες ακολουθίες έχουν ενσωματωθεί σε αυτές (Locati et al., 2017). Παρόλα αυτά το 5S rRNA διαθέτει όλα τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο σε ερευνητικό επίπεδο όπως το ότι είναι μικρό σε μέγεθος, βρίσκεται σε περίσσεια στα γονιδιώματα και είναι και εξελικτικά συντηρημένο (Szymanski et al., 2016).

Η βάση δεδομένων 5SrRNadb στο είδος *Olea europaea* με συνώνυμη ονομασία *Olea sativa* την οποία και χαρακτηρίζει ως common olive, παρουσιάζει μία αλληλουχία 123bp. Αυτή η βάση δεδομένων λειτουργεί εδώ και 13 χρόνια και η μεγαλύτερη αναβάθμιση στις πληροφορίες της και συμπλήρωση αυτών έγινε τα τελευταία σχετικά έτη (μετά το 2016). Την αλληλουχία του 5S rRNA η βάση δεδομένων την κατατάσσει στα πλαστίδια. Η βάση δεδομένων NCBI έχει καταχωρημένο το assembly του γονιδιώματος της *Olea europaea* var. *sylvestris* (2017),

δηλαδή της αγριελιάς. Στα πλαίσια της αλληλούχησης του γονιδιώματος έχει εντοπιστεί στα πλαστίδια το γονίδιο 5S rRNA του οποία η αλληλουχία έχει μέγεθος 121bp. Οι αλληλουχίες των δύο βάσεων ελέγχθηκαν ως προς την αλληλουχία τους η οποία προέκυψε ότι ήταν ίδια εκτός των δύο επιπλέον νουκλεοτιδίων που έχει η μεγαλύτερου μεγέθους αλληλουχία (123bp). Μετά από διερεύνηση της αλληλουχίας των 123bp στο γονιδίωμα της αγριελιάς, προέκυψε ότι τα δύο επιπλέον νουκλεοτίδια είναι παρόντα στο γονιδίωμά της. Στην 5SrRNAdb δεν διατίθενται κάποιες πληροφορίες, οπότε δεν ήταν δυνατό να εντοπιστεί η προέλευση της αλληλουχίας του 5S rRNA της ελιάς για να εξεταστεί και περαιτέρω η ομοιότητα των γονιδιωμάτων της “κοινής ελιάς” και της αγριελιάς.

1.15 TEMPRANILLO και anthocyanidin synthase

Το γονίδιο TEMPRANILLO χαρακτηρίζεται ως καταστολέας της άνθισης του Flowering Locus T στην αραβιδόψη. Σύμφωνα με τους Sgamma et al. (2014), όταν η έκφραση του TEMPRANILLO είναι μειωμένη, τότε η αραβιδόψη έχει συντομότερη νεανική βλαστική φάση. Η έκφραση του ορθόλογου γονιδίου του στην ελιά ανιχνεύθηκε σε υψηλότερα επίπεδα κατά την νεανική (βλαστική) της φάση. Το TEMPRANILLO ρυθμίζεται αρνητικά από τα APETALA1 (AP1) και GIGANTEA (GI). Το μέγεθος του γονιδίου ανέρχεται στις 1074bp. Μέρος του γονιδίου που δρα ως περιοχή δέσμευσης DNA εντοπίστηκε σε μεταγραφήματα ρυθμιστών στα φυτά όπως το APETALA2 και το EREBP (ethylene responsive element binding protein). Στο EREBPs η περιοχή αυτή δεσμεύεται στο 11bp GCC box του ethylene response element (ERE), ένας προαγωγέας απαραίτητος για την αντίδραση του αιθυλενίου. Το EREBPs και το CBF1, ένας C-επαναλαμβανόμενος παράγοντας δέσμευσης ο οποίος εμπλέκεται στην απόκριση σε καταπόνηση, περιέχουν μόνο ένα αντίγραφο της AP2 περιοχής. Οι APETALA2-like πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των φυτών και περιέχουν δύο αντίγραφα. Ακόμη, τμήμα του γονιδίου περιέχει περιοχές που σχετίζονται με την υπεροικογένεια B3 στην οποία περιλαμβάνονται ο ARF (auxin response factor) και οι LAV (Leafy cotyledon2 (LEC2), Absciscic acid insensitive3 (ABI3), VAL) οικογένειες όπως και οι RAV (που σχετίζονται με τις ABI3 και VP1) οικογένειες και οι REM (REproductive Meristem) οικογένειες (Sgamma et al., 2014).

Το γονίδιο anthocyanidin synthase εκφράζεται στο περικάρπιο των καρπών της ελιάς (Ferrante et al., 2004) και έχει μέγεθος 789bp (partial cds). Σε πράσινους καρπούς

ελιάς η έκφρασή του είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα ενώ τα υψηλότερα επίπεδά της συναντώνται κατά την πλήρη ωρίμανση του καρπού κατά την οποία τόσο το εξωκάρπιο όσο και το μεσοκάρπιο είναι μωβ. Ενώ η πορεία της έκφρασης της anthocyanidin synthase κορυφώνεται όσο προοδεύει η ωρίμανση του ελαιόκαρπου, το γονίδιο της δεν εκφράζεται καθόλου σε φύλλα ελιάς (Ferrante et al., 2004).

1.16 Σκοπός του πειράματος

Σκοπός του πειράματος υπήρξε αρχικά η διερεύνηση της μεθυλίωσης του γονιδίου TEMPRANILLO (TEM) στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια της ελιάς (ποικιλία Κορωνέικη) και σε διαφορετικούς ιστούς της. Επίσης, υπό διερεύνηση για τη μεθυλίωσή του θα υπόκειντο και το γονίδιο anthocyanidin synthase του οποίου η έκφραση εντοπίζεται στους καρπούς της ελιάς.

Η πειραματική πορεία που είχε σχεδιαστεί για την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη περιελάμβανε την μεταχείριση των δειγμάτων με sodium bisulfite. Αυτή η πειραματική πορεία δεν χρησιμοποιήθηκε γιατί τα δείγματα κατά την απομόνωση δεν έδιναν υψηλές συγκεντρώσεις DNA. Επιπλέον, επειδή η ακολουθία του γονιδίου είναι μεγάλη έπρεπε να δημιουργηθούν και να χρησιμοποιηθούν εκφυλισμένοι εκκινητές.

Τελικά για τη διερεύνηση της μεθυλίωσης της ελιάς στα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια και σε διαφορετικούς ιστούς της επιλέχθηκε ως ανιχνευτής η κωδική περιοχή του 5S rRNA μαζί με τμήμα της μη μεταγραφόμενης περιοχής του. Πρόκειται για ένα γονίδιο που έχει χρησιμοποιηθεί σε διάφορα φυτικά για την διερεύνηση των επιπέδων μεθυλίωσης (Gerlach & Dyer, 1980, Flavell, 1980, Mathieu et al., 2002, Μαργαριτοπούλου, 2012). Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν είναι το MspI, το HpaII και το ClaI. Η διερεύνηση της μεθυλίωσης βασίστηκε στη μέθοδο ανάλυσης κατά Southern.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Φυτικό υλικό

Το φυτικό υλικό από το οποίο απομονώθηκε το DNA προήλθε από την συλλογή ελαιόδενδρων του Δενδροκομείου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συλλέχθηκαν συνολικά είκοσι τρία (23) δείγματα τα οποία ανήκουν στην ποικιλία Κορωνέικη εκ των οποίων αξιοποιήθηκαν, λόγω μη επαρκούς ποσότητας ιστού, μόνο τα δεκαοκτώ (18). Τα δείγματα συλλέχθηκαν ανά τακτά χρονικά διαστήματα, όπως φαίνεται και στον **Πίνακα 2.1**. Η δειγματοληψία έγινε σε τρία διαφορετικά σημεία της κόμης του δένδρου από όπου και συλλέχθηκαν υγιή, αντιπροσωπευτικά δείγματα κλειστών οφθαλμών, νεαρών φύλλων, κλειστών ανθέων, ανθέων, καρπιδίων, πράσινων καρπών, καρπών στους οποίους έχει αρχίσει να αλλάζει το χρώμα του φλοιού και ώριμων καρπών. Μετά τη συλλογή τους, τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Δενδροκομίας του ΓΠΑ όπου και καταψύχθηκαν στους -20°C. Με το πέρας της συλλογής των δειγμάτων, όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν με ιδιαίτερη προσοχή στους -80°C στις εγκαταστάσεις του τμήματος Βιοτεχνολογίας. Ακολούθησε λειοτρίβηση των δειγμάτων σε υγρό άζωτο και αποθήκευσή τους σε falkon tubes στους -80°C.



Εικόνα 2.1: Διάφορα στάδια ανάπτυξης της ελιάς.

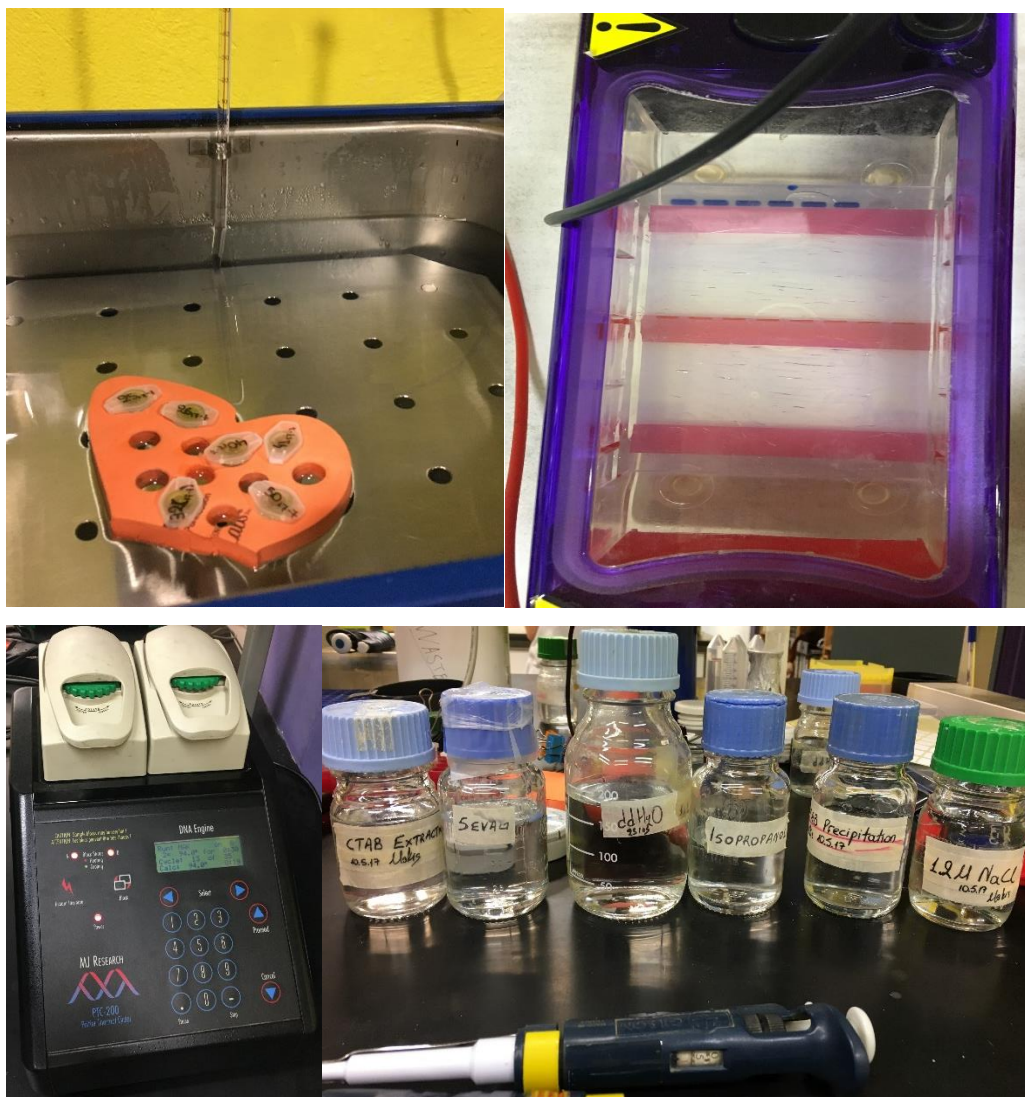
Πίνακας 2.1: Ημερομηνία δειγματοληψίας, ιστός και αριθμός δένδρου της συλλογής του Δενδροκομείου του ΓΠΑ.

Ημερομηνία δειγματοληψίας	Ιστός	Αριθμός δένδρου συλλογής ΓΠΑ
24/3/2017	Κλειστός οφθαλμός-Φουσκωμένος	25/20 Κορωνέικη
24/3/2017	Κλειστός οφθαλμός-Φουσκωμένος	56/20 Κορωνέικη
30/3/2017	Νεαρά Φύλλα	25/20 Κορωνέικη
30/3/2017	Κλειστός οφθαλμός-Φουσκωμένος	56/20 Κορωνέικη
30/3/2017	Κλειστός οφθαλμός-Φουσκωμένος	25/20 Κορωνέικη
5/4/2017	Νεαρά Φύλλα	25/20 Κορωνέικη
5/4/2017	Ανθοταξία (κλειστά άνθη)	25/20 Κορωνέικη
5/4/2017	Νεαρά Φύλλα	56/20 Κορωνέικη
5/4/2017	Ανθοταξία (κλειστά άνθη)	56/20 Κορωνέικη
24/4/2017	Νεαρά Φύλλα	25/20 Κορωνέικη
24/4/2017	Ανθοταξία (κλειστά άνθη)	25/20 Κορωνέικη
24/4/2017	Ανθοταξία (κλειστά άνθη)	56/20 Κορωνέικη
8/5/2017	Ανθοταξία (κλειστά άνθη)	25/20 Κορωνέικη
8/5/2017	Άνθη	56/20 Κορωνέικη
8/5/2017	Νεαρά Φύλλα	56/20 Κορωνέικη
23/5/2017	Καρπίδια(αμέσως μετά την καρπόδεση)	25/20 Κορωνέικη
23/5/2017	Νεαρά Φύλλα	25/20 Κορωνέικη
23/5/2017	Καρπίδια	56/20 Κορωνέικη
6/9/2017	Πράσινοι Καρποί	25/20 Κορωνέικη
6/9/2017	Πράσινοι Καρποί	56/20 Κορωνέικη
2/10/2017	Καρποί (έναρξη αλλαγής χρώματος)	25/20 Κορωνέικη
2/10/2017	Καρποί (έναρξη αλλαγής χρώματος)	56/20 Κορωνέικη
2/10/2017	Ώριμοι Καρποί	56/20 Κορωνέικη

2.2 Συσκευές

- Φυγόκεντρος
- Απαγωγός εστία
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή στροβιλίσματος (Vortex)
- Ζυγαριά ακριβείας

- pH meter
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης
- Τροφοδοτικό ρεύματος
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας σε κουβούκλιο με προσαρμοσμένη φωτογραφική μηχανή και ηλεκτρονικό υπολογιστή
- Θερμοκυκλοποιητής MJ Research PT200



2.3 Απομόνωση DNA

Οι φυτικοί ιστοί περιέχουν εκτός από DNA, διάφορες προσμίξεις (RNA, χρωστικές, πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες κ.ά.) οι οποίες πρέπει να απομακρυνθούν ώστε να απομονωθεί καθαρό DNA. Οι πολυσακχαρίτες και οι ταννίνες αποτελούν ένα κύριο πρόβλημα στα φυτά καθώς είναι δύσκολο γενικά να διαχωρισθούν από το DNA. Στο

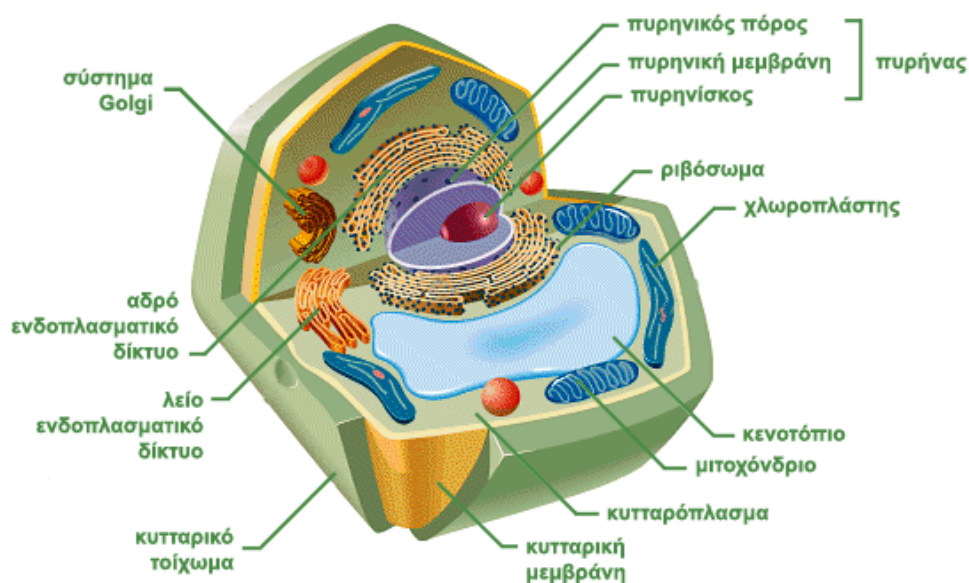
πείραμα της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης, η απομόνωση έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο CTAB με κάποιες τροποποιήσεις έτσι ώστε να έχουμε την απαραίτητη ποσότητα και καθαρότητα DNA. Πρόκειται για μία μέθοδο απομόνωσης φυτικού DNA υψηλού μοριακού βάρους (>50.000 bp σε μήκος) το οποίο δεν περιέχει μολυσματικούς παράγοντες (Murray et al., 1980).

2.4 Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA

- Το υδατόλουτρο ενεργοποιείται και ρυθμίζεται ώστε να φτάσει τους 65°C.
- Τα στοιχεία των δειγμάτων αναγράφονται σε eppendrof σωλήνες.
- Μεταφέρεται όγκος 100μl λειοτριβημένου ιστού στα αντίστοιχα eppendrof.
- Ακολουθεί προσθήκη 500μl CTAB Extraction Buffer και ανάδευση σε vortex για ομογενοποίηση των δειγμάτων.
- Τα δείγματα μεταφέρονται στο υδατόλουτρο, όπου παραμένουν για 30min σε θερμοκρασία 65°C. Κάθε 10min γίνεται έντονη ανάδυσή τους.
- Με το πέρας των 30min το υδατόλουτρο κλείνει και τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 10min στις 13.000rpm.
- Το υπερκείμενο διάλυμα του εκάστοτε δείγματος μεταφέρεται σε ένα καινούργιο eppendrof το οποίο φέρει τα στοιχεία του.
- Προστίθεται ίσος όγκος SEVAG (24:1 χλωροφόρμιο: ισοαμυλική αλκοόλη) με τον όγκο του υπερκείμενου διαλύματος που αποσπάται από κάθε δείγμα.
- Ακολουθεί έντονη ανάδευση με το χέρι για 30sec και φυγοκέντρωση στις 13.000rpm για 10min.
- Η άνω (υδάτινη) φάση μεταφέρεται σε νέο eppendrof και καταγράφεται η ποσότητά της.
- Προστίθεται 3,5 φορές ο όγκος της υδάτινης φάσης η οποία συλλέχθηκε σε CTAB Precipitation Solution και γίνεται ανάδευση με το χέρι για περίπου 30sec.
- Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1h.
- Με το πέρας της μίας ώρας τα δείγματα φυγοκεντρούνται για 5min στις 13.000rpm.
- Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται.
- Προστίθενται 350μl NaCl 1.2M και γίνεται έντονη ανακίνηση των eppendrof.
- Προστίθενται 350μl SEVAG.

- Ακολουθεί ανάδευση για 30sec και φυγοκέντρωση για 10min στις 13.000rpm.
- Μεταφέρεται η άνω φάση των δειγμάτων σε νέα eppendorf και προστίθεται ίσος όγκος ισοπροπανόλης.
- Γίνεται ανάδευση του μίγματος και φυγοκέντρωση για 10min στις 13.000rpm.
- Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται και προστίθενται 500μl αιθανόλης (70%).
- Ακολουθεί ανάδευση για 30sec και φυγοκέντρωση για 10min στις 13.000rpm.
- Το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται με ιδιαίτερη προσοχή και τα eppendorf παραμένουν ανοιχτά.
- Τα eppendorf τοποθετούνται με ανοιχτά τα καπάκια τους σε ενεργοποιημένη απαγωγό εστία για 5min. Με αυτόν τον τρόπο απομακρύνονται τα υπολείμματα αιθανόλης από τα σφαιρίδια τα οποία έχουν σχηματιστεί.
- Προστίθενται 50μl ddH₂O και ακολουθεί ελαφρά ανάδευση.
- Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -20°C.

Στα φυτά, όπως είναι γνωστό ο πυρήνας προστατεύεται από την πυρηνική μεμβράνη η οποία με τη σειρά της περικλείεται από την κυτταρική μεμβράνη και το κυτταρικό τοίχωμα. Εξαιτίας αυτού του υψηλού ποσοστού προστασίας του πυρήνα, απαιτούνται τέσσερα βήματα για τον διαχωρισμό του καθαρού DNA από το υπόλοιπο κύτταρο. Αυτά τα βήματα είναι η λύση, η κατακρήμνιση, η έκπλυση και η επαναιώρηση.



Εικόνα 2.2:Ευκαρυωτικό κύτταρο.

Η λύση στα φυτά γίνεται ουσιαστικά σε δύο στάδια. Αρχικά με την λειοτριβήση σε υγρό άζωτο και στη συνέχεια με την προσθήκη απορρυπαντικών στοιχείων. Η λειοτριβήση με υγρό άζωτο οδηγεί στο σπάσιμο των κυτταρικών τοιχωμάτων εξαιτίας της μηχανικής δύναμης που ασκείται.



Εικόνα 2.3:Λειοτριβήση δείγματος.

Σε δεύτερη φάση, η προσθήκη του απορρυπαντικού στοιχείου οδηγεί στη λύση των κυτταρικών μεμβρανών. Τα απορρυπαντικά στοιχεία έχουν την δυνατότητα να διαταράσσουν τις μεμβράνες εξαιτίας της αμφιπαθικής τους φύσης (έχουν περιοχές που είναι υδρόφιλες όπως και περιοχές που είναι υδρόφοβες). Με το πέρας της λύσης, τα περιεχόμενα των φυτικών κυττάρων βρίσκονται πλέον σε ένα διάλυμα. Στην περίπτωση του συγκεκριμένου πειράματος, το απορρυπαντικό στοιχείο που χρησιμοποιήθηκε είναι το CTAB Extraction Buffer, το οποίο ταυτόχρονα προσφέρει και προστασία στα νουκλεϊκά οξέα από τα διάφορα ένζυμα και τις λοιπές κυτταρικές ουσίες. Η αναλογία του ιστού με το ρυθμιστικό διάλυμα ποικίλει πάντα ανάλογα το φυτικό είδος και το είδος του ιστού. Σε όλες τις περιπτώσεις όμως, το Extraction Buffer πρέπει να είναι αρκετό ώστε να γίνει διασκορπισμός των συσσωματωμάτων χωρίς το διάλυμα να χάσει τελείως το ιξώδες του (Murray et al., 1980).

Το επόμενο στάδιο είναι η κατακρήμνιση. Στην πραγματικότητα, πρόκειται για μία σειρά βημάτων κατά τα οποία το DNA διαχωρίζεται από τα υπόλοιπα κυτταρικά συστατικά. Αρχικά, το πρώτο στοιχείο που χρησιμοποιείται είναι το SEVAG το οποίο

απαρτίζεται από χλωροφόρμιο και ισοαμυλική αλκοόλη σε αναλογία 24:1 (v/v). Το χλωροφόρμιο έχει τη δυνατότητα να μετουσιώνει τις πρωτεΐνες την στιγμή που η παρουσία της ισοαμυλικής αλκοόλης εξασφαλίζει ότι το διάλυμά μας δεν θα αφρίσει. Στο επόμενο βήμα, προστίθενται άλατα στο διάλυμά με στόχο την διαταραχή των δεσμών υδρογόνου που σχηματίζονται μεταξύ του νερού και των μορίων DNA. Σε αυτό το στάδιο συγκαταλέγεται η προσθήκη του CTAB Precipitation Solution, το NaCl όπως και το SEVAG. Φυσικά, τα διαλύματα αυτά έχουν και άλλες επιμέρους δράσεις π.χ. το CTAB Precipitation Solution ταυτόχρονα φροντίζει για την καθίζηση των νουκλεϊκών οξέων. Στη συνέχεια, η μεταχείριση με ισοπροπανόλη συμβάλλει τόσο στον σχηματισμό των σφαιριδίων DNA όσο και στην καθίζησή τους.

Η έκπλυση γίνεται με την προσθήκη αιθανόλης (70%) η οποία έχει την ικανότητα να απομακρύνει τα άλατα καθώς και άλλα διαλυτά στοιχεία τα οποία θεωρούνται “ακαθαρσίες” για το DNA. Στη συνέχεια, λαμβάνει χώρα η επαναιώρηση του DNA. Η επαναιώρηση επιτυγχάνεται με τη προσθήκη ddH₂O ακολουθούμενη από ανάδευση για την ομογενοποίηση του DNA με το ddH₂O σε ένα τελικό διάλυμα.

2.5 Ένωση δειγμάτων

Οι απομονώσεις των δειγμάτων δεν έδιναν επαρκή ποσότητα DNA για την μετέπειτα επιθυμητή μεταχείρισή τους. Για το λόγο αυτό αποφασίστηκε να πραγματοποιηθούν πολλαπλές απομονώσεις του κάθε δείγματος οι οποίες στο τέλος θα συμπυκνώνονταν σε ένα ενιαίο διάλυμα. Η καθίζηση με τη χρήση αιθανόλης είναι αρκετά συνήθης διαδικασία για την συμπύκνωση δειγμάτων.

Η βασική αρχή της μεθόδου αυτής, περιλαμβάνει την προσθήκη αιθανόλης και άλατος στο υδατικό διάλυμα. Τα δύο αυτά συστατικά οδηγούν στην καθίζηση των νουκλεϊκών οξέων των διαλυμάτων. Μετά την καθίζηση, τα νουκλεϊκά οξέα μπορούν να διαχωρισθούν από το υπόλοιπο διάλυμα με μία απλή φυγοκέντρωση.

Η χρήση του άλατος σε αυτό το πρωτόκολλο στοχεύει στην εξουδετέρωση των φορτίων του φωσφορικού σκελετού των σακχάρων. Το πιο σύνηθες άλας το οποίο χρησιμοποιείται για τη διαδικασία αυτή είναι το οξικό νάτριο (sodium acetate, CH₃COONa). Σε διάλυμα, το οξικό νάτριο διασπάται σε Na⁺ και [CH₃COO]⁻. Τα θετικά φορτισμένα ιόντα νατρίου εξουδετερώνουν το αρνητικό φορτίο των PO³⁻ ομάδων των νουκλεϊκών οξέων, καθιστώντας έτσι τα μόρια λιγότερο υδρόφιλα και επομένως λιγότερο διαλυτά στο νερό.

Η ηλεκτροστατική έλξη μεταξύ των ιόντων Na^+ στο διάλυμα με τα ιόντα PO_4^{3-} , υπαγορεύεται από το νόμο του Coulomb, ο οποίος επηρεάζεται από τη διηλεκτρική σταθερά του διαλύματος. Το νερό έχει υψηλή διηλεκτρική σταθερά, γεγονός που καθιστά αρκετά δύσκολο για τα Na^+ και τα PO_4^{3-} να ενωθούν. Από την άλλη πλευρά, η αιθανόλη έχει αρκετά χαμηλότερη διηλεκτρική σταθερά καθιστώντας πολύ πιο εύκολη την αλληλεπίδραση των ιόντων Na^+ και PO_4^{3-} . Επιπλέον, η αιθανόλη προστατεύει το φορτίο του διαλύματος και καθιστά τα νουκλεϊκά οξέα λιγότερα υδρόφιλα οδηγώντας έτσι στην απομάκρυνσή τους από το διάλυμα (Crouse et al., 1987).

2.6 Συγκέντρωση των δειγμάτων

Την ένωση των δειγμάτων διαδέχθηκε η μέτρηση της συγκέντρωσης και της καθαρότητας των δειγμάτων. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε το nanodrop του εργαστηρίου Βιοχημείας το οποίο είναι συνδεδεμένο με υπολογιστή και λειτουργεί βάσει της εφαρμογής ND-1000 v3.3.1.

Το όργανο ρυθμίζεται για μέτρηση νουκλεϊκών οξέων τύπου DNA. Γίνεται μηδενισμός του nanodrop με προσθήκη 1μl ddH₂O και στη συνέχεια αρχίζει η μέτρηση των δειγμάτων και η αυτόματη καταγραφή των αποτελεσμάτων στον υπολογιστή. Για κάθε δείγμα το πρόγραμμα του υπολογιστή κάνει καταγραφή των στοιχείων του. Ακολουθεί η προσθήκη 1μl στην ειδική υποδοχή του οργάνου και δίνεται εντολή για την πραγματοποίηση της μέτρησης. Με το πέρας της μέτρησης, η υποδοχή του οργάνου καθαρίζεται και ακολουθεί προσθήκη νέου δείγματος. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων αυτών εμφανίζονται στον ακόλουθο πίνακα όπου η απορρόφηση A_{260}/A_{280} δίνει ενδεικτικές τιμές για την καθαρότητα των δειγμάτων και η A_{260} για την συγκέντρωσή τους.

Πίνακας 2.2: Αριθμός δείγματος, ng/μl, A_{260}/A_{280} και A_{260} .

Αριθμός δείγματος	ng/μl	A_{260}/A_{280}	A_{260}
10	883.13	2.12	17.663
22	1936.68	2.12	38.734
23	752.12	2.15	15.042
25	271.79	2.11	5.432
26	550.96	2.05	11.019
29	1893.12	2.18	37.862
30	975.62	2.13	19.512
32	470.79	2.10	9.416
40	42.84	2.02	0.857
41	262.52	2.10	5.250
47	1306.85	2.14	26.134
48	974.34	2.13	19.487
50	567.16	2.09	11.343
54	2337.23	2.14	46.745
56	747.71	2.12	14.954
60	1200.35	2.15	24.007
62	815.81	2.16	16.316
63	387.33	2.07	7.747

Ο λόγος απορρόφησης A_{260}/A_{280} όπως αναφέρθηκε είναι ενδεικτικός της ποιότητας/καθαρότητας του δείγματος. Οι τιμές μεταξύ 1.8 και 2 για το λόγο αυτό είναι ικανοποιητικές για την καθαρότητα του δείγματος. Ο λόγος της απορρόφησης A_{260}/A_{280} δεν είναι δυνατόν να βοηθήσει στη διάκριση μεταξύ RNA και DNA. Όπως αναφέρθηκε η συγκέντρωση των δειγμάτων υπολογίζεται από την απορρόφηση στα 260nm. Έχει δειχθεί πειραματικά ότι σε καθαρό διάλυμα δίκλωνου DNA αν $A_{260}=1$ τότε η συγκέντρωση ανέρχεται στα 50ng/μl. Βάσει αυτού του στοιχείου είναι δυνατόν σε ένα καθαρό διάλυμα δίκλωνου DNA να εφαρμοστεί ο ακόλουθος κανόνας υπολογισμού συγκέντρωσης του δείγματος: $C(\text{ng}/\mu\text{l}) = A_{260\text{nm}} \cdot 50$.

Αποφασίστηκε να γίνει και ένας οπτικός έλεγχος των δειγμάτων με την χρήση ηλεκτροφορήσεων. Με τις ηλεκτροφορήσεις μπορεί να καταστεί εύκολα διακριτή η

κατάσταση του απομονωμένου DNA. Εάν το DNA δεν είναι κατακερματισμένο δε θα μπορεί να διαχωρισθεί κατά την ηλεκτροφόρησή του σε πηκτή αγαρόζης και θα παρουσιαστεί ως μία ζώνη. Αντίθετα, αν το DNA είναι κατακερματισμένο θα εμφανιστεί ως μία διάχυτη θολή σκίαση (smear). Πέραν της κατάστασης (ποιότητας) του DNA κατά την ηλεκτροφόρηση είναι δυνατόν να γίνει και μέτρηση της ποσότητάς του. Για να είναι αυτό εφικτό πρέπει κατά την φόρτωση των δειγμάτων να γίνει και φόρτωση ladder του οποίου τα στοιχεία είναι γνωστά (μοριακός βάρος ζωνών, μέγεθος κ.λπ.). Όταν τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης οπτικοποιηθούν μπορεί να γίνει ένας προσεγγιστικός υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων βάσει της έντασης των ζωνών των δειγμάτων σε σύγκριση με τις ζώνες του ladder. Ο προσεγγιστικός αυτός υπολογισμός έγινε και έδωσε ελαφρώς μειωμένες τιμές ng/μl σε σχέση με αυτές του πίνακα. Αυτό ήταν αναμενόμενο καθώς αυτή η μέτρηση δεν περιελάμβανε το RNA.

Οι δύο μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν παρείχαν πληροφορίες τόσο για την ποιότητα όσο και για την ποσότητα του DNA των δειγμάτων. Παρόλα αυτά, αδυνατούν να ανιχνεύσουν τυχόν αναστολές (π.χ. υπολείμματα αιθανόλης ή αλάτων) οι οποίοι μπορεί να υπάρχουν στο δείγμα και να δρουν παρεμποδιστικά σε μία αντίδραση πέψης ή μία αντίδραση PCR.

2.7 Ενίσχυση TEMPRANILLO και anthocyanidin synthase

Για την ενίσχυση του TEMPRANILLO σχεδιάστηκε ζεύγος εκκινητών το οποίο πληρούσε τις κατάλληλες προϋποθέσεις και το οποίο ενίσχυε το μεγαλύτερο τμήμα αυτού (899bp από τις 1074bp).

Ονομασία εκκινητών	Νουκλεοτιδική αλληλουχία με 5'→3' κατεύθυνση
OTEM1F	CTATGGCACCAATCTCCGCC
OTEM1R	TACCATCGGAATAGGCTGGG

Για την ενίσχυση της anthocyanidin synthase σχεδιάστηκε ζεύγος εκκινητών το οποίο πληρούσε τις κατάλληλες προϋποθέσεις και το οποίο ενίσχυε το μεγαλύτερο τμήμα του γονιδίου (736bp από τις 789bp).

Ονομασία εκκινητών	Νουκλεοτιδική αλληλουχία με 5'→3' κατεύθυνση
AS1F	GTGGTCAACTTGAGTGGCAG
AS1R	CCCATTCACCATGCATTTAGG

Τα δύο αυτά γονίδια επιλέχθηκαν εξαιτίας της διαφορεικής έκφρασής τους κατά τα επιμέρους στάδια της άνθισης και της ωρίμανσης του καρπού αντίστοιχα αλλά και εξαιτίας της σημασίας τους στα επιμέρους αναπτυξιακά στάδια της ελιάς.

2.8 Sodium bisulfite

Η επεξεργασία του DNA για τη μετατροπή με sodium bisulfite έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του EpiTect Bisulfite Handbook, Sodium Bisulfite Conversion of Unmethylated Cytosines in DNA.

- Τοποθέτηση του DNA σε πάγο.
- Διάλυση του κατάλληλου αριθμού aliquots του Bisulfite Mix με την προσθήκη 800μl RNase-free νερό σε κάθε aliquot.
- Vortex μέχρι το Bisulfite Mix να είναι πλήρως διαλυμένο (αν είναι απαραίτητο, θερμαίνεται το διάλυμα Bisulfite Mix-RNase-free νερό στους 60°C και ακολουθεί διεξοδικό vortex).
- Το διαλυμένο Bisulfite Mix δε τοποθετείται στο πάγο.
- Προετοιμασία των αντιδράσεων bisulfite σε 200μl PCR tubes σύμφωνα με τον **Πίνακα 2.3**.
- Προσθήκη κάθε συστατικού με την σειρά που αναφέρονται.
- Ο συνδυασμός των όγκων του διαλύματος DNA και του RNase-free νερού πρέπει να έχει τελικό όγκο 20μl.

Πίνακας 2.3: Bisulfite reaction components

Component	Volume per reaction (μl)
DNA solution (1ng-2μg)	Variable (maximum 20μl) *
RNase-free water	Variable *
Bisulfite Mix (dissolved)	85
DNA Protect Buffer	35
Total Volume	140

- Κλείσιμο των PCR tubes και ανάδευση των αντιδράσεων bisulfite διεξοδικά.
- Αποθήκευση των tubes σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C).

- Το DNA Protect Buffer πρέπει να γίνει από πράσινο μπλε μετά την προσθήκη του στο DNA- Bisulfite Mix, υποδεικνύοντας την επαρκή ανάμειξη και το σωστό pH για την αντίδραση μετατροπής bisulfite.
- Διεξαγωγή της μετατροπής του DNA με bisulfite με τη χρήση θερμοκυκλοποιητή.
- Προγραμματισμός του θερμοκυκλοποιητή σύμφωνα με το **Πίνακα 2.4** (ο πλήρης κύκλος παίρνει περίπου 5 ώρες).

Πίνακας 2.4: Bisulfite conversion thermal cyclers conditions

Step	Time	Temperature
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	25 min	60°C
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	85 min (1 h 25 min)	60°C
Denaturation	5 min	95°C
Incubation	175 min (2 h 55 min)	60°C
Hold	Indefinite *	20°C

*το DNA που έχει μετατραπεί μπορεί να μείνει όλη τη νύχτα στο θερμοκυκλοποιητή χωρίς να χάσει την απόδοσή του.

- Τοποθέτηση των PCR tubes που περιέχουν τις αντιδράσεις bisulfite στο θερμοκυκλοποιητή.
- Εκκίνηση της επώασης στο κυκλοποιητή.
- Το πέρας του προγράμματος του θερμοκυκλοποιητή ακολουθεί μία σύντομη φυγοκέντρηση των PCR tubes που περιέχουν τις αντιδράσεις bisulfite.
- Μεταφορά των πλήρων αντιδράσεων bisulfite σε καθαρά tubes 1.5ml για φυγοκέντρηση (η μεταφορά των ιζημάτων στο διάλυμα δε θα επηρεάσει την επίδοση ή την απόδοση της αντίδρασης).
- Προσθήκη 560μl φρέσκου προετοιμασμένου Buffer BL που περιέχει 10μg/ml carrier RNA για κάθε δείγμα. Ανάμειξη των διαλυμάτων με vortex και σύντομη φυγοκέντρηση.

- Τοποθέτηση του κατάλληλου αριθμού στηλών φυγοκέντρησης και tubes συλλογής σε στατό.
- Μεταφορά ολόκληρου του μείγματος από το tube στην αντίστοιχη στήλη.
- Φυγοκέντρηση των στηλών στη μέγιστη ταχύτητα για 1min.
- Απόρριψη του εκρέοντος υγρού και τοποθέτηση των στηλών πίσω στα tubes συλλογής.
- Προσθήκη 500μl Buffer BW σε κάθε στήλη και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min.
- Απόρριψη του εκρέοντος υγρού και τοποθέτηση των στηλών πίσω στα tubes συλλογής.
- Προσθήκη 500μl Buffer BD σε κάθε στήλη και επώαση για 15min σε θερμοκρασία δωματίου (15-25°C) (αν υπάρχουν ιζήματα στο Buffer BD, αποφεύγεται η μεταφορά τους στις στήλες).
- Φυγοκέντρηση των στηλών στη μέγιστη ταχύτητα για 1min.
- Απόρριψη του εκρέοντος υγρού και τοποθέτηση των στηλών πίσω στα tubes συλλογής.
- Προσθήκη 500μl Buffer BW σε κάθε στήλη και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min.
- Απόρριψη του εκρέοντος υγρού και τοποθέτηση των στηλών πίσω στα tubes συλλογής.
- Επανάληψη του τελευταίου βήματος.
- Τοποθέτηση των στηλών σε νέα tubes συλλογής 2ml και φυγοκέντρηση σε μέγιστη ταχύτητα για 1min για την απομάκρυνση τυχόν υγρών υπολειμμάτων.
- Τοποθέτηση των στηλών με ανοιχτά καλύμματα σε καθαρά tubes φυγοκέντρησης 1.5ml και επώαση για 5min στους 56°C σε heating block. (αυτό το βήμα επιτρέπει την εξάτμιση του υπολειπόμενου υγρού).
- Τοποθέτηση των στηλών σε καθαρά tubes φυγοκέντρησης 1.5ml. Διανομή 20μl Buffer EB στο κέντρο κάθε μεμβράνης.
- Έκπλυση του καθαρού DNA με φυγοκέντρηση για 1min στις 15,000g (12.000rpm).
- Επανάληψη του βήματος για αύξηση της απόδοσης του DNA.
- Αποθήκευση έως 24h στους 2-8°C, για περισσότερο των 24h αποθήκευση στους -20°C.

Για την ενίσχυση του γονιδίου TEMPRANILLO χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας δείγμα το οποίο δεν είχε δεχθεί την επίδραση του sodium bisulfite. Το PCR Master Mix το οποίο παρασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε για τα δείγματα που είχαν δεχθεί τη μετατροπή που επιφέρει η χρήση του bisulfite και το δείγμα-μάρτυρα. Όλες οι αντιδράσεις δέχθηκαν τις ίδιες μεταχειρίσεις και συνθήκες ενίσχυσης. Στην τελική ανάλυση των προϊόντων της PCR μόνο ο μάρτυρας έδωσε μία μπάντα η οποία είχε μέγεθος περίπου 900bp.

Πίνακας 2.5: PCR Master Mix

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
DNA	2μl
10x Buffer	5μl
MgCl ₂ (1mM)	2μl
dNTPs (200μM)	1μl
Forward Primer (1μM)	5μl
Reverse Primer (1μM)	5μl
Taq (2,5Units)	0,5μl
ddH ₂ O	29,8μl
Τελικός όγκος	50μl

Πίνακας 2.6: Πρόγραμμα θερμοκυκλοποιητή

Θερμοκρασία	Χρόνος
1. 94°C	2min
2. 94°C	1min
3. 50°C	2min
4. 72°C	3min
5. Go to step 2	x 4 times
6. 94°C	30sec
7. 50°C	2min
8. 72°C	1min & 30sec
9. Go to step 6	x 24 times
10. 72°C	6min
11. 10°C	∞

Οι παραπάνω συνθήκες ενίσχυσης που περιγράφονται στον **Πίνακα 2.5** και στον **Πίνακα 2.6** προήλθαν από έρευνα που διεξήχθη προς μελέτη της μεθυλίωσης στο

φυτό *Arabidopsis thaliana* μετά από επεξεργασία του DNA με sodium bisulfite (Μαργαριτοπούλου, 2012). Αλλαγές στις άνωθεν συνθήκες δεν επέφεραν κάποια αλλαγή στο αποτέλεσμα. Αυτό οδήγησε στην επιλογή τελικά του 5S rRNA ως ανιχνευτή, την πέψη των δειγμάτων με τα ένζυμα ClaI, MspI και HpaII και την χρήση της μεθόδου ανάλυσης κατά Southern.

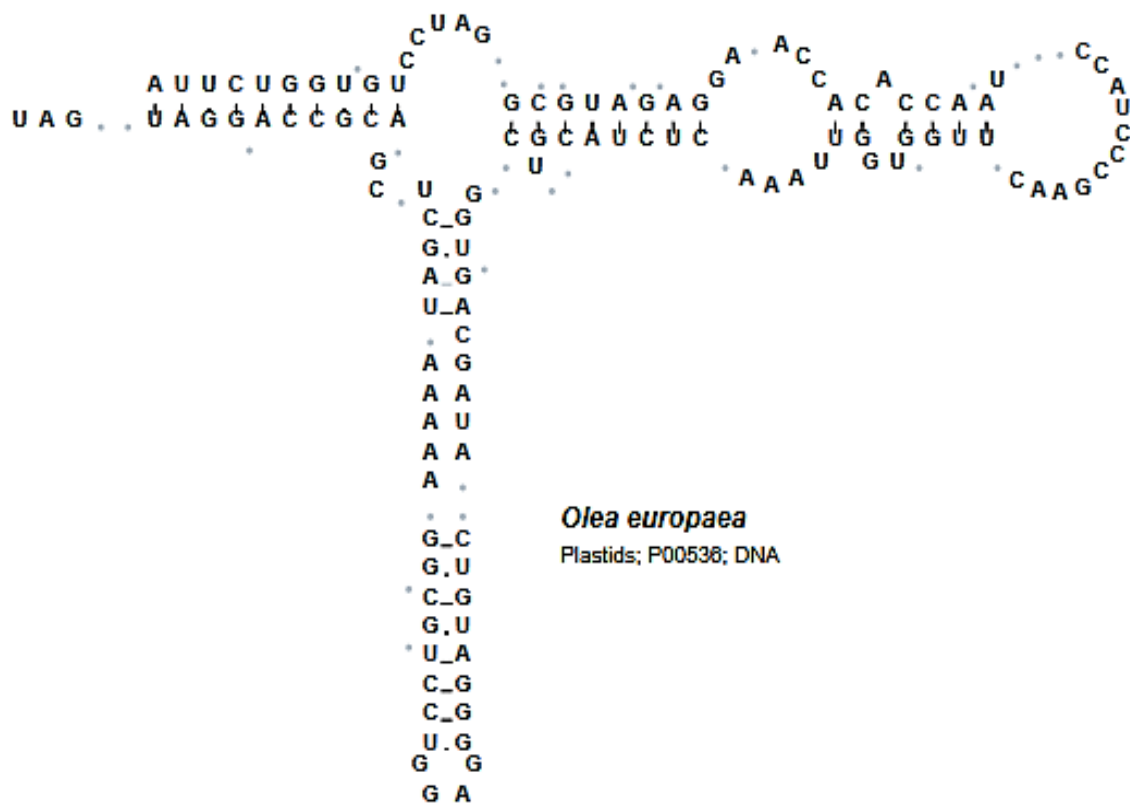
2.9 Ενίσχυση του 5S rRNA ανιχνευτή

Αξιοποιώντας την μέθοδο PCR (Polymerase Chain Reaction), πραγματοποιήθηκε ενίσχυση της κωδικής περιοχής του γονιδίου 5S rRNA, το οποίο στη συνέχεια αξιοποιήθηκε ως ανιχνευτής. Για να πραγματοποιηθεί αυτή η ενίσχυση του ανιχνευτή απαιτείται ένα αρχικό τμήμα DNA, ένα ζεύγος εκκινητών, το PCR Master Mix καθώς και ένα κατάλληλο πρόγραμμα στο θερμοκυκλοποιητή με τις βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου. Για έλεγχο της επιτυχίας της αντίδρασης συνιστάται η προσθήκη μίας ακόμη αντίδρασης PCR η οποία δε περιέχει DNA και λειτουργεί ως αρνητικό δείγμα και ονομάζεται μάρτυρας. Με αυτό τον τρόπο, τρέχοντας τις αντιδράσεις σε πηκτή αγαρόζης εντοπίζεται εύκολα η ύπαρξη πιθανών μολύνσεων των αντιδραστηρίων.

Για να επιτευχθεί η ενίσχυση του 5S rRNA, έγινε δοκιμή των εκκινητών 5S-rDNA/F (GTCCTGCTTCTTTTCGTCGGAG) και 5S-rDNA/R (TTGGGCTATATTACGGACCCA). Το ζεύγος αυτών των εκκινητών είχε σχεδιαστεί για την αντίστοιχη κωδική περιοχή του γονιδίου του *Arabidopsis thaliana*. Θεωρήθηκε ότι οι εκκινητές αυτοί θα οδηγούσαν σε ενίσχυση του 5S rRNA και στην ελιά καθώς η κωδική περιοχή του 5S rRNA θεωρείται καλά συντηρημένη τόσο στο ζωικό όσο και στο φυτικό βασίλειο (Campell et al., 1992, Cox et al., 1992). Έγιναν διάφορες δοκιμαστικές PCR με το συγκεκριμένο ζεύγος εκκινητών οι οποίες δεν έδωσαν κάποιο αποτέλεσμα.

Για να ελεγχθεί ότι τα αντιδραστήρια του μίγματος της PCR δεν ήταν υπεύθυνα για την έλλειψη των αποτελεσμάτων, έγινε δοκιμαστική αντίδραση PCR με άλλο ζεύγος εκκινητών σχεδιασμένων για το γονίδιο της ακτίνης της ελιάς, η οποία και έδωσε το αναμενόμενο αποτέλεσμα.

Για να πραγματοποιηθεί η ενίσχυση του 5S rRNA στην ελιά έγινε συλλογή κατάλληλων πληροφοριών από την 5SRNadb βάση δεδομένων. Από τη βάση δεδομένων έγινε λήψη της κωδικής αλληλουχίας του 5S rRNA για την ελιά, η οποία έχει μέγεθος 123bp και έγινε BLAST ανάλυση στα χρωμοσώματα του assembly του γονιδιώματος της ελιάς στο NCBI. Αξιοποιήθηκε το αποτέλεσμα με το μεγαλύτερο ποσοστό αξιοπιστίας και ταυτοποίησης μαζί με αλληλουχία που προηγείται και έπεται αυτού για τον σχεδιασμό κατάλληλων εκκινητών. Οι πληροφορίες αυτές αξιοποιήθηκαν στο πρόγραμμα σχεδιασμού εκκινητών του NCBI (Pick Primers) για τη δημιουργία κατάλληλου ζεύγους εκκινητών για το γονίδιο 5S rRNA της ελιάς (Πίνακας 2.8).



Εικόνα 2.4: Δευτερογενής δομή του γονιδίου 5S rRNA της ελιάς όπως προκύπτει από την βάση δεδομένων 5SRNadb.

Το τελικό μέγεθος του ενισχυόμενου τμήματος DNA ανέρχεται στις 305bp. Οι 123bp απαρτίζουν την κωδική αλληλουχία του γονιδίου και οι λοιπές βάσεις προέρχονται από αλληλουχίες πριν (101bp) και μετά (41bp) αυτής στις οποίες δεσμεύονται οι εκκινητές.

Πίνακας 2.7: Τα συστατικά του PCR Master Mix.

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Τελική συγκέντρωση	Όγκος
Ρυθμιστικό διάλυμα PCR	10x	1x	5μl
dNTPs	10mM από το καθένα	200mM	5μl
Άνω εκκινητής	10μM	3μM	5μl
Κάτω εκκινητής	10μM	3μM	5μl
DNA μήτρα	-	-	Ποικίλει
TaqI (Invitrogen)	5u/μl	1u/μl	1 μl
ddH ₂ O	<i>Τόσο ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50μl</i>		

Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι περιεκτικότητες και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την διεκπεραίωση μίας αντίδρασης PCR. Τα διαλύματα που υπάρχουν στο εργαστήριο είναι αρκετά πυκνά και στη περίπτωση των εκκινητών και των dNTPs γίνονται κατάλληλες αραιώσεις. Όπως επίσης κατάλληλες αραιώσεις γίνονται και στο DNA. Συγκεκριμένα ελέγχθηκαν το πυκνό DNA αλλά και οι ακόλουθες αραιώσεις του σε ddH₂O (v/v) 1:1, 1:10, 1:100 και 1:1000.

Το ρυθμιστικό διάλυμα της PCR περιέχει MgCl₂ σε συγκέντρωση 15mM οπότε δεν απαιτείται περαιτέρω προσθήκη του. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως είναι απαραίτητη η προσθήκη περαιτέρω ποσότητας MgCl₂ είτε γιατί ο εκκινητής δε περιέχει MgCl₂ είτε γιατί η ποσότητα που περιέχει δεν επαρκεί για την πραγματοποίηση της επιθυμητής αντίδρασης.

Πίνακας 2.8: Οι εκκινητές ενίσχυσης του ανιχνευτή 5s rRNA.

Ονομασία εκκινητή	Νουκλεοτιδική αλληλουχία με 5'→3' κατεύθυνση
5s-rDNAFOe	G T T C C G A G G T G T G A A G T G G G
5s-rDNAROe	G G C C T C A C A A T C A C T A G C C A

Η σειρά με την οποία προστίθενται τα συστατικά της αντίδρασης είναι η ακόλουθη: 1.ddH₂O 2.Buffer (ρυθμιστικό διάλυμα PCR) 3.MgCl₂ (αν απαιτείται) 4.dNTPs 5. Primers 6.TaqI. Στην περίπτωση προετοιμασίας μίας αντίδρασης PCR, οι κατάλληλες ποσότητες των συστατικών τοποθετούνται σε σωλήνα χωρητικότητας 0.2ml ο οποίος είναι κατάλληλος για αντιδράσεις PCR. Εκτός των άνωθεν συστατικών

προστίθεται και η κατάλληλη ποσότητα DNA η οποία δρα ως μήτρα για τον πολλαπλασιασμό της επιθυμητής αλληλουχίας. Ακολουθεί ελαφριά ανάμειξη και φυγοκέντρωση και ο σωλήνας τοποθετείται στην κεφαλή της συσκευής MJ Research PT200 στην οποία έχει ήδη προγραμματιστεί κατάλληλο πρόγραμμα. Η συσκευή διαθέτει θερμαινόμενο καπάκι και γι' αυτό δεν απαιτείται προσθήκη λαδιού στις αντιδράσεις PCR.

Στην περίπτωση προετοιμασίας περισσότερων της μίας αντιδράσεις PCR, ακόμη και αν η επιπλέον αντίδραση είναι αυτή του μάρτυρα, ακολουθείται η εξής διαδικασία:

Όλα τα συστατικά για την αντίδραση της PCR πλην του DNA προστίθενται σε ένα eppendorf σε ποσότητα αντίστοιχη των αντιδράσεων που θα πραγματοποιηθούν. Γίνεται ελαφριά ανάδευση και φυγοκέντρωση του μίγματος το οποίο στη συνέχεια μοιράζεται σε σωλήνες των 0.2ml. Σε κάθε σωλήνα προστίθεται στη συνέχεια η κατάλληλη ποσότητα DNA σύμφωνα με τα στοιχεία που φέρει αυτός. Επαναλαμβάνεται η ανάδευση και η φυγοκέντρωση και οι σωλήνες τοποθετούνται στο θερμοκυκλοποιητή.

Πίνακας 2.9: Το πρόγραμμα του θερμοκυκλοποιητή.

Θερμοκρασία και Χρόνος	Τι συμβαίνει
12. 94°C→3min	Αποδιάταξη της DNA μήτρας.
13. 94°C→40sec	Αποδιάταξη.
14. 57°C→40sec	Υβριδισμός εκκινητών σε θερμοκρασία η οποία εξαρτάται από τη T _m των εκκινητών.
15. 72°C→1min	Επιμήκυνση για την Taq σε χρόνο που προκύπτει σύμφωνα με το μέγεθος του πολυμερισμού και των προδιαγραφών του ενζύμου.
16. (2-4) x 39 times	Επανάληψη των βημάτων 2 έως 4 άλλες 39 φορές.
17. 72°C→10min	Τελική επιμήκυνση και κατανάλωση του ενζύμου σε θερμοκρασία επιμήκυνσης.
18. 10°C→3min	Τέλος της αντίδρασης και μείωση της θερμοκρασίας για πιο ήπια μετάβαση σε θερμοκρασία χειρισμού ή αποθήκευσης.

Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης T_m. Θερμική τήξη του DNA συμβαίνει όταν οι δεσμοί υδρογόνου διασπώνται και το δίκλωνο (ds-) μόριο μετατρέπεται σε δύο μονόκλωνα (ss). Η θερμοκρασία στην οποία το μισό ενός δείγματος DNA βρίσκεται σε μονόκλωνη και το άλλο μισό σε δίκλωνη μορφή ονομάζεται θερμοκρασία τήξης. Όσο αυξάνεται το ποσοστό GC¹ ενός μορίου DNA, τόσο αυξάνεται και η θερμοκρασία τήξης του, καθώς περισσότεροι δεσμοί υδρογόνου απαιτούν μεγαλύτερη ενέργεια για την διάσπασή τους. Η θερμοκρασία T_m υπολογίζεται από τον τύπο:

$$T_m = 69.3 + 0.41 * GC\% - 650 / \text{αριθμό βάσεων εκκινητή}$$

Την ολοκλήρωση της PCR διαδέχεται ανάλυση των αντιδράσεων σε πηκτική αгарόζης 0,8-2%.(w/v) Σκοπός της ανάλυσης είναι ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων που προέκυψαν από την αντίδραση. Κατά την ανάλυση των αντιδράσεων

¹ Κάθε ζεύγος GC συγκρατείται από 3 δεσμούς υδρογόνου σε αντίθεση με τα ζεύγη AT τα οποία συγκρατούνται από 2 δεσμούς υδρογόνου.

PCR είναι απαραίτητη η παρουσία ladder για την διευκόλυνση της μέτρησης του μεγέθους των προϊόντων τους.

2.10 Απομόνωση του ανιχνευτή από πηκτή αγαρόζης

Το επόμενο στάδιο μετά την επιτυχή ενίσχυση του 5S RNA γονιδίου είναι η απομόνωσή του από πηκτή αγαρόζης. Για τον σκοπό αυτό παρασκευάζεται πηκτή αγαρόζης 2% w/v πάχους περίπου 0,5cm έτσι ώστε να σχηματιστούν βαθιά πηγαδάκια. Στα σχηματισθέντα πηγαδάκια φορτώνονται ολόκληροι οι όγκοι των αντιδράσεων της PCR. Η ηλεκτροφόρηση λαμβάνει χώρα υπό σταθερά 70Volt και διαρκεί περίπου 1h και 30min.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή μεταφέρεται πάνω σε γυαλί και τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους φωτός. Στη συνέχεια, τα κατάλληλα σημεία της πηκτής τα οποία περιέχουν το ενισχυμένο γονίδιο αποκόπτονται με νυστέρι σύρριζα από την υπόλοιπη πηκτή. Κατά την διαδικασία αυτή ο χρόνος έκθεσης των προϊόντων της PCR στο υπεριώδες φως είναι ο ελάχιστος δυνατός. Τα κομμάτια που αποκόπηκαν από την πηκτή τοποθετούνται σε δύο eppendrof και επωάζονται για 15min στους -80°C. Με το πέρας του χρόνου επώασης, γίνεται μέτρηση του βάρους των τμημάτων της πηκτής.

Η συνέχεια της απομόνωσης του γενετικού υλικού από την πηκτή γίνεται σύμφωνα με το PCR Clean-up Gel Extraction NucleoSpin Kit.

- ✓ Για κάθε 100mg πηκτής προστίθενται στα eppendrof 200μl ρυθμιστικού διαλύματος NT1. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το κάθε eppendrof περιέχει 340mg πηκτής οπότε και προστίθενται 680μl σε κάθε eppendrof.
- ✓ Γίνεται διάλυση της πηκτής στο eppendrof με έντονη ανάδευση με το χέρι και με το vortex.
- ✓ Μετά την ομογενοποίηση του μίγματος, τα eppendrof επωάζονται στους 50°C για 10min.
- ✓ Σε σωλήνα συλλογής (2ml) τοποθετείται μία στήλη (NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Column) στην οποία φορτώνονται 700μl μίγματος.
- ✓ Με τη χρήση κατάλληλου αντίβαρου πραγματοποιείται φυγοκέντρωση για 30sec σε 11.000g.
- ✓ Το εκκρέον υγρό απορρίπτεται και η στήλη επανατοποθετείται στο σωλήνα συλλογής.

- ✓ Τα τρία τελευταία βήματα επαναλαμβάνονται έως ότου να τελειώσει το μίγμα και στα δύο eppendrof.
- ✓ Η μεμβράνη της στήλης εκπλένεται με 700μl ρυθμιστικού διαλύματος NT3.
- ✓ Φυγοκέντρωση για 30sec σε 11.000g.
- ✓ Το εκκρέον υγρό απορρίπτεται και η στήλη επανατοποθετείται στο σωλήνα συλλογής.
- ✓ Το βήμα της έκπλυσης επαναλαμβάνεται άλλη μία φορά.
- ✓ Πραγματοποιείται ακόμη μία φυγοκέντρωση για 1min σε 11.000g για να απομακρυνθεί εντελώς το ρυθμιστικό διάλυμα NT3 από τη μεμβράνη της στήλης. (Το ρυθμιστικό διάλυμα NT3 περιέχει αιθανόλη η οποία δρα παρεμποδιστικά σε ενζυματικές αντιδράσεις, γι' αυτό και η απόρριψη του εκκρέοντος υγρού μετά τη φυγοκέντρωση γίνεται προσεκτικά ώστε να μην έρθει σε επαφή το υγρό με την μεμβράνη.)
- ✓ Η στήλη τοποθετείται σε νέο eppendrof και προστίθενται 30μl ddH₂O.
- ✓ Γίνεται επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και ακολουθεί φυγοκέντρωση για 1min σε 11.000g.

Την διαδικασία αυτή ακολουθεί η παρασκευή μίας νέας πηκτής αγαρόζης 2% w/v. Στην πηκτική φορτώνονται 2μl του δείγματος καθώς και ladder 100bp για να επιβεβαιωθεί η απομόνωση του επιθυμητού μεγέθους DNA αλλά και για να γίνει μέτρηση της συγκέντρωσης του ανιχνευτή.

2.11 Σήμανση του ανιχνευτή

Την επιτυχή ενίσχυση του ανιχνευτή 5s rRNA ακολουθεί η σήμανσή του σύμφωνα με το Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Cat. No. 11 585 614 910) της Roche. Σύμφωνα με το Kit ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Σε ένα eppendrof προστίθενται 1μg ενισχυμένου ανιχνευτή καθώς και ddH₂O έως τα 16μl.
2. Το DNA αποδιατάσσεται με τοποθέτηση του eppendrof σε νερό που βράζει για 10min. Ακολουθεί γρήγορη πτώση της θερμοκρασίας με τοποθέτηση του eppendrof σε πάγο (Η πλήρης αποδιάταξη του DNA είναι απαραίτητη για την επιτυχή σήμανση και ο πάγος εξασφαλίζει την διατήρηση του αποδιατεταγμένου DNA).

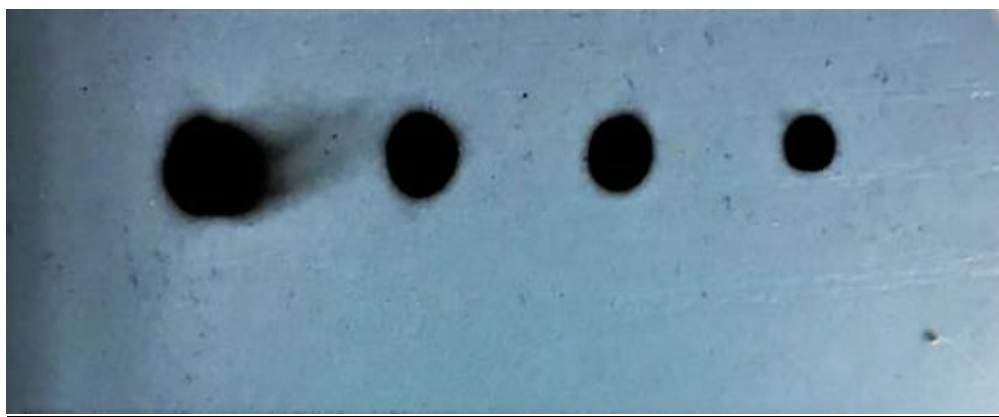
3. Μετά από διεξοδική ανακίνηση του δοχείου που περιέχει το DIG-High Prime (vial 1), προστίθενται 4μl του διαλύματος στο αποδιατεταγμένο DNA. Ακολουθεί ανάδευση και σύντομη φυγοκέντρηση.
4. Το μίγμα επώαζεται στους 37°C για 1h ή καθόλη τη διάρκεια της νύχτας. Πρέπει να σημειωθεί ότι μεγαλύτεροι χρόνοι επώασης (γύρω στις 20h) οδηγούν σε καλύτερη απόδοση του σημασμένου DNA και γι' αυτό προτιμώνται.
5. Για να σταματήσει η αντίδραση γίνεται προσθήκη 2μl 0.2M EDTA. Τα μήκη των σημασμένων DNA θραυσμάτων ποικίλουν από 200bp έως περισσότερες από 1.000bp και εξαρτώνται άμεσα από το αρχικό μέγεθος του DNA.

2.12 Έλεγχος απόδοσης του Kit

Ο έλεγχος της αποδοτικότητας του Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Cat. No. 11 585 614 910) έγινε ως εξής:

1. Γίνονται οι αραιώσεις 1:10, 1:100, 1:1.000 και 1:10.000 του σημασμένου 5S rRNA.
2. Κόβεται θετικά φορτισμένη νάιλον μεμβράνη στην οποία και προστίθενται 5μl από κάθε αραιώση.
3. Ακολουθεί έκθεση για 30sec σε UV τράπεζα.
4. Η μεμβράνη τοποθετείται σε μικρό δοχείο όπου και προστίθεται Maleic acid buffer (20ml) και ακολουθεί επώαση για 2min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
5. Απορρίπτεται το υγρό και προστίθεται Blocking solution (10ml). Ακολουθεί επώαση για 1h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
6. Το Blocking solution συλλέγεται και προστίθεται Antibody solution (10ml).
7. Ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30min υπό ανάδευση.
8. Το Antibody solution συλλέγεται και η μεμβράνη εκπλένεται με Washing buffer το οποίο και απορρίπτεται άμεσα.
9. Προστίθεται Washing buffer (10ml) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15min υπό ανάδευση.
10. Γίνεται απόρριψη του υγρού και προστίθεται ξανά Washing buffer (10ml).
11. Η επώαση διαρκεί 15min και λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.

12. Απορρίπτεται το υγρό και προστίθεται Detection buffer (10ml) στο οποίο η μεμβράνη παραμένει για 5min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Το υγρό απορρίπτεται και σβήνουν τα φώτα.
14. Προστίθενται πάνω στη μεμβράνη 2ml CSPD και χρονομετροούνται 3min.
15. Η μεμβράνη μεταφέρεται στο φάκελο έκθεσης και σφραγίζεται ανάμεσα σε δύο μεμβράνες.
16. Τοποθετείται φιλμ και κλείνει η κασετίνα έκθεσης.
17. Μετά από 1min απομακρύνεται το φιλμ και αντικαθίσταται με ένα άλλο το οποίο είχε χρόνο έκθεσης 5min.
18. Αμέσως μετά την απομάκρυνση των φιλμ από το φάκελο έκθεσης, γίνεται η εμφάνισή τους:
 - a. Τοποθετείται το φιλμ σε δοχείο το οποίο περιέχει Developer διάλυμα και παραμένει εκεί υπό έντονη ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα. Σε αυτό το στάδιο γίνεται η εμφάνιση των σημείων που έχουν κάψει οι κηλίδες λόγω φωτοβολίας στο φιλμ.
 - b. Το φιλμ μεταφέρεται στη συνέχεια σε δοχείο το οποίο περιέχει νερό βρύσης για να εκπλυθεί. Η έκπλυση διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα και γίνεται σε συνθήκες ανάδευσης.
 - c. Το φιλμ μεταφέρεται σε δοχείο το οποίο περιέχει Fixer διάλυμα και παραμένει εκεί υπό έντονη ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα. Σε αυτό το στάδιο το φιλμ παρουσιάζεται να μαυρίζει. Μετά από αυτό το στάδιο ξέρουμε ότι πλέον δεν μπορεί να επηρεαστεί από το φως.
 - d. Ακολούθως το φιλμ μεταφέρεται σε δοχείο το οποίο περιέχει νερό βρύσης για να εκπλυθεί, και παραμένει εκεί μέχρι να μεταφερθεί στο σημείο όπου αφήνεται να στεγνώσει.



Εικόνα 2.5: Φιλμ μετά από έκθεση 1min με σημειωμένο ανιχνευτή σε αραιώσεις 5ng/μl, 500pg/μl, 50pg/μl και 5pg/μl (5μl/κηλίδα).



Εικόνα 2.6: Φιλμ μετά από έκθεση 5min με σημειωμένο ανιχνευτή σε αραιώσεις 5ng/μl, 500pg/μl, 50pg/μl και 5pg/μl (5μl/κηλίδα).

Για επέμβαση στη σωστή πλευρά της μεμβράνης, κόβεται η πάνω δεξιά γωνία της. Για τον ίδιο ακριβώς λόγο, στα φιλμ που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν κόβεται η ίδια ακριβώς γωνία. Ακόμη, ιδιαίτερη προσοχή δίνεται ώστε να μην στεγνώσει σε κανένα στάδιο της διαδικασίας αυτής η μεμβράνη. Με αυτό τον τρόπο αποφεύγεται το σκοτεινό υπόβαθρο κατά την εμφάνιση των φιλμ.

Από τον έλεγχο αυτό προέκυψε ότι τα αντιδραστήρια του Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II, είναι σε καλή κατάσταση και μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Ταυτόχρονα συλλέχθηκαν τα πρώτα αποτελέσματα της σήμανσης του ανιχνευτή 5S rRNA.

2.13 Καθορισμός αποδοτικότητας της σήμανσης

Ακολούθως έλαβε χώρα ο καθορισμός της αποδοτικότητας της σήμανσης μέσω μίας σειράς αραιώσεων του σημασμένου ανιχνευτή έως τα 0,01pg/μl. Αρχικά, ο σημασμένος ανιχνευτής αραιώθηκε σε συγκέντρωση 1ng/μl. Ακολούθησε μία σειρά αραιώσεων όπως αυτή παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα (2.6). Στη συνέχεια οι αραιώσεις χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο του βαθμού επιτυχίας της σήμανσης του ανιχνευτή.

Η πάνω δεξιά γωνία της μεμβράνης και των φιλμ αποκόπηκε για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν και προηγουμένως. Επιπλέον, για την αποφυγή πιθανού σκοτεινού υποβάθρου κατά την εμφάνιση των φιλμ, η μεμβράνη δεν αφέθηκε να στεγνώσει σε κανένα στάδιο της διαδικασίας.

Πίνακας 2.10: Αραιώσεις

Eppendrof	DNA (μl)	Από το eppendrof	ddH₂O (μl)	Αραίωση	Τελική Συγκέντρωση
1		Αρχικό αραιωμένο			1ng/μl
2	2	1	198	1:100	10pg/μl
3	15	2	35	1:3.3	3pg/μl
4	5	2	45	1:10	1pg/μl
5	5	3	45	1:10	0.3pg/μl
6	5	4	45	1:10	0.1pg/μl
7	5	5	45	1:10	0.03pg/μl
8	5	6	45	1:10	0.01pg/μl
9	0	-	50	-	0

Διαδικασία:

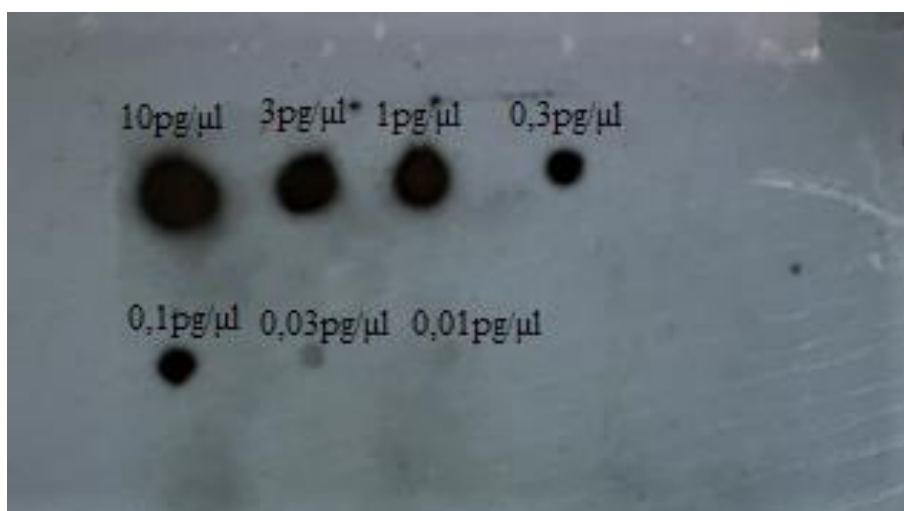
1. Τοποθετείται σε μορφή κηλίδας 1μl από κάθε ένα από τα δοχεία 2-9 του σημασμένου ανιχνευτή πάνω σε μία θετικά φορτισμένη μεμβράνη νάilon.
2. Τα νουκλεϊκά οξέα σταθεροποιούνται στη μεμβράνη με έκθεση σε UV φως για 30-60sec.

3. Η μεμβράνη μεταφέρεται σε πλαστικό δοχείο όπου προστίθενται 20ml Maleic acid buffer. Η μεμβράνη επώάζεται υπό ανάδευση για 2min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Απορρίπτεται το Maleic acid buffer. Προστίθενται 10ml Blocking solution και ακολουθεί επώαση για 60min σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση.
5. Συλλέγεται το Blocking solution. Προστίθενται 10ml Antibody solution και η επώαση λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 30min.
6. Συλλέγεται το Antibody solution. Γίνεται έκπλυση της μεμβράνης με Washing buffer το οποίο απορρίπτεται άμεσα.
7. Ακολουθεί επώαση σε 10ml Washing buffer για 15min υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Απορρίπτεται το υγρό και επαναλαμβάνεται αυτό το βήμα ακόμη μία φορά.
9. Γίνεται εξισορρόπηση για 2-5min σε 10ml Detection buffer υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Απορρίπτεται το Detection buffer.
11. Η μεμβράνη τοποθετείται με την πλευρά του DNA να κοιτά προς τα πάνω, σε κατάλληλο δοχείο. Προστίθενται 2ml CSPD (vial 5) πάνω στη μεμβράνη.
12. Η μεμβράνη μεταφέρεται μετά από 3min στο φάκελο ανάπτυξης και καλύπτεται άμεσα με το δεύτερο φύλλο του φακέλου έτσι ώστε να απλωθεί ομοιόμορφα πάνω στη μεμβράνη το υγρό και να αποφευχθεί ο σχηματισμός φυσαλίδων αέρα.
13. Απομακρύνεται η περίσσεια του υγρού και σφραγίζεται ο φάκελος ανάπτυξης.
14. Ακολουθεί έκθεση σε φιλμ ακτίνας X για 10min και 30min σε θερμοκρασία δωματίου.
15. Η εμφάνιση του κάθε φιλμ έγινε ως εξής:
 - a. Τοποθετείται το φιλμ σε δοχείο το οποίο περιέχει Developer διάλυμα και παραμένει εκεί υπό έντονη ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα. Σε αυτό το στάδιο γίνεται η εμφάνιση των σημείων που έχουν κάψει οι κηλίδες λόγω φωτοβολίας στο φιλμ.
 - b. Το φιλμ μεταφέρεται στη συνέχεια σε δοχείο το οποίο περιέχει νερό βρύσης για να εκπλυθεί. Η έκπλυση διαρκεί λίγα δευτερόλεπτα και γίνεται υπό ανάδευση.
 - c. Το φιλμ μεταφέρεται σε δοχείο το οποίο περιέχει Fixer διάλυμα και παραμένει εκεί υπό έντονη ανάδευση για μερικά δευτερόλεπτα. Σε αυτό το στάδιο το φιλμ

παρουσιάζεται να μαυρίζει. Μετά από αυτό το στάδιο ξέρουμε ότι πλέον δεν μπορεί να επηρεαστεί από το φως.

- d. Στη συνέχεια το φιλμ μεταφέρεται σε δοχείο το οποίο περιέχει νερό βρύσης για να εκπλυθεί, και παραμένει εκεί μέχρι να μεταφερθεί στο σημείο όπου αφήνεται να στεγνώσει.

Σύμφωνα με τις οδηγίες του Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Cat. No. 11 585 614 910) της Roche, αν η κηλίδα της αραιώσης του 0,1pg/μl του ανιχνευτή είναι ορατή, τότε ο σημασμένος ανιχνευτής έχει φτάσει την αναμενόμενη και επιθυμητή απόδοση της σήμανσης. Αυτό πρακτικά σημαίνει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη συνιστώμενη συγκέντρωση στο στάδιο του υβριδισμού. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του ελέγχου σήμανσης του ανιχνευτή, όλες οι κηλίδες από τα 10pg/μl έως τα 0,01pg/μl είναι ορατές με τις κηλίδες οι οποίες αντιστοιχούν στις αραιώσεις 0,03pg/μl και 0,01pg/μl να είναι πολύ αχνές.



Εικόνα 2.7: Φιλμ μετά από έκθεση 10min με ενισχυμένο ανιχνευτή σε αραιώσεις 10pg/μl, 3pg/μl, 1pg/μl, 0,3pg/μl, 0,1pg/μl, 0,03pg/μl και 0,01pg/μl (1μl/κηλίδα).



Εικόνα 2.8: Φίλμ μετά από έκθεση 30min με ενισχυμένο ανιχνευτή σε αραιώσεις 10pg/μl, 3pg/μl, 1pg/μl, 0,3pg/μl, 0,1pg/μl, 0,03pg/μl και 0,01pg/μl (1μl/κηλίδα).

2.14 Πέψεις

Για τις πέψεις των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας ως προς site-specific τροποποιήσεις των αλληλουχιών αναγνώρισής τους. Τα ένζυμα τα οποία επιλέχθηκαν για την παρούσα εργασία είναι ευαίσθητα στη μεθυλίωση και είναι τα HpaII, MspI και ClaI. Τα ακόλουθα στοιχεία των ενζύμων συλλέχθηκαν από ποικίλες πηγές: Waalwijk et al., 1978, Walder et al., 1983, Aljanabi & Martinez, 1997, Kavarik et al., 1997, Katsiotis et al., 1998, McClelland et al., 1994, Fojtova et al., 2001, Kato et al., 2003, Doerfler & Bohm, 2006, Meissner et al., 2008, Kriaucionis et al., 2009, Lister et al., 2009, Tahilliani et al., 2009, Moore, T., 2018.

Πίνακας 2.11: Ένζυμα, αλληλουχίες αναγνώρισης και κοπής.

Όνομα ενζύμου	Αλληλουχία αναγνώρισης	Αλληλουχία που κόβει	Αλληλουχία που δεν κόβει
MspI	CCGG	$m^4CCGG^2 / C^{m^4}CGG$ $C^{m^5}CGG^3$	$m^3CCGG / C^{m^3}CGG$ $hm^5C^{hm^5}CGG^4$
HpaII	CCGG		$m^4CCGG / C^{m^4}CGG$ $C^{m^5}CGG / m^5CCGG$ $hm^5C^{hm^5}CGG$
ClaI	ATCGAT		$m^6ATCGAT^5$

Σε σωλήνα eppendorf προστίθενται:

- 1) 10X ρυθμιστικό διάλυμα (10% του τελικού όγκου)
- 2) Δείγμα DNA (μέχρι το 80% του τελικού όγκου)
- 3) Ένζυμο περιορισμού (μέχρι 10% του τελικού όγκου)
- 4) ddH₂O (μέχρι το 100% του τελικού όγκου)

Ο τελικός όγκος των αντιδράσεων πέψης καθορίστηκε στα 50μl.

Εν συνεχεία, καθορίστηκε ο βέλτιστος χρόνος των αντιδράσεων πέψης. Συνήθως οι πέψεις διαρκούν 1-2h αλλά σε περιπτώσεις γονιδιωματικού DNA συστήνεται πέψη καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight). Για τον έλεγχο του καταλληλότερου χρόνου της αντίδρασης της πέψης, έγιναν δύο δοκιμαστικές πέψεις σε δύο διαφορετικά δείγματα. Η πρώτη δοκιμαστική πέψη έγινε με επώαση στους 37°C overnight και η δεύτερη στους 37°C για 2h. Τα δείγματα τα οποία χρησιμοποιήθηκαν ήταν ίδια (το 29 και το 54) όπως ίδιες ήταν και οι αναλογίες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

² Μεθυλίωση στο 4' C της κυτοσίνης.

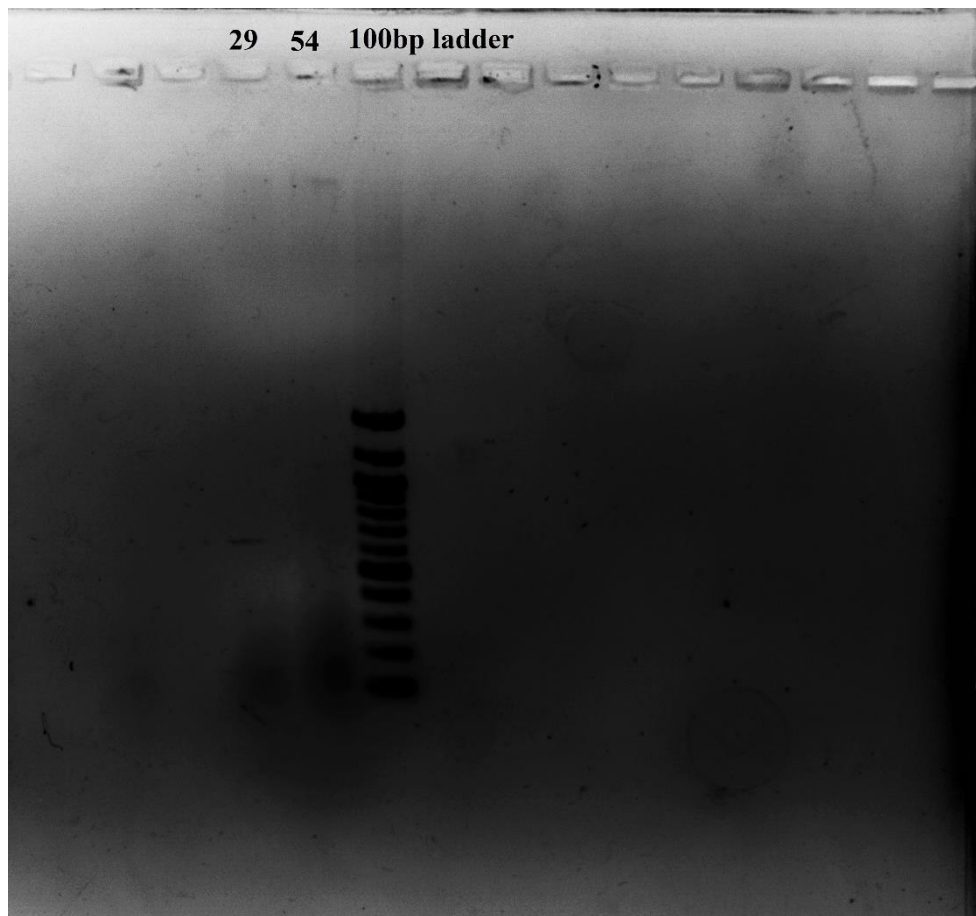
³ Μεθυλίωση στο 5' C της κυτοσίνης.

⁴ Υδροξυμεθυλίωση στο 5' C της κυτοσίνης.

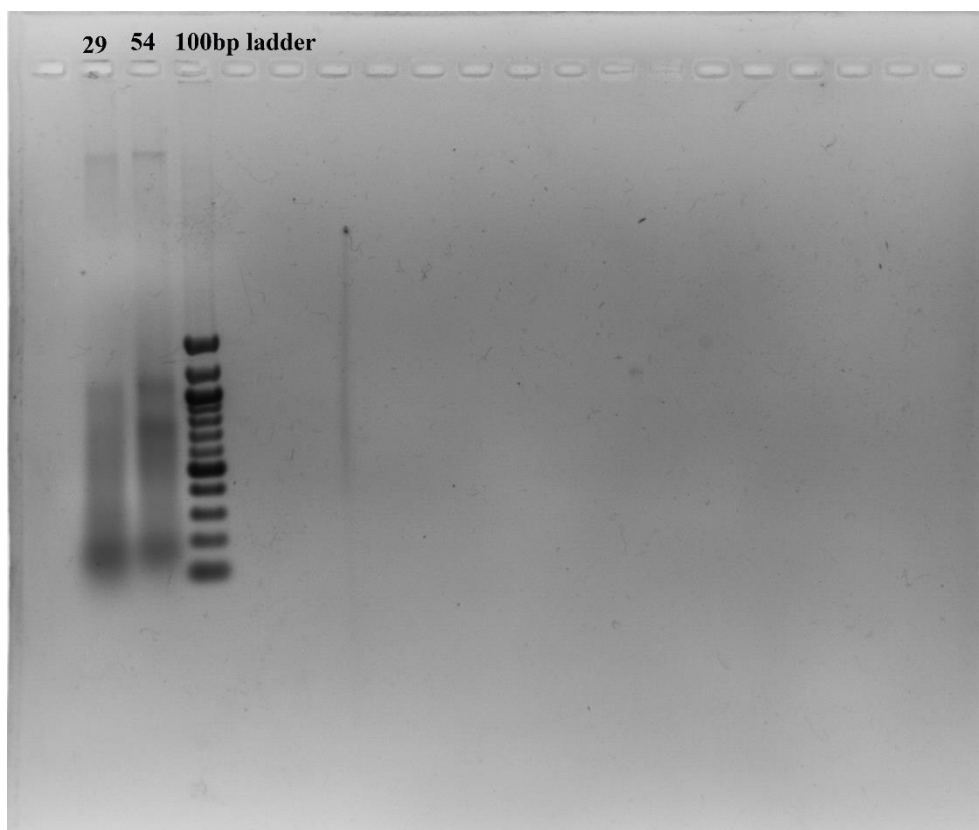
⁵ Μεθυλίωση στο 6' C της αδενίνης.

Πίνακας 2.12: Αναλογίες πέψης

Αντιδραστήρια	Ποσότητες
10X Ρυθμιστικό διάλυμα	5μl
Ένζυμο Περιορισμού	1,5μl
100ng DNA	1,4μl
ddH ₂ O	42.1
Τελικός Όγκος	50μl



Εικόνα 2.9: Ηλεκτροφόρηση 20μl των αντιδράσεων πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0,8% μετά από επώαση στους 37°C overnight.



Εικόνα 2.10: Ηλεκτροφόρηση 20μl των αντιδράσεων πέψης σε πηκτή αγαρόζης 0,8% μετά από επώαση στους 37°C για 2h.

Όπως φαίνεται από τις εικόνες **2.9** και **2.10**, την καλύτερη απόδοση έδωσε η πέψη που διήρκησε 2h και όχι αυτή που διήρκησε όλη τη νύχτα, κάτι που πιθανότατα οφείλεται στη βελτίωση της δράσης των ενζύμων από τις εταιρείες που τα παρασκευάζουν. Συγκεκριμένα, η εταιρεία NEB αναφέρει στην ιστοσελίδα της ότι υπάρχουν ένζυμα τα οποία μπορούν να πέσουν 1μg DNA σε 5-15min. Σε αυτά τα ένζυμα συγκαταλέγονται και αυτά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για αυτή τη μελέτη.

Η προετοιμασία των πέψεων έγινε αυστηρά πάνω σε πάγο και τελευταίο προστέθηκε το ένζυμο το οποίο μέχρι εκείνη τη στιγμή ήταν στους -20°C. Με το πέρας των αντιδράσεων πέψης, οι αντιδράσεις είτε αναλύονται άμεσα σε πηκτή αγαρόζης παρουσία ladder ή αποθηκεύονται στους -20°C και η ανάλυσή τους γίνεται κάποια άλλη μέρα.

2.15 Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης αξιοποιείται για τον διαχωρισμό θραυσμάτων νουκλεϊκών οξέων διαφορετικού μεγέθους και διαμόρφωσης. Η

περιεκτικότητα της πηκτής σε αγαρόζη εξαρτάται από το μέγεθος των μορίων προς ανάλυση και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 0,8% και 2% w/v.

- ✓ Σε κωνική φιάλη προστίθενται 98ml dH₂O, 2ml TAE 50X και 0,8gr αγαρόζης (0.8% w/v).
- ✓ Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων έως ότου να διαλυθεί η αγαρόζη και το μίγμα να καταστεί διαφανές.
- ✓ Όταν κρυώσει ελαφρώς το μίγμα προστίθενται 5ml βρωμιούχου αιθιδίου και γίνεται κυκλική ανάδευση του μίγματος με το χέρι έως ότου αυτό να καταστεί ομοιογενές.
- ✓ Κατάλληλη ποσότητα του μίγματος τοποθετείται σε κατάλληλη θήκη για την συσκευή ηλεκτροφόρησης που θα χρησιμοποιηθεί. Η θήκη αυτή έχει σφραγιστεί στα πλαϊνά της με χαρτοταινία.
- ✓ Αμέσως απομακρύνονται με τιπ από πιπέττα τυχόν φυσαλίδες και τοποθετείται η χτένα για το σχηματισμό των πηγαδιών της πηκτής.
- ✓ Η πηκτή αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Αφού στερεοποιηθεί η πηκτή, αφαιρούνται προσεκτικά η κτένα και οι χαρτοταινίες και τοποθετείται μαζί με την θήκη στη συσκευή ηλεκτροφόρησης με τις θέσεις που έχει σχηματίσει η χτένα προς το σημείο σύνδεσης του αρνητικού πόλου.
- ✓ Στη συσκευή ηλεκτροφόρησης έχει ήδη τοποθετηθεί TAE 1X σε κατάλληλη ποσότητα έτσι ώστε να καλύπτεται πλήρως η πηκτή αγαρόζης από αυτό. Αν όμως κριθεί απαραίτητο συμπληρώνεται κι επιπλέον διάλυμα TAE 1X.
- ✓ Σε ένα κομμάτι πάραφιλμ τοποθετούνται σταγόνες κατάλληλης ποσότητας 5x loading dye για την προετοιμασία των δειγμάτων. Σε κάθε σταγόνα προστίθεται ανάλογη ποσότητα δείγματος και γίνεται ανάδευση με την πιπέττα έως ότου το μίγμα να έχει ομοιογενές χρώμα.
- ✓ Τα δείγματα αυτά στη συνέχεια φορτώνονται στις θέσεις (πηγαδάκια) που έχει σχηματίσει η χτένα πάνω στην πηκτή.
- ✓ Μετά το πέρας του φορτώματος η συσκευή ηλεκτροφόρησης κλείνεται και συνδέεται με ηλεκτρικό πεδίο ρυθμισμένο σε συνεχή τάση 50-120V.
- ✓ Αν είναι επιθυμητή η μέτρηση του μεγέθους των ζωνών του DNA σε ένα πηγαδάκι τοποθετείται μία μικρή ποσότητα ladder (δείκτη) ο οποίος έχει καθορισμένα και γνωστά μοριακά βάρη.

2.16 Μεταφορά νουκλεϊκών οξέων κατά Southern

- ✓ Αναλύονται τα νουκλεϊκά οξέα (DNA) σε πηκτή αγαρόζης παρουσία δείκτη μοριακών βαρών (ladder).
- ✓ Μετράται η απόσταση που έχουν μετακινηθεί τα νουκλεϊκά οξέα με χάρακα από τα πηγαδάκια της πηκτής.
- ✓ Απομακρύνονται με κόψιμο τα περιττά τμήματα αγαρόζης δεξιά και αριστερά από τα δείγματα.
- ✓ Μεταφέρεται η πηκτή σε πλαστικό δοχείο όπου και εμβαπτίζεται σε 0.25N HCl για 15min υπό συνθήκες ανάδευσης.
- ✓ Ξεπλένεται η πηκτή δύο φορές με ddH₂O.
- ✓ Προστίθεται στο πλαστικό δοχείο διάλυμα αποδιάταξης (250ml) και διατηρείται η πηκτή σε αυτό υπό συνθήκες ανάδευσης για 30min.
- ✓ Απορρίπτεται το διάλυμα και επαναλαμβάνεται το ίδιο βήμα.
- ✓ Ξεπλένεται η πηκτή μία φορά με ddH₂O.
- ✓ Προστίθεται διάλυμα ουδετεροποίησης (250ml) και διατηρείται σε αυτό η πηκτή για 30min υπό ανάδευση.
- ✓ Απορρίπτεται το διάλυμα και επαναλαμβάνεται το ίδιο βήμα.
- ✓ Απορρίπτεται το διάλυμα και προστίθεται 0.4M NaOH στο οποίο η πηκτή παραμένει υπό ανάδευση για 10min.
- ✓ Κόβονται απορροφητικά χαρτιά, 3x Whatman στο μέγεθος της πηκτής, 1x θετικά φορτισμένη νάιλον μεμβράνη στο μέγεθος της πηκτής και 2x Whatman στο πλάτος της πηκτής με μεγάλο μήκος τα οποία θα χρησιμοποιηθούν ως γέφυρα κατά τη συναρμολόγηση του «σάντουιτς».
- ✓ Συναρμολόγηση:
 - ✓ Βρέχονται οι Whatman γέφυρες στο 0.4M NaOH και τοποθετούνται στην επιφάνεια.
 - ✓ Τοποθετείται η πηκτή πάνω στη γέφυρα.
 - ✓ Διαβρέχεται η μεμβράνη σε ddH₂O και τοποθετείται προσεκτικά πάνω στην πηκτή αφού έχει σημειωθεί η πλευρά όπου δε θα μεταφερθούν τα νουκλεϊκά οξέα (πίσω πλευρά).
 - ✓ Τοποθετείται ένα Whatman που έχει διαβραχεί σε ddH₂O.
 - ✓ Τοποθετούνται δύο στεγνά Whatman.

- ✓ Για καθένα από τα χαρτιά Whatman εφαρμόζεται ελαφρά πίεση με γυάλινη πιπέττα για να εξασφαλιστεί καλή επαφή μεταξύ των χαρτιών Whatman.
- ✓ Τυλίγεται με μεμβράνη η επιφάνεια της γέφυρας εκτός του «σάντουιτς».
- ✓ Τοποθετούνται από πάνω πολλά απορροφητικά χαρτιά στο μέγεθος της πηκτής.
- ✓ Τοποθετείται μία μεγάλη γυάλινη επιφάνεια πάνω από τα απορροφητικά χαρτιά.
- ✓ Τοποθετείται πάνω στην γυάλινη επιφάνεια αντικείμενο βάρους περίπου 0.5kg.
- ✓ Γίνεται έλεγχος της καλής ισορροπίας του βάρους πάνω στην κατασκευή για να εξασφαλιστεί η σωστή και ομοιόμορφη επαφή των χαρτιών και κατ' επέκταση μεταφορά των νουκλεϊκών οξέων από την πηκτή στη μεμβράνη.
- ✓ Αφαιρούνται τα βρεγμένα απορροφητικά χαρτιά μετά από μία ώρα περίπου και προστίθενται στεγνά (τα τρία πρώτα απορροφητικά χαρτιά που βρίσκονται πάνω από τα χαρτιά Whatman δεν αφαιρούνται για να αποφευχθεί πιθανή μετακίνηση της μεμβράνης).
- ✓ Η μεταφορά λαμβάνει χώρα καθόλη τη διάρκεια της νύχτας (12-16h).
- ✓ Το επόμενο πρωί γίνεται ακόμη μία φορά αλλαγή του πακέτου από χαρτιά κουζίνας με στεγνά και αφήνονται για 2h.
- ✓ Μετά το πέρας της μεταφοράς αφαιρείται η μεμβράνη από το «σάντουιτς» τοποθετείται σε στεγνό Whatman.
- ✓ Η μεμβράνη ψήνεται για 2h στους 80°C.
- ✓ Στη συνέχεια, η μεμβράνη τοποθετείται σε τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολία με την πλευρά του DNA προς την τράπεζα ακτινοβολίας και εφαρμόζεται υπεριώδους ακτινοβολία για 1.5min (μεταξύ μεμβράνης και UV τράπεζας παρεμβάλλεται διαφανής μεμβράνη για αποφυγή επαφής με βρωμιούχο αιθίδιο που τυχόν δεν έχει αφαιρεθεί τελείως από την τράπεζα).
- ✓ Η μεμβράνη μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C μέχρι να λάβει χώρα ο υβριδισμός.

2.17 Υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων

- ✓ Το διάλυμα προϋβριδισμού και ο γυάλινος σωλήνας, στον οποίο θα λάβει χώρα ο υβριδισμός, τοποθετούνται στο θάλαμο υβριδισμού ο οποίος είναι προθερμασμένος στους 65°C.

- ✓ Η μεμβράνη τυλίγεται σε ένα ψιλό και μαλακό πλέγμα (mesh) και τοποθετείται μέσα στο σωλήνα με τη νουκλεϊκή πλευρά να κοιτά στο εσωτερικό του σωλήνα και προστίθενται 20ml διαλύματος προϋβριδισμού.
- ✓ Σε έναν όμοιο σωλήνα υβριδισμού προστίθεται κατάλληλη ποσότητα νερού και χρησιμοποιείται ως αντίβαρο κατά την περιστροφή τους στο θάλαμο.
- ✓ Η επώαση διαρκεί 1h και λαμβάνει χώρα στους 65°C υπό περιστροφή.
- ✓ Μετά το πέρας της 1h υπολογίζεται η ποσότητα του ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί (σε 200μl ddH₂O προστέθηκαν 10μl ανιχνευτή) και λαμβάνει χώρα η αποδιάταξή του με βρασμό για 5min. Άμεσα ο αποδιατεταγμένος σημασμένος ανιχνευτής τοποθετείται σε πάγο.
- ✓ Αφαιρείται το διάλυμα προϋβριδισμού και προστίθεται το διάλυμα υβριδισμού στο οποίο έχει προστεθεί και ο ανιχνευτής.
 - Το διάλυμα υβριδισμού είναι ίδιο με το διάλυμα προϋβριδισμού με τη διαφορά ότι το πρώτο περιέχει τον αποδιατεταγμένο σημασμένο ανιχνευτή ενώ το δεύτερο όχι.
- ✓ Ο υβριδισμός λαμβάνει χώρα στους 65°C καθόλη τη διάρκεια της νύχτας υπό περιστροφή των σωλήνων.
- ✓ Μετά το πέρας του υβριδισμού ακολουθεί μία σειρά εκπλύσεων της μεμβράνης για την απομάκρυνση των μη ειδικών υβριδίων:
- ✓ Γίνεται συλλογή του διαλύματος υβριδισμού και η μεμβράνη εκπλένεται με 5%SDS για 10min στους 65°C.
- ✓ Απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη 5%SDS για 10min στους 60°C.
- ✓ Απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη 5%SDS για 10min στους 55°C.
- ✓ Απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη 2%SDS για 10min στους 50°C.
- ✓ Απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη 2%SDS για 10min στους 45°C.
- ✓ Απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη 2%SDS για 10min στους 40°C.
- ✓ Απομάκρυνση του γυάλινου σωλήνα από το θάλαμο υβριδισμού και τοποθέτησή του σε θερμοκρασία δωματίου για 2-5min.

2.18 Ανίχνευση σήματος υβριδισμού νουκλεϊκών οξέων

Μετά τον υβριδισμό και τις εκπλύσεις της μεμβράνης ακολουθείται σύμφωνα με το Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Cat. No. 11 585 614 910) της Roche η εξής διαδικασία:

1. Απομάκρυνση της μεμβράνης από το σωλήνα υβριδισμού και τοποθέτησή της σε ειδικό πλαστικό δοχείο.
2. Ελαφρά έκπλυση της μεμβράνης με Washing buffer για 1-5min υπό ανάδευση.
3. Επώαση για 30min σε 100ml Blocking solution υπό ανάδευση.
4. Συλλογή του Blocking solution.
5. Επώαση για 30min σε 20ml Antibody solution υπό ανάδευση.
6. Συλλογή του Antibody solution.
7. Έκπλυση της μεμβράνης με Washing buffer (100ml) για 15min υπό ανάδευση.
8. Απόρριψη του διαλύματος και επανάληψη του βήματος.
9. Επώαση σε 20ml Detection buffer για 2-5min υπό ανάδευση.
10. Απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη 2-3ml CSPD.
11. Τοποθέτηση της μεμβράνης μετά από 5min με την πλευρά του DNA προς τα πάνω σε ένα φάκελο ανάπτυξης.
12. Άμεση κάλυψη της μεμβράνης με το δεύτερο φύλλο του φακέλου ανάπτυξης και απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων.
13. Απομάκρυνση της περίσσεια του υγρού και σφράγιση του φακέλου ανάπτυξης.
14. Έκθεση των φιλμ ακτίνας X για 5-25min στους 15-25°C.

Αν η μεμβράνη στεγνώσει κατά τη διαδικασία της εμφάνισης τότε στο τελικό αποτέλεσμα το υπόβαθρο θα είναι σκούρο.

Η φωτοβολία του σήματος διαρκεί τουλάχιστον 48h. Το σήμα κατά τις πρώτες ώρες αυξάνεται ως προς την έντασή του μέχρι να φτάσει ένα σημείο στο οποίο θα σταθεροποιηθεί για τις υπόλοιπες 24-48h. Συνιστώνται πολλαπλές λήψεις στη διάρκεια των 48h έτσι ώστε να επιτευχθεί η λήψη με κατάλληλη ένταση σήματος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ClaI

Για να βελτιστοποιηθούν οι διαδικασίες Southern, υβριδοποίησης και ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκαν τα δείγματα της δοκιμαστικής πέψης των 2h. Μετά τις αλλαγές που έγιναν στις διαδικασίες αυτές, επιλέχθηκαν τρία δείγματα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων και διαφορετικών ιστών προς ανάλυση. Τα δείγματα αυτά είναι το 29 -το οποίο συλλέχθηκε από νεαρά φύλλα-, το δείγμα 54 -το οποίο συλλέχθηκε κατά το στάδιο που ο καρπός της ελιάς είναι ακόμα πράσινος- και το 60 -το οποίο συλλέχθηκε κατά την έναρξη αλλαγής του χρώματος του φλοιού του καρπού.

Τα δείγματα 29 (νεαρά φύλλα) και 54 (πράσινοι καρποί) ήταν αυτά που χρησιμοποιήθηκαν για να ελεγχθεί αν η πέψη είναι πιο αποτελεσματική όταν λαμβάνει χώρα καθ' όλη τη διάρκεια της νύχτας ή στις 2h (*Εικόνα 2.6 & 2.7*). Τα ίδια δείγματα στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν και για την πρώτη πλήρη ανάλυση (μεταφορά κατά Southern, υβριδισμός, ανίχνευση και οπτικοποίηση).

Η προετοιμασία της αντίδρασης της πέψης έγινε αυστηρά πάνω σε πάγο. Ο όγκος των αντιδράσεων είχε οριστεί στα 50μl και οι ποσότητες των υπόλοιπων αντιδραστηρίων παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

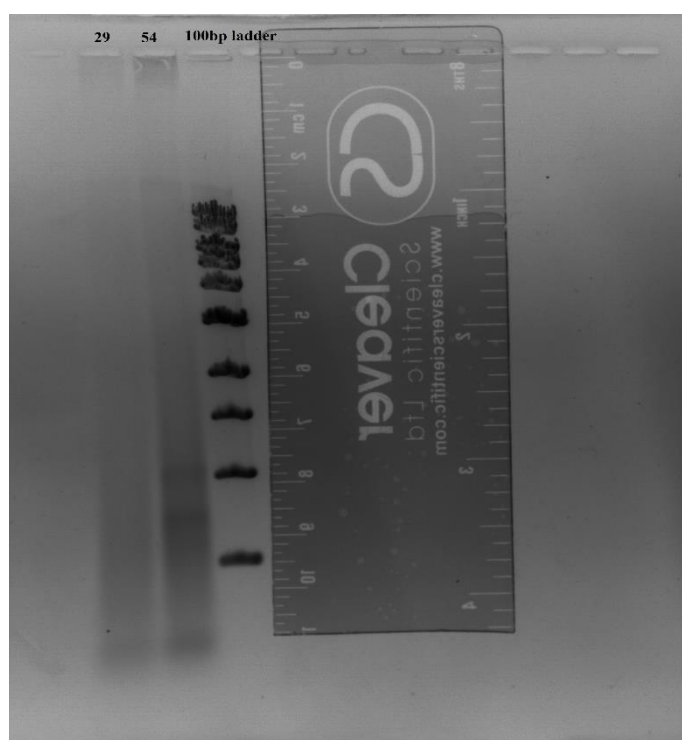
Πίνακας 3.1: Αντιδράσεις πέψης με το ClaI.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (29&54)
CutSmart 10x	5μl
DNA 100ng	1,4μl
Restriction Enzyme ClaI	1,5μl
ddH ₂ O	42,1μl
Τελικός όγκος	50μl

Οι αντιδράσεις της πέψης έλαβαν χώρα στους 37°C για 2h. Στο διάστημα των ωρών αυτών παρασκευάστηκε πηκτή αгарόζης 0,8% (w/v) η οποία ήταν μεγάλου πάχους έτσι ώστε τα πηγαδάκια να έχουν μεγάλη χωρητικότητα. Μέχρι να ολοκληρωθεί η πέψη η πηκτή ήταν έτοιμη για φόρτωση δειγμάτων εντός της συσκευής ηλεκτροφόρησης. Με το πέρας της πέψης οι αντιδράσεις προετοιμάστηκαν για να

φορτωθούν στην πηκτή. Σε κάθε αντίδραση προστέθηκαν 8μl blue loading dye και μετά από διεξοδική ανάδευση με τη πιπέττα φορτώθηκε στη πηκτή ολόκληρος ο όγκος των αντιδράσεων. Δίπλα στις αντιδράσεις φορτώθηκαν και 3,4μl 100bp ladder (1,2μl ladder και 2,2μl blue loading dye). Η ηλεκτροφόρηση διήρκησε 2h & 20min υπό σταθερά 80V.

Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης η πηκτή φωτογραφήθηκε παρουσία χάρακα. Αφού αποκόπηκαν τα περισσευούμενα τμήματα της πηκτής, το εναπομείναν κομμάτι της άρχισε να προετοιμάζεται για τη μεταφορά κατά Southern όπως περιγράφεται στο *Κεφάλαιο 2.14*.



Εικόνα 3.1: Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης των δειγμάτων 29 και 54 με το ένζυμο περιορισμού ClaI.

Αφού ολοκληρώθηκαν οι διαδικασίες μεταφοράς, υβριδισμού και ανίχνευσης σύμφωνα με τα αντίστοιχα πρωτόκολλα, ολοκληρώθηκε και η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων. Έγινε οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων σε δύο φιλμ, το πρώτο είχε ως χρόνο έκθεσης 2min και το δεύτερο 15min.



Όπως φαίνεται στην εικόνα, η πέψη με το ένζυμο ClaI δεν έδωσε καμία καθαρή ζώνη υβριδισμού, αντιθέτως το σήμα είναι αχνό και παρουσιάζεται ως μία διάχυτη θολή σκίαση (smear). Το ίδιο παρατηρείται και στο δεύτερο φιλμ με χρόνο έκθεσης 15min. Το smear συμπίπτει τέλεια με τον τρόπο που είχαν τρέξει τα δείγματα κατά την ηλεκτροφόρηση.

Εικόνα 3.2: Χρόνος έκθεσης 2min μετά από πέψη 2h με το ένζυμο περιορισμού ClaI στα δείγματα 29 & 54.



Η αλληλουχία που αναγνωρίζει και κόβει το ένζυμο περιορισμού ClaI (5'-AT⁺CGAT-3'/ 3'-TAGC⁻TA-5') δεν εμπεριέχεται στην αλληλουχία του ανιχνευτή. Επιπλέον, μία έρευνα στη πιο πρόσφατη δημοσιευμένη σύνθεση του γονιδιώματος της ελιάς (Ειζονα 3.10) εντόπισε σε μόνο 2 περιπτώσεις την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου πριν ή μετά από σημεία πρόσδεσης του ανιχνευτή.

Εικόνα 3.3: Χρόνος έκθεσης 15min μετά από πέψη 2h με το ένζυμο περιορισμού ClaI στα δείγματα 29 & 54.

3.2 MspI

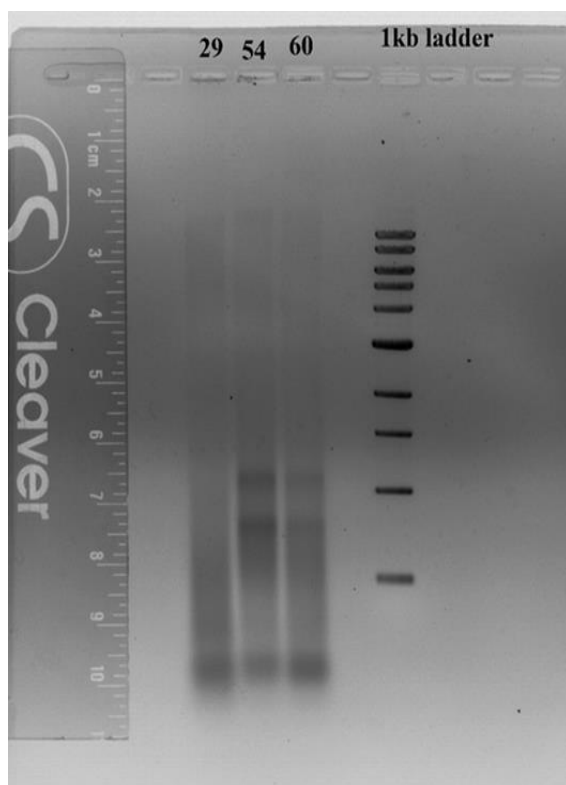
Το επόμενο ένζυμο περιορισμού που δοκιμάστηκε ήταν το MspI. Σε αυτή τη περίπτωση προετοιμάστηκαν αντιδράσεις πέψης για τρία δείγματα, το 29 (νεαρά φύλλα), το 54 (πράσινοι καρποί) και το 60 (καρποί κατά την έναρξη αλλαγής χρώματος του φλοιού τους) όπως παρουσιάζεται στον ακόλουθο πίνακα. Η πέψη έλαβε χώρα στους 37°C για 2h.

Πίνακας 3.2: Αντιδράσεις πέψης με το MspI.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες (29 & 54)	Ποσότητες (60)
CutSmart 10x	5μl	5μl
DNA 100ng	1,4μl	1,8μl
Restriction Enzyme MspI	1,5μl	1,5μl
ddH ₂ O	42,1μl	41,7μl
Τελικός όγκος	50μl	50μl

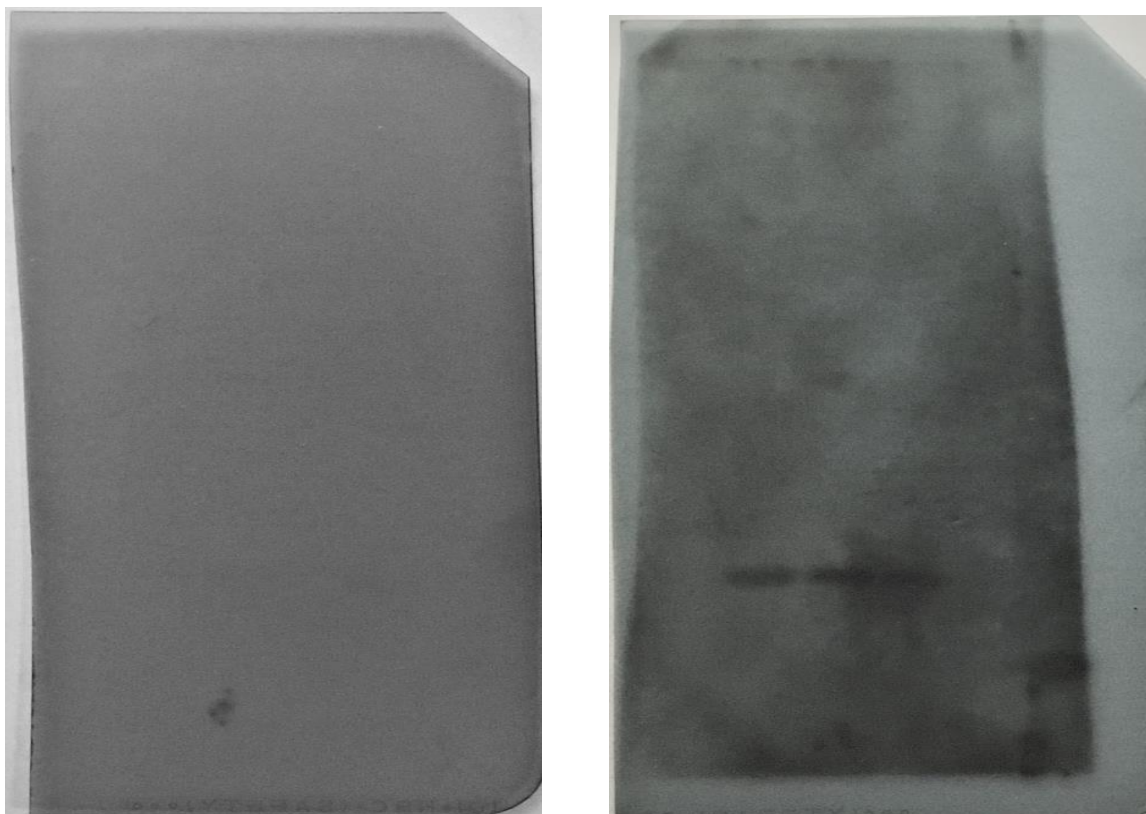
Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιήθηκε σε πηκτή αгарόζης 0,8% (w/v) με διάρκεια 2h στην οποία αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε 1kb ladder. Το διάλυμα SSC (20X) το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση Southern των αντιδράσεων πέψης με το ένζυμο περιορισμού ClaI, αντικαταστάθηκε με διάλυμα 0.4M NaOH. Ο χρόνος

έκθεσης για την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων ήταν 2:30min για το πρώτο φιλμ και 15min για το δεύτερο.



Εικόνα 3.4: Ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης των δειγμάτων 29, 54 και 60 με το ένζυμο περιορισμού MspI.

Αυτή τη φορά οι αντιδράσεις φορτώθηκαν στο μέσο της πηκτής αγαρόζης. Στόχος αυτής της τακτικής ήταν η άσκηση ισοδύναμης πίεσης από το ηλεκτρικό φορτίο στα δείγματα ώστε να αποφευχθεί αυτά να τρέξουν «στραβά». Όπως αυτό γίνεται αντιληπτό με μία απλή παρατήρηση των *Εικόνων 3.5 & 3.6*, η διέλευση του ηλεκτρικού φορτίου ήταν πιο ισορροπημένη και ως επακόλουθο αυτού οι αντιδράσεις έτρεξαν σε μία ευθεία.



Εικόνες 3.5 (αριστερά) & 3.6 (δεξιά): Χρόνος έκθεσης 2:30min (αριστερά) & 15min (δεξιά) μετά από πέψη 2h με το ένζυμο περιορισμού MspI στα δείγματα 29, 54 & 60.

Στην *Εικόνα 3.5* του φιλμ, με χρόνο έκθεσης 2:30min, το σήμα είναι τόσο αχνό που είναι σχεδόν αόρατο. Στο δεύτερο φιλμ με χρόνο έκθεσης 15min είναι ορατές τρεις ζώνες υβριδισμού, μία για κάθε δείγμα (29, 54 και 60). Με βοήθεια χάρακα μετρήθηκαν οι αποστάσεις κάθε ζώνη υβριδισμού από το πηγάδι φόρτωσής του. Οι τρεις ζώνες υβριδισμού ισαπήχαν από τα πηγαδάκια στα οποία φορτώθηκαν και είχαν και το ίδιο πάχος.

3.3 HpaII

Το επόμενο ένζυμο περιορισμού το οποίο χρησιμοποιήθηκε ήταν το HpaII, το ισοσχιζομερές του MspI. Προετοιμάστηκαν αντιδράσεις πέψης τόσο για το ένζυμο περιορισμού HpaII όσο και για το MspI για δύο δείγματα, το 29 (νεαρά φύλλα) και το 60 (καρποί κατά την έναρξη αλλαγής χρώματος του φλοιού τους). Η πέψη έλαβε χώρα της 37°C καθ'όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight).

Πίνακας 3.3: Αντιδράσεις πέψης με τα ένζυμα MspI & HpaII.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες – MspI (29)	Ποσότητες- MspI (60)	Ποσότητες- HpaII (29)	Ποσότητες- HpaII (60)
CutSmart 10x	5μl	5μl	5μl	5μl
DNA 100ng	1,4μl	1,8μl	1,4μl	1,8μl
Restriction Enzyme	1,5μl(1+0,5μl)	1,5μl(1+0,5μl)	2μl(1,5+0,5μl)	2μl(1,5+0,5μl)
ddH ₂ O	42,1μl	41,7μl	41,6μl	41,2μl
Τελικός όγκος	50μl	50μl	50μl	50μl

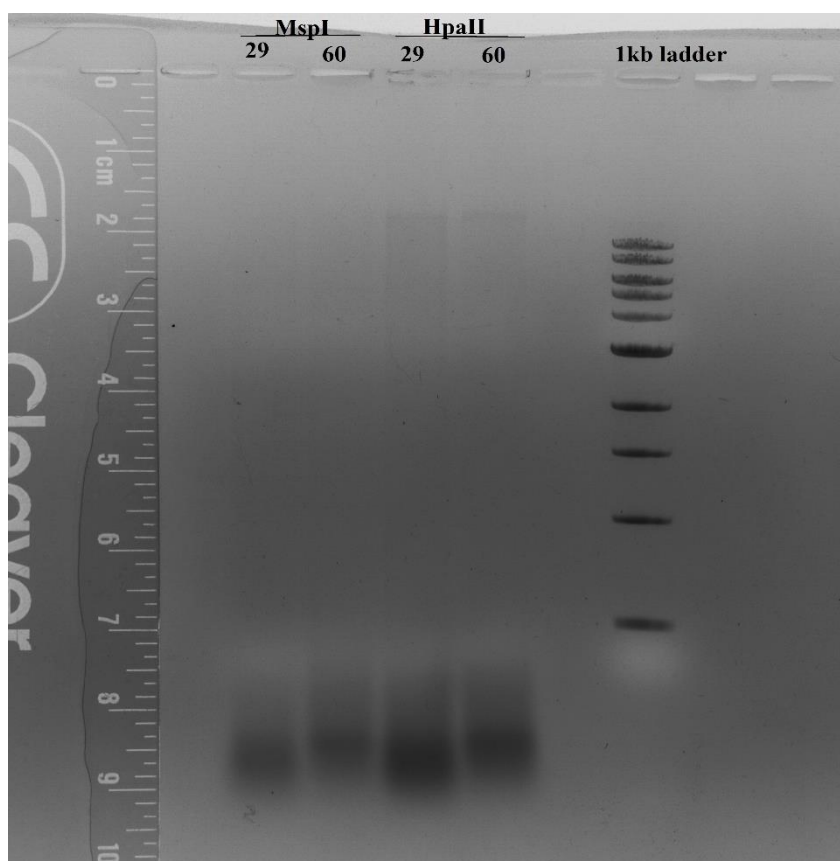
Η overnight πέψη συστήνεται από πολλούς ερευνητές στην περίπτωση μεταχείρισης του γονιδιωματικού DNA και αποφασίστηκε να γίνει ακόμη μία δοκιμή εφόσον υπήρχαν ήδη αποτελέσματα για σύγκριση από το ένα εκ των δύο ενζύμων. Για αυτή την πέψη χρησιμοποιήθηκαν νέα ένζυμα των οποίων η παραλαβή έγινε το ίδιο πρωί.

Τα δύο διαφορετικά ισοσχιζομερή ένζυμα (τα οποία διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους στη μεθυλίωση) χρησιμοποιήθηκαν όπως φαίνεται σε διαφορετικές αντιδράσεις πέψης των ίδιων δειγμάτων υπό τις ίδιες συνθήκες. Με αυτόν τον τρόπο, πραγματοποιήθηκε έλεγχος της κατάστασης μεθυλίωσης των ανιχνεύσιμων στόχων των δειγμάτων. Ταυτόχρονα, με τη χρήση των νέων ενζύμων πραγματοποιήθηκε έλεγχος σχετικά με το αν τα παλαιά ένζυμα (τα οποία ήταν ανοιγμένα καιρό και πολυχρησιμοποιημένα) είναι ικανά να πέσουν επαρκώς ένα τόσο πολύπλοκο γονιδίωμα όσο αυτό της ελιάς.

Την overnight πέψη διαδέχθηκε η προσθήκη μικρής ποσότητας ενζύμου (0,5μl) σε κάθε αντίδραση για να ανανεωθεί η δράση της μετά από τόσες ώρες. Οι ποσότητες των ενζύμων που προστέθηκαν στις αντίστοιχες αντιδράσεις δεν είναι ίσες ως της τον

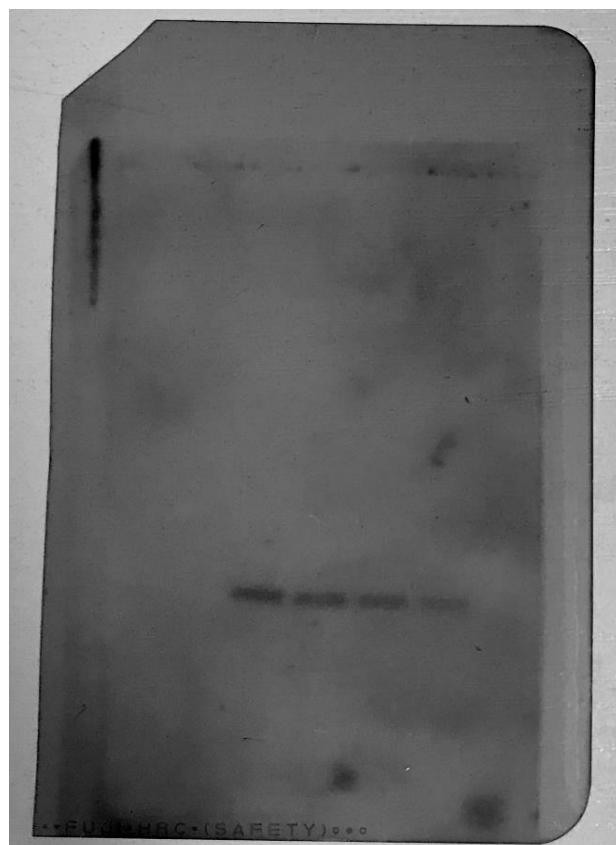
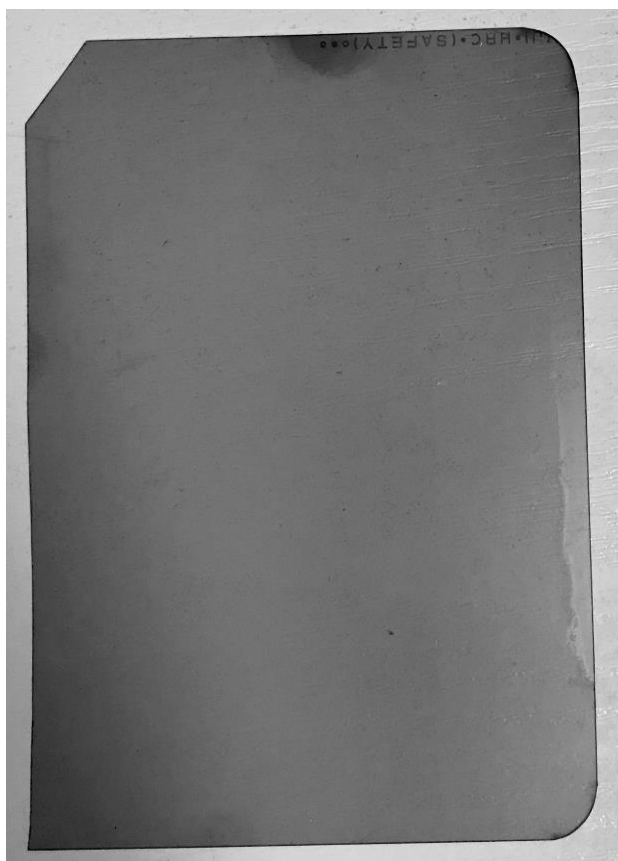
όγκο τους αλλά είναι ίσες ως προς τα μM τα οποία προστέθηκαν καθώς τα δύο ένζυμα είχαν διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις (μM). Η πέψη συνεχίστηκε για ακόμη 2h στους 37°C .

Την πέψη διαδέχθηκε η ηλεκτροφόρηση η οποία πραγματοποιήθηκε σε πηκτική αгарόζης 0.8% (w/v) υπό σταθερά 100V. Τα δείγματα φορτώθηκαν με την εξής σειρά: 29MspI- 60MspI- 29HpaII- 60HpaII- κενή θέση- 1kb ladder.



Εικόνα 3.7: Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων 29 και 60 σε ξεχωριστές αντιδράσεις πέψης με τα ένζυμα περιορισμού MspI και HpaII.

Η οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων έγινε σε δύο φιλμ, με χρόνο έκθεσης 4:30min στο πρώτο φιλμ και 20min στο δεύτερο. Στο πρώτο φιλμ *Εικόνα 3.8* δεν είναι κανένα αποτέλεσμα ορατό. Αντιθέτως, στο δεύτερο φιλμ, *Εικόνα 3.9*, είναι εμφανείς τέσσερις ζώνες υβριδισμού, μία για κάθε δείγμα. Η μέτρηση της απόστασης κάθε ζώνης υβριδισμού από την αφετηρία έδειξε ότι οι ζώνες υβριδισμού ισαπέχουν από αυτή όπως επίσης ότι έχουν και το ίδιο πάχος.



Εικόνα 3.8 (αριστερά) & 3.9 (δεξιά): Χρόνος έκθεσης 4:30min (αριστερά) και 20min (δεξιά) μετά από ξεχωριστές overnight πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού MspI & HpaII στα δείγματα 29 & 60.

3.4 5S rRNA στην ελιά

Για την ερμηνεία των αποτελεσμάτων έγινε συλλογή κατάλληλων δεδομένων σχετικά με την ομολογία του ανιχνευτή σε σύγκριση με το νουκλεϊκό στόχο του.

Το γονιδίωμα της ελιάς δεν είναι πλήρως αλληλουχημένο. Το γεγονός αυτό δυσκολεύει την βιοπληροφορική ανάλυση συγκεκριμένων δεδομένων. Οι Unver et al. το 2017 κατάφεραν να αλληλουχίσουν το μεγαλύτερο έως τώρα ποσοστό του γονιδιώματος της άγριας ελιάς (*Olea europaea* var. *sylvestris*). Τα αποτελέσματά τους, έχουν καταχωρηθεί στο NCBI όπου είναι και διαθέσιμα.

[Full Report](#)
[Send to:](#)

O_europaea_v1

Organism name: [Olea europaea var. sylvestris \(wild olive\)](#)

BioSample: [SAMN05943011](#)

BioProject: [PRJNA350614](#)

Submitter: International Olive Genome Consortium

Date: 2017/11/03

Assembly level: Chromosome

Genome representation: full

RefSeq category: representative genome

GenBank assembly accession: GCA_002742605.1 (latest)

RefSeq assembly accession: GCF_002742605.1 (latest)

RefSeq assembly and GenBank assembly identical: no ([hide details](#))

- Only in RefSeq: chromosome PltD (in non-nuclear assembly-unit)
- Data displayed for RefSeq version

WGS Project: [MSRW01](#)

Assembly method: SOAPdenovo v. 2

Expected final version: yes

Reference guided assembly: de-novo

Genome coverage: 220.0x

Sequencing technology: Illumina HiSeq

IDs: 1424741 [UID] 5603498 [GenBank] 5634388 [RefSeq]

History([Show revision history](#))

Global statistics

Total sequence length	1,141,145,264
Total assembly gap length	109,483,939
Gaps between scaffolds	0
Number of scaffolds	41,226
Scaffold N50	12,567,911
Scaffold L50	23
Number of contigs	83,944
Contig N50	48,313
Contig L50	5,797
Total number of chromosomes and plasmids	24
Number of component sequences (WGS or clone)	41,226

Access the data

- [Browse in Genome Data Viewer](#)
- [View the Annotation Report](#)
- [Download the RefSeq assembly](#)
- [Download the GenBank assembly](#)
- [BLAST search the assembly](#)
- [Download the full sequence report](#)
- [Download the statistics report](#)

Assembly Information

- [Assembly Help](#)
- [Assembly Basics](#)
- [NCBI Assembly Data Model](#)

Related Information

- [BioProject](#)
- [BioSample](#)
- [Genome](#)
- [Nucleotide INSDC](#)
- [Nucleotide RefSeq](#)
- [PubMed](#)
- [Taxonomy](#)
- [WGS Master](#)

PubMed articles for this assembly

- [Genome of wild olive and the evolution of olivetetraene biosynthesis.](#)
- [Genomic profiling of plastid DNA variation in olive \(Olea europaea\) from the Mediterranean olive tree.](#)

Εικόνα 3.10: Το assembly του γονιδιώματος της ελιάς από το NCBI.

Η πηγή αυτή (*Εικόνα 3.10*) αξιοποιήθηκε για το σχεδιασμό των εκκινητών για την κωδική περιοχή του 5s rRNA (*Πίνακας 2.8*). η κωδική περιοχή του 5S rRNA στην ελιά έχει μέγεθος 123bp και το ενισχυμένο τμήμα που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής στην ανάλυση κατά Southern έχει μέγεθος 305bp. 121bp (20bp του εκκινητή και 101bp της μη μεταγραφόμενης αλληλουχίας) προηγούνται της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου ενώ 61bp έπονται αυτής (41bp της μη μεταγραφόμενης αλληλουχίας και 20bp του εκκινητή).

Οι 3 ζώνες υβριδισμού που ανιχνεύθηκαν μετά την πέψη 2h με το ένζυμο MspI (29MspI, 54MspI και 60MspI) ισαπήχαν από τα πηγαδάκια φόρτωσής τους, όπως και οι 2 ζώνες υβριδισμού που ανιχνεύθηκαν μετά την overnight πέψη (29MspI και 60MspI) ισαπήχαν από τα αντίστοιχα πηγαδάκια φόρτωσης. Την ίδια απόσταση είχαν και οι ζώνες υβριδισμού που ανιχνεύθηκαν μετά την overnight πέψη με το ένζυμο HpaII (29HpaII και 60HpaII). Η απόσταση που μετρήθηκε για τις ζώνες υβριδισμού συγκρίθηκε με την απόσταση που είχε διανύσει το 1kbladder κατά την ηλεκτροφόρηση.

Προέκυψε ότι το μέγεθος της ζώνης υβριδισμού κυμαίνεται στις 390bp. Επιπλέον, εφόσον η κωδική αλληλουχία έχει μέγεθος 123bp οι υπόλοιπες 267bp ανήκουν στην μη μεταγραφόμενη περιοχή, 182bp που ανήκουν στην αλληλουχία του ανιχνευτή και άλλες 85bp οι οποίες δε είναι γνωστό αν προηγούνται ή αν έπονται του ανιχνευτή.

Η πηγή που παρουσιάζεται στην **Εικόνα 3.10** χρησιμοποιήθηκε και για την διερεύνηση των πιθανών πολλαπλών αντιγράφων αυτής στο γονιδίωμα της ελιάς. Συγκεκριμένα, η αλληλουχία του ανιχνευτή χρησιμοποιήθηκε για να πραγματοποιηθεί BLAST alignment στα χρωμοσώματα του γονιδιώματος της ελιάς καθώς και του μη πυρηνικού τμήματός της, όπως αυτό έχει συντεθεί από τους Unver et al. (2017).

Η ανάλυση αυτή έδωσε περίπου 34 αποτελέσματα για την συγκεκριμένη ακολουθία. Από τα 34 αυτά αποτελέσματα τα 12 είχαν τα υψηλότερα ποσοστά ομολογίας με τον ανιχνευτή. Από τα 12 αποτελέσματα τα υψηλότερα ποσοστά σε ομολογία και αξιοπιστία τα έδωσαν μόλις δύο αλληλουχίες-στόχοι. Τα υπόλοιπα, είτε εμφάνιζαν κενά τμήματα εξαιτίας της μη ολοκληρωμένης σύνθεσης του γονιδιώματος, είτε η ομολογία που προέκυπε δεν ήταν τέλεια ως προς την ακολουθία του ανιχνευτή. Σε ορισμένες περιπτώσεις δε, η ακολουθία εμφανιζόταν ανεστραμμένη οπότε ο ανιχνευτής δε θα μπορούσε να συνδεθεί σε αυτές.

Διερευνήθηκαν οι περιοχές οι οποίες πλαισιώνουν τα 12 καλύτερα αποτελέσματα (ως προς την ομολογία, την ταυτοποίηση και την ύπαρξη λιγότερων κενών θέσεων) σχετικά με την ύπαρξη σημείων αναγνώρισης από τα ένζυμα ClaI, MspI και HpaII. Από την ανάλυση προέκυψε ότι κανένα από τα 12 αυτά σημεία δε γειτνιάζει με την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου ClaI (5'-AT⁺CGAT-3'/ 3'-TAGC⁺TA-5'). Αντιθέτως, τα περισσότερα από αυτά τα σημεία πλαισιώνονταν από αλληλουχίες αναγνώρισης των ισοσχιζομερών ενζύμων MspI και HpaII. Τα πιθανά θραύσματα τα οποία προέκυψαν από αυτή την ανάλυση με τα ένζυμα MspI και HpaII, είχαν ποικίλα μεγέθη αλλά αρκετά από αυτά ήταν πολύ κοντινά. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι κάποια πιθανά θραύσματα έδιναν μεγέθη 337bp, 386bp, 430bp, 432bp, 442bp, 466bp, 504bp, 560bp, 664bp, 1070bp και 1451bp. Αξίζει να αναφερθεί ότι οι 2 αλληλουχίες-στόχοι οι οποίες παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά αξιοπιστίας και ομολογίας δίνουν πιθανά θραύσματα μεγέθους 466bp και 432bp αντιστοίχως.

Η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων από τις αναλύσεις κατά Southern επιβεβαιώθηκε από αυτή την βιοπληροφορική ανάλυση. Αρχικά, επιβεβαιώθηκε ότι

δεν υπάρχουν αλληλουχίες αναγνώρισης κοντά στους στόχους του ανιχνευτή για το ένζυμο ClaI. Επιπλέον, όσον αφορά τα ένζυμα περιορισμού MspI και HpaII, τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης έδειξαν ότι ο ανιχνευτής υβριδοποιείται κατά κύριο λόγο σε θέσεις με μέγεθος μικρότερο των 500bp. Η ανάλυση κατά Southern με τα ένζυμα περιορισμού MspI και HpaII έδωσε ως αποτέλεσμα μία ζώνη υβριδισμού ανά δείγμα η οποία έχει μέγεθος περίπου 390bp. Τέλος, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Southern αυτών των δύο ενζύμων περιορισμού (με την παρουσία μίας μόνο ζώνης υβριδισμού) δεν βρέθηκε μεθυλίωση στην αλληλουχία CCGG.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Συζήτηση- Συμπεράσματα

Η ελιά είναι ένα δένδρο με ιδιαίτερη σημασία παγκοσμίως. Η μελέτη του γονιδιώματος της έχει δείξει ότι είναι ένα αρκετά πολύπλοκο είδος με αρκετά ενδιαφέροντα και μοναδικά χαρακτηριστικά. Το γονιδιώμα της ελιάς (1,4Gb) είναι πολύ μεγαλύτερο από αυτό της *Arabidopsis thaliana* (135Mb), ένα φυτικό είδος το οποίο χρησιμοποιείται πολύ σε πειράματα βιοτεχνολογικού χαρακτήρα (Cruz et al., 2016, NCBI). Η μελέτη της ελιάς επομένως είναι ένα δύσκολο έργο το οποίο απαιτεί περισσότερο χρόνο και υπομονή σε σχέση με άλλα φυτικά είδη. Η άποψη αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι το 70% του γονιδιώματος της ελιάς (*Olea europaea* L.) απαρτίζεται από επαναλαμβανόμενες στη σειρά αλληλουχίες οι οποίες είναι γνωστό ότι παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη δομή των κεντρομερικών και περικεντρομερικών περιοχών στις οποίες και κατά κύριο λόγο εντοπίζονται (Barghini et al., 2014).

Η ελιά κατά τη διάρκεια ενός έτους περνάει πολλές διαφορετικές φάσεις ανάπτυξης, όπως και όλα τα φυτά (μονοετή και πολυετή), κατά τις οποίες μεταβάλλονται συχνά τα επιμέρους όργανά της (όπως για παράδειγμα κατά την άνθιση). Η μετάβαση από ένα αναπτυξιακό στάδιο σε ένα άλλο εξαρτάται από τα περιβαλλοντικά ερεθίσματα που δέχεται το εκάστοτε φυτικό είδος (π.χ. ώρες χαμηλών θερμοκρασιών) και συνοδεύεται από την ενεργοποίηση και έκφραση ενός συνόλου γονιδίων. Η ενεργοποίηση και απενεργοποίηση των γονιδίων και κατ' επέκταση η μετάβαση από ένα αναπτυξιακό στάδιο σε ένα άλλο, συνοδεύεται συνήθως με την απομεθυλίωση και την μεθυλίωσή τους αντιστοίχως αν και υπάρχουν εξαιρέσεις σε αυτόν τον κανόνα (Hasbun et al., 2007, Santamaria et al., 2011, Zhang et al., 2014). Το συμπέρασμα αυτό βασίζεται στον γενικό κανόνα σύμφωνα με τον οποίο όσο περισσότερο μεθυλιωμένη είναι η περιοχή της γονιδιακής ρύθμισης, τόσο πιο πιθανή είναι η μειωμένη γονιδιακή δραστηριότητα και το αντίστροφο, με την ύπαρξη κάποιων εξαιρέσεων (Tollefsbol, 2011).

Η μετάβαση των φυτικών ειδών από ένα αναπτυξιακό στάδιο σε κάποιο άλλο έχει μελετηθεί σε κάποια είδη και έχει συνδεθεί με μεταβολές στα επίπεδα της μεθυλίωσής τους. Οι Bitonti et al. (2002) έλεγξαν τις μεταβολές της μεθυλίωσης σε

κορυφαία μεριστώματα της ροδακινιάς. Στα πλαίσια της έρευνάς τους εντόπισαν μεταβολές στα επίπεδα της μεθυλίωσης κατά την αλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων της. Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά ευρήματά τους είναι το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσης κατά το λήθαργο των οφθαλμών, το οποίο μειώνεται καθώς η ροδακινιά εισέρχεται στο στάδιο της διαφοροποίησης των οφθαλμών. Ομοίως, οι Hasbun et al. (2007) διέκριναν κατά την έρευνά τους στην καστανιά ότι ο λήθαργος των οφθαλμών συνοδεύεται από καθολική αύξηση της μεθυλίωσης ανεξάρτητα από τη γήρανση του φυτού. Αυτά τα αποτελέσματα ενισχύουν το συμπέρασμα των Bitonti et al. (2002) ότι οι μεταβολές των επιπέδων μεθυλίωσης του DNA είτε ρυθμίζουν την αλλαγή των αναπτυξιακών φάσεων των ανώτερων φυτών είτε απλώς λαμβάνουν χώρα τις περιόδους αυτές.

Η μεθυλίωση εκτός του ότι σχετίζεται με την αλλαγή των αναπτυξιακών σταδίων των φυτών, επηρεάζει άμεσα την φυσιολογική ανάπτυξή τους. Οι Hasbun et al. (2007) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μεθυλίωση είναι υπεύθυνη για κάποιες περιπτώσεις γονιδιακής σίγησης. Το χαρακτηριστικό αυτό υποστηρίζεται άλλωστε από την ανώμαλη και μη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών στην περίπτωση μεταβολών των επιπέδων μεθυλίωσής τους (Hasbun et al., 2007).

Η μεθυλίωση του DNA μπορεί να λειτουργήσει ως μοριακός δείκτης για συγκεκριμένες διαδικασίες ανάπτυξης του φυτού είτε αυτό είναι γυμνόσπερμο είτε αγγειόσπερμο. Οι διαδικασίες αυτές μπορεί να σχετίζονται με τη γήρανση, την αναγέννηση ακόμη και με την αλλαγή των φάσεων ανάπτυξης των φυτών (Hasbun et al., 2007). Ιδιαίτερα στα CpG σημεία αγγειόσπερμων, στα οποία συγκαταλέγεται και η ελιά, έχουν εντοπιστεί υψηλά επίπεδα μεθυλίωσης. Πρόκειται για μία πολύ καλά συντηρημένη λειτουργία όλων των οργανισμών. Από συγκρίσεις σε ορθόλογα γονίδια αργά εξελισσόμενων ειδών προέκυψαν ιδιαίτερα υψηλά επίπεδα συντήρησης της μεθυλίωσής τους. Όπως επίσης προέκυψε ότι η μεθυλίωση και η σίγηση των μεταθετών στοιχείων, είναι μία αρχαία διαδικασία για τα φυτά (Niederhuth et al., 2013). Ειδικά οι μεθυλιωμένες κυτοσίνες σε ευκαρυωτικά γονιδιώματα σχετίζονται με τις επαναλαμβανόμενες ακολουθίες, συμπεριλαμβανομένων και των μεταθετών στοιχείων και των παραγώγων τους.

Οι επαναλαμβανόμενες αυτές ακολουθίες έχουν δύο πιθανές επιβλαβείς επιδράσεις, οι οποίες υπόκεινται στον έλεγχο της μεθυλίωσης. Η μεθυλίωση, αποτρέπει

αρκετά συχνά την ανεξέλεγκτη μεταγραφή των γονιδίων η οποία μπορεί να διαταράξει την έκφραση ακόμη και άλλων γειτονικών γονιδίων. Ο δεύτερος έλεγχος που ασκείται από τη μεθυλίωση, αφορά τις πιθανές αλλαγές στη δομή του γονιδιώματος εξαιτίας μετάθεσης και έκτοπου ανασυνδυασμού. Η απώλεια της μεθυλίωσης, ή η μεταβολή των επιπέδων της, θεωρείται αρκετή για να κινητοποιηθούν τα τρανσποζόνια και να οδηγήσουν δυνητικά σε αρνητικές επιδράσεις στον εκάστοτε οργανισμό (Kato et al., 2003, Tahilliani et al., 2009).

Επιπροσθέτως, επιγενετική βάση έχει και το γονιδιωματικό εντύπωμα το οποίο λαμβάνει χώρα σε φυτά με ανάλογες διαδικασίες με αυτές των θηλαστικών. Εντοπίζεται σε συγκεκριμένους τύπους ιστών ή κατά τη διάρκεια αναπτυξιακών σταδίων τα οποία παίζουν κρίσιμο ρόλο στην εξέλιξη ενός οργανισμού (Tollefsbol et al., 2011).

Τις αλλαγές της μεθυλίωσης στα διάφορα αναπτυξιακά στάδια της ελιάς και σε διαφορετικούς ιστούς της σκόπευε να εξετάσει η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία. Αρχικά, συλλέχθηκαν πληροφορίες για δύο γονίδια τα οποία παρουσιάζουν διαφορετικά επίπεδα έκφρασης στη διάρκεια του έτους και τα οποία εκφράζονται σε διαφορετικούς ιστούς. Το TEMPRANILLO είναι ένας καταστολέας της άνθισης ο οποίος εντοπίζεται σε υψηλά επίπεδα έκφρασης κατά τη νεανική (βλαστική) φάση της ελιάς. Η anthocyanidin synthase εκφράζεται στους καρπούς της ελιάς και η έκφρασή της κορυφώνεται με την ωρίμανση του καρπού της ελιάς.

Η διερεύνηση της μεθυλίωσης αυτών των γονιδίων είχε σχεδιαστεί να γίνει με χρήση sodium bisulfite. Αυτή η πειραματική πορεία δεν ακολουθήθηκε γιατί τα δείγματα δεν έδιναν υψηλές συγκεντρώσεις DNA κατά την απομόνωση. Επιπλέον, ενώ οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για τα γονίδια προσδένονταν στα κατάλληλα σημεία για την ενίσχυσή τους, δεν ήταν εκφυλισμένοι και κατ' επέκταση κατάλληλοι για δείγματα που είχαν δεχθεί τη δράση sodium bisulfite. Τέλος η ακολουθία των γονιδίων ήταν μεγάλη και θα απαιτούνταν η χρήση πολλών εκφυλισμένων εκκινητών.

Η διερεύνηση της μεθυλίωσης της ελιάς στα διάφορα αναπτυξιακά στάδιά της και σε διαφορετικούς ιστούς της αποφασίστηκε να γίνει με την αξιοποίηση της ανάλυσης κατά Southern. Στα πλαίσια αυτής της τεχνικής, το γονίδιο 5S rRNA επιλέχθηκε για το ρόλο του ανιχνευτή καθώς έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν για το σκοπό αυτό σε διάφορα φυτικά είδη (Flavell, 1980).

Το 5S rRNA είναι μία από τις εξαιρέσεις του γενικού κανόνα που υποστηρίζει ότι όσο περισσότερο μεθυλιωμένη είναι η περιοχή της γονιδιακής ρύθμισης, τόσο πιο πιθανή είναι η ρύθμιση της γονιδιακής δραστηριότητας προς τα κάτω και το αντίστροφο, (Tollefsbol, 2011). Το γονίδιο του 5S rRNA σε αρκετά φυτικά γονιδιώματα (αραβόσιτος, φασόλι, λινάρι) έχει βρεθεί ότι παραμένει λειτουργικό παρά το υψηλό ποσοστό μεθυλίωσής του (Mathieu et al., 2002).

Πρόκειται για ένα γονίδιο το οποίο συναντάται σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς σε επαναλήψεις τοποθετημένες σε σειρά. Οι επαναλαμβανόμενες αυτές μονάδες του 5S rRNA αποτελούνται από μία κωδική αλληλουχία 120bp κατά μέσο όρο, η οποία παρουσιάζεται πολύ συντηρημένη και μία μη κωδική αλληλουχία ποικίλου μεγέθους, η οποία δεν είναι συντηρημένη. Η ακολουθία του γονιδίου 5S rRNA χρησιμοποιείται ως δείκτης μεθυλίωσης του γονιδιώματος της *Arabidopsis thaliana* (Μαργαριτοπούλου, 2012) καθώς και άλλων ευκαρυωτικών οργανισμών γιατί υπάρχει σε πολλαπλές επαναλήψεις εντός των γονιδιωμάτων και είναι πλούσια η αλληλουχία του σε CG (κυτοσίνη-γουανίνη) (Campell et al., 1992, Cox et al., 1992, Cloix et al., 2001, Szymanski et al., 2016, Locati et al., 2017).

Σε πολλά γονιδιώματα διαφορετικών οργανισμών έχουν εντοπιστεί διαφορετικοί τύποι του 5S rRNA γονιδίου. Στην περίπτωση του σιταριού και συγκεκριμένα της ποικιλίας Chinese Spring, εντοπίστηκαν δύο διαφορετικοί τύποι του γονιδίου 5S rRNA οι οποίοι διαφέρουν ως προς το μέγεθός τους περίπου κατά 80 νουκλεοτίδια (410bp ο ένας και 500bp ο άλλος). Οι διαφορές στο μέγεθος των δύο τύπων του 5S εντοπίζονται τόσο εντός της κωδικής αλληλουχίας του γονιδίου όσο και στη μη κωδική περιοχή αυτού.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των Gerlach & Dyer (1980), η κωδική αλληλουχία του μικρότερου τύπου 5S rRNA, είχε μέγεθος 120bp και εμφάνιζε ετερογένεια στις θέσεις 1, 24, 28, 37 και 95. Η κωδική αλληλουχία του μεγαλύτερου τύπου 5S rRNA, διέφερε γιατί έχει μία άμεση επανάληψη στη σειρά 15bp στις θέσεις 60-75 του γονιδίου, έχει δηλαδή μεγαλύτερου μεγέθους κωδική αλληλουχία (135bp). Δεν βρέθηκε κάποιο προϊόν μεταγραφής μεγέθους 135bp, οπότε και προέκυψε το συμπέρασμα ότι ο τύπος που περιλαμβάνει την επανάληψη στη σειρά των 15 βάσεων, δεν είναι λειτουργικός. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύθηκε από τη γνώση ότι ακόμη και μετάλλαξη ενός μόνο νουκλεοτιδίου μπορεί να καταστήσει μία τέτοια μονάδα

επανάληψης μη λειτουργική (Gerlach & Dyer, 1980). Ακόμη μία διαφορά των δύο τύπων του 5S rRNA εντοπίζεται στις θέσεις 36, 96 και 120 των κωδικών αλληλουχιών τους (υπάρχουν διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία τους). Ο μικρότερου μεγέθους τύπος εμφάνισε υψηλή ομολογία στη μη κωδική περιοχή του (περίπου 292bp) όπως αυτό προέκυψε από διαφορετικά αντίγραφα του. Η αλληλούχιση της μη κωδικής περιοχής του μεγάλου τύπου 5S (381bp) συνέβαλε στον εντοπισμό των διαφορών μεταξύ των μη κωδικών περιοχών των δύο τύπων. Εντοπίστηκαν διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία τους καθώς και διαφορά 89bp στο μέγεθός τους.

Το μέγεθος των μονάδων επανάληψης των rDNAs (18S, 25S, 5.8S, 5S) ποικίλει τόσο μεταξύ ειδών όσο και εντός αυτών. Στο σιτάρι αυτές οι μονάδες έχουν κατά κύριο λόγο συνολικό μήκος περί τις 8.8kbp ενώ ένα μικρό ποσοστό τους έχει συνολικό μήκος περί τις 9kbp. Οι αντίστοιχες μονάδες του κριθαριού έχουν συνολικό μήκος περί τις 9 και 10kbp αντιστοίχως. Η διαφορά αυτού του μεγέθους εντοπίστηκε στη μη κωδική αλληλουχία που παρεμβάλλεται μεταξύ των μονάδων επανάληψης των γονιδίων. Συμπερασματικά, η μη κωδική αλληλουχία μεταξύ των μονάδων επανάληψης των rDNA γονιδίων (συμπεριλαμβανομένου και του 5S rRNA) όσο και ο αριθμός των επαναλήψεών του στα ανώτερα φυτά ποικίλει τόσο ανάμεσα στα είδη όσο και εντός αυτών (Flavell, 1980).

Τα στοιχεία από το NCBI για την αλληλούχιση της ελιάς αφορούν την άγρια ελιά. Η αλληλούχιση αυτή όμως δεν είναι πλήρης και πιθανότατα δεν έχει γίνει κάποιος έλεγχος σχετικά με την ακεραιότητα των επαναλαμβανόμενων μονάδων αυτής (στα οποία συγκαταλέγονται και οι επαναλήψεις στη σειρά του 5S). Αντίστοιχα, τα δεδομένα της 5SRNAdb αφορούν την ελιά αλλά όχι την ποικιλία Κορωνέικη η οποία μελετήθηκε στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Στα πλαίσια της βιοπληροφορικής ανάλυσης δεν είναι γνωστός ο αριθμός αντιγράφων του 5S rRNA στην ελιά (BLAST ανάλυση για το γονιδίωμα της αγριελιάς).

Στην παρούσα μελέτη επιλέχθηκαν τρία δείγματα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων και διαφορετικών ιστών για μελέτη της μεθυλίωσης στην ελιά. Τα δείγματα αυτά ήταν το 29 –νεαρά φύλλα-, το 54 –πράσινοι καρποί- και το 60 –καρποί σε στάδιο έναρξης αλλαγής του χρώματος του φλοιού τους (Πίνακας 2.1). Η απομόνωση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο CTAB μετά από τροποποιήσεις σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Murray & Thompson (1980) και έγιναν πέψεις με τα ένζυμα

περιορισμού ClaI, MspI και HpaII. Εν συνεχεία, έγινε ηλεκτροφόρηση των αντιδράσεων πέψης, ανάλυση των προϊόντων κατά Southern και ακολούθησε ο υβριδισμός. Για τον υβριδισμό χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής το γονίδιο 5S rRNA ο οποίος ενισχύθηκε με PCR με εκκινητές που σχεδιάστηκαν για το γονίδιο 5S της ελιάς. Για το σχεδιασμό του ζεύγους εκκινητών αξιοποιήθηκαν πληροφορίες τόσο από την βάση δεδομένων 5SrRNAdb όσο και από τη βάση δεδομένων NCBI. Οι εκκινητές που προέκυψαν είναι οι 5S-rDNAFOe και 5S-rDNARoe οι οποίοι με PCR ενισχύουν τμήμα του DNA με μέγεθος 305bp. Η σήμανση του ανιχνευτή (5S rRNA) και η ανίχνευση του σήματος της υβριδοποίησης έγινε σύμφωνα με το Dig High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Cat. No. 11 585 614 910) της Roche.

Η πέψη με το ένζυμο περιορισμού ClaI δεν έδωσε ζώνη υβριδισμού αλλά ένα σήμα αχνό με μορφή διάχυτης θολής σκίασης στο δείγμα 54 –πράσινος καρπός- (Εικόνα 3.2). Έρευνα στην πιο πρόσφατη δημοσιευμένη σύνθεση του γονιδιώματος της ελιάς (Εικόνα 3.10) εντόπισε μόνο σε δύο περιπτώσεις την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου πριν ή μετά από σημεία πρόσδεσης του ανιχνευτή.

Πέψη 2h με το ένζυμο περιορισμού MspI έδωσε τρεις ορατές ζώνες υβριδισμού, μία για κάθε δείγμα (29, 54 και 60). Οι οποίες ζώνες υβριδισμού ισαπέχουν από τα πηγαδάκια φόρτωσής τους (Εικόνα 3.6). Πέψη των δειγμάτων 29 και 60 μετά από 16h (overnight) έδωσε επίσης μία ζώνη υβριδισμού για το κάθε δείγμα και σε αυτή την περίπτωση οι ζώνες υβριδισμού ισαπέχουν από τα πηγαδάκια φόρτωσής τους (Εικόνα 2.9).

Πέψη 16h (overnight) με το ένζυμο περιορισμού HpaII σε δύο δείγματα έδωσε μία ζώνη υβριδισμού για το κάθε ένα (29 και 60). Οι ζώνες υβριδισμού ισαπέχουν από τα πηγαδάκια φόρτωσής τους (Εικόνα 3.9).

Συγκρίνοντας την απόσταση των ζωνών υβριδισμού από τα πηγαδάκια φόρτωσης των αντίστοιχων δειγμάτων τους με την απόσταση που διάνυσε το 1kb ladder, υπολογίστηκε το μέγεθος των ζωνών υβριδισμού που εντοπίστηκαν το οποίο κυμαίνεται στα 390bp. Το μέγεθος του ανιχνευτή 5S rRNA που σχεδιάστηκε για την ελιά έχει μέγεθος 305bp. Η κωδική περιοχή του γονιδίου έχει μέγεθος 123bp οπότε το τμήμα της μη μεταγραφόμενης περιοχής του ανιχνευτή έχει μέγεθος 182bp -121bp προηγούνται της κωδικής αλληλουχίας και 61bp έπονται αυτής,

συμπεριλαμβανομένων και των εκκινητών. Υπολογίζεται ότι η μπάντα η οποία ανιχνεύθηκε είναι μεγαλύτερη από τον ανιχνευτή κατά 85bp.

Στην παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη ανιχνεύθηκε συνολικά μη μεταγραφόμενη περιοχή του 5S rRNA μεγέθους περίπου 267bp μεταξύ των μη μεθυλιωμένων σημείων αναγνώρισης των ενζύμων MspI και HpaII. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Southern των δύο ενζύμων περιορισμού (με την παρουσία μίας μόνο ζώνης υβριδισμού) δεν βρέθηκε μεθυλίωση στην αλληλουχία CCGG.

Προτείνεται αλληλούχιση του 5S rRNA τόσο στη μεταγραφόμενη όσο και στη μη μεταγραφόμενη ακολουθία του σε δείγματα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων και ιστών της ελιάς. Αυτό θα εμπλουτίσει την γνώση πάνω στη μη μεταγραφόμενη ακολουθία του γονιδίου στην ελιά. Επιπλέον, θα διευκολύνει τον έλεγχο της μεθυλίωσης των αλληλουχιών με τη σύγχρονη και ακριβείας μέθοδο sodium bisulfite. Επιπροσθέτως, προτείνεται διερεύνηση της μεθυλίωσης στα γονίδια TEMPRANILLO στα στάδια βλάστησης και άνθισης καθώς και στους αντίστοιχους ιστούς των σταδίων αυτών (νεαρά φύλλα, κλειστά άνθη, ανθοταξίες) και anthocyanidin synthase στα διάφορα στάδια ωρίμανσης του καρπού (καρπόδεση-πλήρης ωρίμανση του καρπού) με χρήση του sodium bisulfite για πιο ακριβή αποτελέσματα.

4.2 Γενικά συμπεράσματα

- ✓ Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση του 5S rRNA στην ελιά (5S-rDNAFOe & 5S-rDNAROe) δούλεψαν ενισχύοντας τμήμα DNA μεγέθους 305bp.
- ✓ Πέψη με το ένζυμο περιορισμού ClaI δεν έδωσε ευδιάκριτη ζώνη υβριδισμού αλλά μία διάχυτη θολή σκίαση. Η αλληλουχία που αναγνωρίζει το ένζυμο περιορισμού ClaI (5'-AT^{*}CGAT-3' / 3'-TAGC^{*}TA-5') πιθανόν να μην εντοπίζεται εκατέρωθεν των σημείων πρόσδεσης του ανιχνευτή.
- ✓ BLAST ανάλυση του ανιχνευτή στην πιο πρόσφατη δημοσιευμένη σύνθεση του γονιδιώματος της ελιάς, με διερεύνηση των αλληλουχιών που προηγούνται και έπονται των σημείων πρόσδεσής του εντόπισε μόνο σε δύο περιπτώσεις την αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου ClaI πριν ή μετά από σημεία πρόσδεσης του ανιχνευτή.
- ✓ Πέψεις με το ένζυμο περιορισμού MspI όπως και με το ισοχιζομερές του HpaII, έδωσαν μία ζώνη υβριδισμού ίδιου μεγέθους για το κάθε δείγμα (διαφορετικού ιστού και διαφορετικού αναπτυξιακού σταδίου).

- ✓ Το μέγεθος των ζωνών υβριδισμού υπολογίστηκε περίπου στις 390bp.
- ✓ Η ζώνη υβριδισμού είναι περίπου κατά 85bp μεγαλύτερη από τον ανιχνευτή.
- ✓ Η συνολικά ανιχνεύσιμη μη μεταγραφόμενη περιοχή του 5S rRNA μεταξύ των σημείων αναγνώρισης των ενζύμων MspI και HpaII είναι μεγέθους περί τις 267bp.
- ✓ Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Southern των δύο ενζύμων περιορισμού (με την παρουσία μίας μόνο ζώνης υβριδισμού) δεν βρέθηκε μεθυλίωση στην αλληλουχία CCGG.
- ✓ Προτείνεται αλληλούχιση του 5S rRNA τόσο στη μεταγραφόμενη όσο και στη μη μεταγραφόμενη ακολουθία του σε δείγματα διαφορετικών αναπτυξιακών σταδίων και ιστών της ελιάς για εμπλουτισμό της γνώσης της μη μεταγραφόμενης ακολουθίας του γονιδίου στην ελιά η οποία θα διευκολύνει τον έλεγχο της μεθυλίωσής των αλληλουχιών με τη σύγχρονη και ακριβείας μέθοδο sodium bisulfite.
- ✓ Προτείνεται διερεύνηση της μεθυλίωσης στα γονίδια TEMPRANILLO στα στάδια βλάστησης και άνθισης καθώς και στους αντίστοιχους ιστούς των σταδίων αυτών (νεαρά φύλλα, κλειστά άνθη, ανθοταξίες) και anthocyanidin synthase στα διάφορα στάδια ωρίμανσης του καρπού (καρπόδεση-πλήρης ωρίμανση του καρπού) με χρήση του sodium bisulfite για πιο ακριβή αποτελέσματα.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ξένη βιβλιογραφία

- Albers, E., Sbroggio, M., Martin-Gonzalez, J., Avram, A., Munk, S., Lopez-Contreras, A.J., 2017, “A simple DNA recombination screening method by RT-PCR as an alternative to Southern blot”, *Transgenic Res.*, Vol. 26, pages 429-434.
- Aljabani, S.M., Martinez, I., 1997, “Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No., 22, pages 4642-4693.
- Aquino de Muro, M., Rapley, R., 2002, “Gene Probes, Principles and Protocols”, *Methods in Molecular Biology*, HUMANA PRESS, Vol. 179, chapter 2 (Probr Design, Production and Applications).
- Barghini, E., Mascagni, F., Natali, L., Giordani, T., 2017, “Identification and characterization of Short Interspersed Nuclear Elements in the olive tree (*Olea europaea* L.) genome”, *Mol. Genet. Genomics*, Vol. 292, pages 53-61.
- Barghini, E., Natali, L., Cossu, R.M., Giordani, T., Pindo, M., Cattonaro, F., Scalabrin, S., Velasco, R., Morgante, M., Cavallini, A., 2014, “The Peculiar Landscape of Repetitive Sequences in the Olive (*Olea europaea* L.) Genome”, *Genome Biol. Evol.*, Vol. 6, No. 4, pages 776-791.
- Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L., Atlas, R.M., 1990, “Detection of Coliform Bacteria in Water by Polymerase Chain Reaction and Gene Probes”, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 56, No. 2, pages 307-314.
- Bitonti, M.B., Cozza, R., Chiappetta, A., Giannino, D., Castiglione, M.R., Dewitte, W., Mariotti, D., Onckelen, H.V., Innocenti, A.M., 2002, “Distinct nuclear organization, DNA methylation pattern and cytokinin distribution mark juvenile, juvenile-like and adult vegetative apical meristems in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch)”, *Journal of Experimental Botany*, Vol. 53, No. 371, pages 1047-1054.
- Brown, T., 1993, “Hybridization Analysis of DNA Blots”, *Current Protocols in Immunology*, Supplement Vol. 6, pages 10.6.13-10.6.27.
- Brown, T.A., 1994, “DNA sequencing the basics”, Oxford University Press, Chapters 1, 2, 3, 4.
- Brown, T., 1999, “Analysis of DNA sequences by blotting and hybridization”, *Current Protocols in Molecular Biology*, pages 2.9.1-2.9.20.

- Campell, B.R., Song, Y., Posch, T.E., Cullis, C.A., Town, C.D., 1992, “Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*”, *Gene*, Vol. 112, pages 225-228.
- Camps, G., 1974, “Lea cirilisations prehistoriques d’ Afrique du Nord et du Sahara”, Paris, Doin, pages 51 and 90.
- Chong, S., Whitelaw, E., 2004, “Epigenetic germline inheritance”, *Curr Opin Genet. Dev.*, Vol. 14, pages 692-6.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pallegriani, M., Jacobsen, S.E., 2008, “Shotgun bisulfite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning”, *Nature*, Vol. 452, No. 7184, pages 215-219.
- Cox, A.V., Bennett, M.D., Dyer, T.A., 1992, “Use of the polymerase chain reaction to detect spacer size heterogeneity in plant 5S-rRNA gene clusters in wheat (*Triticum aestivum* L.)”, *Theor. Appl. Genet.*, Vol. 83, pages 684-690.
- Crouse, J., Amorese, D., 1987, “Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate”, *FOCUS*, Technical Services, Bethesda Research Laboratories, Vol. 9, No. 2, pages 3-4.
- Damania, A.B., 1995, “Olive, the plant of peace, reigns throughout Mediterranean”, *Diversity* Vol. 11, pages 131-132.
- De Candolle, G., 1880, “Sur l’ origin des especes cultivees”, Paris.
- Doerfler, W., Bohm, P., 2006, “DNA Methylation Basic Mechanisms”, Springer.
- Eifert, J.D., Curtis, P.A., Bazaco, M.C., Meinersmann, R.J., Berrang, M.E., Kernadle, S., Stam, C., Jaykus, L.A., Kathariou, S., 2005, “Molecular Characterization of *Listeria monocytogenes* of the Serotype 4b Complex (4b, 4d, 4e) from Two Turkey Processing Plants”, *Foodborne Pathogenes and Disease*, Vol. 2, No. 3, pages 192-200.
- Ferrante, A., Hunter, D.A., Reid, M.S., 2004, “Towards a molecular strategy for improving harvesting of olives (*Olea europaea* L.)”, *Postharvest Biology and Technology*, Vol. 31, pages 111-117.
- Flavell, R., 1980, “The molecular characterization and organization of plant chromosomal DNA sequences”, *Annual Reviews Plant Physiology*, Volume 31, pages 569-573.

- Fisher, T., 1904, “Der Oelbaum”, Pettermans Mittelugen, Ergänzungscheft Nt Vol. 147, pages 4-60.
- Friedrih, W.L., Velitzelos, E., 1986, “Bemerkungen zur sptquartaren flora von Santorin (Griecheland)”, Cour. Forsch. Inst., Frankfurt am Main, Senckenberg, Vol. 86, pages 387-395.
- Fojtova, M., Kovarik, A., Matyasek, R., 2001, “Cytosine methylation of plastid genome in higher plants. Fact or artefact?”, Plant Science, Vol. 160, pages 585-593.
- Fulnecek, J., Kovarik, A., 2014, “How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles?” BMC Genet. Vol. 15, No. 2.
- Gerlach, W.L., Dyer, T.A., 1980, “Sequence organization of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes”, Nucleic Acids Research, Vol. 8, No. 21, pages 4851-4866.
- Griffin, H.G., Griffin, A.M., 1994, “PCR technology current innovations”, CRC Press, Chapters 2, 21, 22 & pages 194-200 & 221-224.
- Green, P.S., 2002, “Aversion of Olea L. (Oleaceae)”, Kew Bulletin 57, pg 91-140.
- Hasbun. R., Valledor, L., Santamaria, E., Canal, M.J., Rodriguez, R., Berdasco, M., 20017, “Dynamics of DNA Methylation in Chestnut Trees Development”, Acta horticulturae, Spain.
- Herman, J.G., Graff, J.R., Myohanen, S., Nelkin, B.D., Baylin, S.B, 1996, “Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands”, Nat. Acad. Sci., Vol. 93, No. 18, pages 9821-9826.
- Huh, J.H., Bauer, M.J., Hsieh, T.F., Fischer, R.L., 2008, “Cellular programming of plant gene imprinting”, Cell, Vol. 132, pages 735-744.
- Jin, B., Li, Y., Robertson, K.D., 2011, “DNA Methylation: Superior or Subordinate in the Epigenetic Hierarchy”, Genes & Cancer, Vol.2, No. 6, pages 607-617.
- Kato, M., Miura, A., Bender, J., Jacobsen, S.E., Kakutani, T., 2003, “Role of CG and Non-CG Methylation in Immobilization of Transposons in Arabidopsis”, Current Biology, Vol. 13, pages 421-426.
- Katsiotis, A., Hagidimitriou, M., Douka, A., Hatzopoulos, P., 1998, “Genomic organization, sequence interrelationship, and physical localization using in situ hybridization of two tandemly repeated DNA sequences in the genes *Olea*”, Genome, Vol. 41, pages 527-534.

- Kavarik, A., Koukalova, B., Bezdek, M., Opatrny, z., 1997, “Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci response to osmotic stress”, *Theor. Appl. Genet.*, Vol. 95, pages 301-3069.
- Kriaucionis, S., Heintz, N., 2009, “The nuclear DNA base, 5-hydroxymethylcytosine is present in brain and enriched in Purkinje neurons”, *Science*, Vol. 324, pages 929-930.
- Kumar S., Cheng X., Klimasauskas S., Mi S., Posfai J., Roberts R.J., Wilson G.G., 1994, “The DNA (cytosine-5) methyltransferases”, *Nucleic Acids Res*, Vol. 22, pages 1–10.
- Kurdyukov, S., Bullock, M., 2016, “DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method”, *Biology*, Vol. 5, No. 3.
- Laird, P.W., 2010, “Principles and challenges of genomewide DNA methylation analysis”, *Nat. Rev. Genet.*, Vol. 11, pages 191-203.
- Lamke, J., Baurle, I., 2017, “Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants”, *Genome Biology*, Vol. 18, pages 124-135.
- Liu, I., Li, Y., Tollefsbol, T.O., 2008, “Gene-environment interactions and epigenetic basis of human diseases”, *Curr Issues Mol. Biol.*, Vol. 10, pages 25-36.
- Lister, R., Ecker, J.R., 2009, “Finding the fifth base: Genome-wide sequencing of cytosine methylation”, *Genome Research*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Locati, M.D., Pagano, J.F.B., Ensink, W.A., van Olst, M., van Leeuwen, S., Nehrdich, U., Zhu, K., Spaink, H.P., Girard, G., Rauwenda, H., Jonker, M.J., Dekker, R.J., Breit, T.M., 2017, “Linking maternal and somatic 5S rRNA types with different sequence-specific non-LTR retrotransposons”, *RNA*, Vol. 23, pages 446-456.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., et al., 2000, “Molecular Cell Biology, DNA Cloning with Plasmid Vectors”, 4th Edition, New York, W.H. Freeman, Section 7-1.
- Matthews, C., van Holde, K.E., Ahem, K.G., 1999, “Biochemistry 3rd Edition”, Addison Wesley Publishing, pages 977.
- McClelland, M., Nelson, M., Rasche, E., 1994, “Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 22, No. 17, pages 3640-3659.

- Meissner, A., Mikkelsen, T.S., Gu, H., Werning, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Jaffe, D.B., Gnirke, A., Jaenisch, R., Lander, E.S., 2008, “Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells”, *Nature*, Vol. 454, pages 766-771.
- Moore, T., 2018, “Southern Analysis Using Methyl-Sensitive Restriction Enzymes, Genomic Imprinting, Methods in Molecular Biology”, Vol. 181, pages 193-203.
- Murray, M.G., Thompson, W.F., 1980, “Rapid isolation of high molecular weight plasmid DNA”, *Nucleic Acids Research*, pages 4321-4325.
- Niederhuth, C.E., Schmitz, R.J., 2013, “Covering Your Bases: Inheritance of DNA Methylation in Plant Genomes”, *Molecular Plant*, pages 472-480.
- Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J. H., Ballinger, T., Henikoff, S., Fischer, R.L., 2007, “DNA methylation in the Arabidopsis genome”, *PNAS*, Vol. 104, pages 6752-6757.
- Ponce, M.R., Micol, J.L., 1992, “PCR amplification of long DNA fragments”, Oxford University Press, *Nucleic Acid Research*, Vol. 20, No. 3, pages 623.
- Rashtchian, A., 1995, “Novel methods for cloning and engineering genes using the polymerase chain reaction”, Life Technologies Inc., Gaithersburg, *Current Opinion in Biotechnology*, Vol. 6, pages 30-36.
- Reed, K.C., Mann, D.A., 1985, “Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 13, No. 20, pages 7207-7221.
- Reinders, J., Wulff, B.B.H., Mirouze, M., Mari-Ordonez, A., Dapp, M., Rozhon, W., Bucher, E., Theiler, G., Paszkowski, J., 2015, “Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic Arabidopsis epigenomes”, *Genes & Development*, Vol. 23, pages 939-950.
- Rubio de Casas, R., Balaguer, L., Manrique, E., Perez-Corona, M.E., Vargas P., 2002, “On the historical presence of the wild olive *Olea europaea* L. var. *sylvestris* (Miller) Leh. In the Eurosiberian North of the Iberian Peninsula”, *Anales de Jardin Botanico*, Vol. 59, pages 342-344.
- Sgamma, T., Jackson, A., Muleo, R., Thomas, B., Massiah, A., 2014, “TEMPRANILLO is a regulator of juvenility in plants”, *Scientific Reports*, Vol. 4, pages 1-11.

- Solanas, M., Escrich, E., 1997, “An improved protocol to increase sensitivity of Southern blot using dig-labeled DNA probes”, *J. Biochem. Biophys. Methods*, Vol. 35, pages 153-159.
- Song, L., James, S.R., Kazini, L., Karpf, A.R., 2005, “Specific Method for the Determination of Genomic DNA Methylation by Liquid Chromatography Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry”, *Anal. Chem.*, Vol. 77, No. 2, pages 504-510.
- Southern, E., 2006, “Southern Blotting”, *Nature Protocols*, Vol. 1, No. 2, pages 518-525.
- Srinivasan, P.R., Borek, e., 1964, “DNA modification mechanisms and gene activity during development”, *Science*, Vol. 187, pages 226-232.
- Tahilliani, M., Koh, K.P., Shen, Y., Pastor, W.A., Bandukwala, H., Brudno, Y., Agarwal, S., Iyer, L.M., Liu, D.R., Aravind, L., Rao, A., 2009, “Conversion of 5-Methylcytosine to 5-Hydroxymethylcytosine in Mammalian DNA by MLL Partner TET1”, *Science*, Vol. 324, pages 930-935.
- Tarik, M., Ramakrishnan, L., Sachev, H.S., Tandon, N., Roy, A., Bhargana, S.K., Pandey, R.M., 2018, “Validation of quantitative polymerase chain reaction with Southern blot method for telomere length analysis”, *Future Science OA*,
- Tollefsbol, T., 2011, “Handbook of Epigenetics: The New Molecular and Medical Genetics”, London, UK, Burlington, USA, San Diego, USA, chapter 1.
- Unver, T., Wu, Z., Sterck, L., Turktas, M., Lohaus, R., Li, Z., Yang, M., He, L., Deng, T., Eccalante, F.J., Liorens, C., Roig, F.J., Parmaksiz, I., Dundar, E., Xie, F., Zhang, B., Ipek, A., Uranbey, S., Erayaman, M., Ilhan, E., Badad, O., Ghazai., H., Lightfoot, D.A., Kasarla, P., Colantonio, V., Tombuloglu, H., Hernadez, P., Mete, N., Cetin, O., Van Montagu, M., Yang, H., Gao, Q., Dorado, G., Van de Peer, Yves, 2017, “Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis”, *PNAS, Plant Biology*, pages 1-10.
- Waalwijk, C., Flavell, R.A., 1978, “MspI, an isoschizomer of HpaII which cleaves both Unmethylated and methylated HpaII sites”, *Nucleic Acids Research*, Vol. 5, No. 9, pages 3231-3236.
- Waddington, C.H., 1942, “The epigenotype”, *Endeavour*, Vol. 1, pages 18-20.
- Walder, R.Y., Langtimm, C.J., Chstterjee, R., Walder, J.A., 1983, “Cloning of th MspI Modification Enzyme: The site of modification and its effects on cleavage by

MspI and HpaII”, The Journal of Biological Chemistry, Vol. 258, No. 2, pages 1235-1241.

- Wegnez, M., Monier, R., 1972, “Sequence heterogeneity of 5S RNA in *Xenopus laevis*”, FEBS LETTERS, Vol. 25, No. 1, pages 13-20.
- Yaish, M.W., Peng, M., Rohtstein, S.J., 2014, “Global DNA methylation analysis using methyl-sensitive amplification polymorphism (MSAP)”, Methods Mol. Biol., Vol. 1062, pages 285-298.
- Zhang, H., Tang, K., Wang, B., Duan, C.G., Lang, Z., Zhu, J.K., 2014, “Protocol: a beginner’s guide to the analysis of RNA-directed DNA methylation in plants”, Plant Methods, Vol. 10, pages 18.

Ελληνική βιβλιογραφία

- Βασιλακάκης, Μ., 2016, “Γενική και Ειδική Δενδροκομία”, Εκδόσεις Άγι-Σάββα, Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, Ελλάς, EU, σελίδες 290-292, 1085-1137.
- Θεριός, Ι.Ν., 2005, “Ελαιοκομία”, Εκδόσεις Γαρταγάνη, Θεσσαλονίκη, Ελλάς, Ε.Ε. (Α έκδοση 2005, επανέκδοση 2006), Κεφάλαια 1,2 & 3, σελίδες 40, 155-158, 162, 164, 166, 172-173 & 175-176.
- Μαργαριτοπούλου, Θ., 2012, “Η δυναμική των HSP90 στον έλεγχο της ανάπτυξης στα φυτά”, Διδακτορική διατριβή, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας.
- Μολφέτας, Σ., Λεωνίδας, Ε., Ball, E., 1994, “Βιολογία, Ένα ταξίδι στη ζωή: Γενετική, 2 Το γενετικό υλικό και η έκφρασή του”, Εκδόσεις Καστανιώτη, Αθήνα, σελίδες 100-102.
- Νικολάου, Χ., 2015, “Υπολογιστική Βιολογία”, Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Ηλεκτρονική μορφή, σελίδες 409-411.
- Πελεκάνος, Μ., Russell, P.J., 2002-2013, “iGenetics, μία μεντελική προσέγγιση”, Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα & ΣΙΑ Ο.Ε., Κεφάλαια 1, 4, 6, 10, 11, 16 & σελίδες 1163-1164.
- Ποντίκης, Κ.Α., 2000, “Ειδική Δενδροκομία, Ελαιοκομία”, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα, Κεφάλαια 1, 2, 3, 4, 7 & σελίδες 39-41, 81, 86, 104, 106 & 108.
- Στεφανάκη-Νικηφοράκη, Μ., 1999, “Συστηματική Βοτανική”, Εκδόσεις Σταμούλης, Αθήνα.

- Τσουμάνη, Κ., Ματθιόπουλος, Κ., 2014, “Εργαστηριακός Οδηγός Μοριακής Βιολογίας ΙΙΙ”, Τμήμα Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.
- Φανουράκης, Ν., 2002, “Γενετική βελτίωση φυτών, βασικές αρχές”, Εκδόσεις Ίων-Στέλλα Παρίκου, Κεφάλαια 2, 6, 11.
- Χατζηαντωνίου, Α.Ε., 2004, “Βιολογία, η μελέτη της ζωής”, Εκδόσεις Σταμούλης, Κεφάλαια 10, 11, 12 & σελίδες 58-60.
- Χατζόπουλος, Π., 2001, “Βιοτεχνολογία Φυτών”, Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ & Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Αθήνα, Κεφάλαιο 1.
- Ψυχογιού, Α., 2007, “Εκτός η ακαρπία από το ΠΣΕΑ”, Εφημερίδα Πρώτη.

Διαδίκτυο

- <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>
- https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002742605.1/
- <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- <https://international.neb.com/products/restriction-endonucleases/hf-nicking-master-mix-time-saver-other/time-saver-qualified-restriction-enzymes/time-saver-qualified-restriction-enzymes>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Διαλύματα απομόνωσης DNA και ηλεκτροφόρησης

Extraction CTAB buffer solution: 0.1M Tris pH 8, CTAB 2%, 1,4M NaCl, 20mM Na₂EDTA.

CTAB precipitation solution: 0.5% CTAB, 40mM NaCl.

NaCl solution: 1,2M

TAE 50X: 24.2gr (w/v) Tris-base, 100ml, 0.5M EDTA pH8 (Ethylene-Diamine-Tetracetic Acid disodium salt), 57ml CH₃COOH για 1lt ρυθμιστικού διαλύματος.

Ethidium Bromide (EtBr): 10mg/ml H₂O. Αποθήκευση σε σκοτεινό μπουκάλι σε θερμοκρασία δωματίου.

Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης για πηκτή αгарόζης: 1X TAE, 0,5μg/ml EtBr.

Διάλυμα χρωστικής για ηλεκτροφόρηση DNA: 1X βασικού διαλύματος χρωστικών (10X) που περιέχει 1.25% (w/v) bromophenol blue και 1.25% (w/v) xylene cyanol σε dH₂O, 50% σουκρόζη.

Διαλύματα για Southern

Διάλυμα αποδιάταξης: 1.5M NaCl, 0.5M NaOH.

Διάλυμα ουδετεροποίησης: 1.5M NaCl, 0.5M Tris-HCl pH7.5.

20xSSC: 3M NaCl, 0.3M Sodium citrate.

0.4M NaOH: 8gr NaOH σε 500ml ddH₂O.

0.25N HCl: 8,55ml HCl 37% (11.7N) σε 500ml ddH₂O.

Λιαλύματα υβριδισμού

1M NaP για 1000ml: 71gr Na₂HPO₄ ή 88gr Na₂HPO₄·2H₂O ή 134gr Na₂HPO₄·7H₂O, 4ml 85% H₃PO₄.

10% BSA: 10gr BSA σε 100ml ddH₂O.

Church διάλυμα υβριδισμού για 20ml: 7ml 20%SDS, 10ml 1M NaP, 2ml 10% BSA, 1ml ddH₂O, 40μl 0.5M EDTA.

5%SDS: 40mM NaP, 5%SDS, 1mM EDTA.

1%SDS: 40mM NaP, 1%SDS, 1mM EDTA.

Λιαλύματα σήμανσης

Washing buffer: 0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl, pH 7.5 (20°C), 0.3% (v/v) Tween 20.

Maleic acid buffer: 0.1M Maleic acid, 0.15M NaCl, adjust with NaOH (solid), pH 7.5 (20°C).

Detection buffer: 0.1M Tris-HCl, 0.1M NaCl, pH 9.5 (20°C).