



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

Ε.Μ.Σ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ  
ΤΜΗΜΑ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

*« Ισχύεπαγόμενη αποσιώπηση (VIGS) του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης της  
ελαιορουπαίνης σε φυτά ελιάς »*

*Μεταπτυχιακή Διατριβή  
Επιβλέπων Καθηγητής: κ. Πολυδεύκης Χατζόπουλος  
Ε. Ζευγίτη Αθήνα 2018*

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**Π.Μ.Σ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**« Ίική επαγόμενη αποσιώπηση (VIGS) του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης της  
ελαιορουπαΐνης σε φυτά ελιάς »**

**E.Ζευγίτη**

**Αθήνα 2018**

**Επιβλέπων Καθηγητής κ. Πολυδεύκης Χατζόπουλος**

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ: ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**Π.Μ.Σ ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ**  
**ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**

**Μεταπτυχιακή Διατριβή**

**« Ίική επαγόμενη αποσιώπηση (VIGS) του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης της  
ελαιορουπαΐνης σε φυτά ελιάς »**

**E.Ζευγίτη**

**Αθήνα 2018**

**Επιβλέπων Καθηγητής κ. Πολυδεύκης Χατζόπουλος**

**Μέλη Συμβουλευτικής και Εξεταστικής επιτροπής:**

**Πολυδεύκης Χατζόπουλος, Καθηγητής (Επιβλέπων)**

**Άννα Κούρτη, Αν. Καθηγήτρια (Μέλος)**

**Δήμητρα Μηλιώνη, Αν. Καθηγήτρια (Μέλος)**

## Περίληψη

Την τελευταία δεκαετία, έχει αποδειχθεί ότι πολλά από τα υγιεινά συστατικά που συνιστούν την μεσογειακή διατροφή, εντοπίζονται σε τροφές όπως οι ελιές και το ελαιόλαδο. Ερευνητές από ποικίλους τομείς έχουν επικεντρώσει το ενδιαφέρον τους σε αυτή την καλλιέργεια για να εξετάσουν τα εξειδικευμένα μεταβολικά μονοπάτια και τα συστατικά τους που είναι ωφέλιμα για τον άνθρωπο. Πιθανώς οι πιο ελπιδοφόροι δευτερογενείς μεταβολίτες είναι τα ολεοσιδία. Οι ελιές (*Olea europaea* ssp. *Europaea*) παράγουν ασυνήθιστα σεκοϊριδοειδή (secoiridoids) τα οποία απαντώνται σχεδόν αποκλειστικά στα μέλη της οικογένειας Oleaceae. Σε αρκετές φαρμακευτικές μελέτες έχουν επισημανθεί τα πολυδύναμα και βιοδραστικά χαρακτηριστικά αυτών των ενώσεων. Λόγω της εξαιρετικά στενής ταξινομικής κατανομής τους, οι γνώσεις μας σχετικά με τους ενζυματικούς κόμβους που διέπουν τη βιομετατροπή των ελαιοσεκοϊριδοειδών είναι λιγοστές. Πρόσφατα εντοπίσαμε μια β-γλυκοσιδάση (OeGLU) η οποία δρα εξειδικευμένα για την απογλυκοζυλίωση της ελαιοευρωπαϊνης - το κυρίαρχο σεκοριδοειδές στην ελιά - που παράγει την βιοδραστική αμυντική άγλυκη μορφή της. Η αλληλούχηση διαφόρων γονιδιωμάτων αποκάλυψε ότι τα φυτά περιέχουν ένα μεγάλο σύνολο β-γλυκοσιδάσεων αποτελούμενου από έως και 40 μέλη. Ο πλήρης χαρακτηρισμός ενός γονιδίου θα πρέπει ιδανικά να συμπληρώνεται με γενετική ανάλυση, ωστόσο αυτή η προσέγγιση σε πολυετή είδη Oleaceae είναι εξαιρετικά δύσκολη. Για να ξεπεραστεί αυτό το μειονέκτημα, εφαρμόσαμε μια τεχνική αναστροφής γενετικής με χρήση συγκεκριμένων ιών φορέων με στόχο την σίγηση γονιδίων (μέθοδος VIGS) σε φυτά ελιάς. Η επιτυχής σίγηση του γονιδίου OeGLU επιβεβαιώθηκε με RT-PCR. Χρησιμοποιώντας ανάλυση HPLC για τη μέτρηση της σχετικής ενζυμικής δραστηριότητας μεταξύ φυτών που χειριστήκαμε με την μέθοδο VIGS και φυτών μαρτύρων, αποκαλύφθηκε ότι η OeGLU είναι αποκλειστικά υπεύθυνη για την απογλυκοζυλίωση της ελαιοευρωπαϊνης στο ελαιόδενδρο. Η προσέγγιση αυτή είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την αποσαφήνιση και το χαρακτηρισμό της πολύπλοκης βιοσυνθετικής οδού των secoiridoids στην οικογένεια των Oleaceae και συμβάλλει επίσης στην ανεύρεση και μετέπειτα παραγωγή ορισμένων ενδιαμέσων, ευεργετικών μεταβολιτών για την ανθρώπινη υγεία.

### **Επιστημονική περιοχή μελέτης**

Σίγηση γονιδίων-Ιική αποσιώπηση

### **Λέξεις κλειδιά**

Αποσιώπηση γονιδίων, ελαιοευρωπαϊνή, φυτά ελιάς, β-γλυκοσιδάση OeGLU, Vigs

# *Virus induced gene silencing (VIGS) of $\beta$ -glucosidase of oleuropein in olive trees.*

## Abstract

Over the last decade, many healthy constituents of the Mediterranean diet have been attributed to olives and olive oil. Researchers from diversified fields have focused their interest in this crop in order to unravel which specialized metabolic components and aspects are beneficial to humans. Probably the most promising secondary metabolites are oleosides. Olives (*Olea europaea* ssp. *europaea*) produce these unusual secoiridoids which are almost exclusively found in members of the Oleaceae family. Several pharmaceutical studies have highlighted the pluripotent and bioactive characteristics of these compounds. Due to their extremely narrow taxonomic distribution, our knowledge concerning the enzymatic hubs that govern the biotransformation of the olive secoiridoids is scarce. We have recently identified a  $\beta$ -glucosidase (*OeGLU*) that specifically deglycosylates oleuropein - the dominant secoiridoid in olive - producing the bioactive defensive aglycone form. Sequencing of various genomes has revealed that plants contain a large set of  $\beta$ -glucosidases consisting of up to 40 members. The complete characterization of a gene should ideally be complemented with genetic analysis, however this approach using the recalcitrant perennial Oleaceae species is extremely difficult. To overcome this drawback, we have introduced the Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) approach to the olive tree. Successful silencing of *OeGLU* was confirmed by RT-PCR. Using HPLC analysis to measure the relative enzymatic activity among silenced and wild type plants, revealed that *OeGLU* is solely responsible for the deglycosylation of oleuropein in the olive tree. This approach is a powerful tool to elucidate and characterize the complex secoiridoid biosynthetic pathway in the Oleaceae family, and to manipulate certain intermediates of the pathway *in planta* in order to increase the quantity of the most beneficial for human health.

## **Study area**

Virus induced gene silencing

## **Key words**

VIGS, oleuropein, *Olea europaea*,  $\beta$ -glucosidase *OeGLU*, gene silencing



Η εκπόνηση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας με θέμα «**Γική επαγόμενη αποσιώπηση (VIGS) του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης της ελαιορευρωπαΐνης σε φυτά ελιάς**» πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, στα πλαίσια ολοκλήρωσης του προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών με τίτλο Βιολογία Συστημάτων 2016-2017.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο για την καθοδήγηση και στήριξη του σε όλη την διάρκεια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, όπως και στην εκπόνηση της παρούσας ερευνητικής μελέτης, καθώς και τα υπόλοιπα μέλη της επιτροπής για την συμβολή και την υποστηριξή τους μέσα στο περιβάλλον του εργαστηρίου.

Πλέον σημαντικό κομμάτι στην ολοκλήρωση της εργασίας αυτής, αποτέλεσαν όλα τα μέλη του εργαστηρίου Μοριακής Βιολογίας, που πρόθυμα προσέφεραν την βοήθεια και τις γνώσεις τους όποτε τους ζητήθηκε από μεριάς μου.

Η ομάδα της ελιάς λειτούργησε και στην παρούσα εργασία για εμένα ως μια δυναμική «οικογένεια» με κοινό σκοπό την έρευνα σε νέες κατευθύνσεις και την απόκτηση ουσιαστικής γνώσης. Πέρα από την άψογη συνεργασία και την υπεύθυνη καθοδήγηση της υποψήφιας διδάκτορα Μαργαρίτας Θωμοπούλου, θα ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για όλη την συμπαράσταση και στήριξη που έλαβα εντός και εκτός της εργαστηριακής μας συνάντησης. Ιδιαίτερες ευχαριστίες και εκτίμηση για όλα τα εφόδια και την στήριξη οφείλω στον Κωνσταντίνο Κουδουνά, και στους φίλους-συνοδοιπόρους Γεώργιο Παπακώστα και Ελίζα Αγγελή.

Τέλος, στην οικογένεια μου, και στον πατέρα μου, που είναι στο πλευρό μου αδιάκοπα.

*Στην μητέρα μου*

# Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	11
1.1 Το δέντρο της ελιάς ( <i>Olea europaea</i> L.) .....	11
1.2 Το κυριότερο ολεοσίδιο της ελιάς, η ελαιουρωπαΐνη .....	12
1.2.1 Οι βιοδραστικές λειτουργίες της ελαιουρωπαΐνης .....	13
1.2.2 Η ελαιουρωπαΐνη ως αμυντικό στοιχείο του φυτού.....	15
1.2.3 Οι β-γλυκοσιδάσες ως αμυντικά ένζυμα- Στοιχεία για την OeGLU της ελιάς.....	16
1.3 Η β-γλυκοσιδάση OeGLU δρα εξειδικευμένα έναντι της ελαιουρωπαΐνης .....	17
1.4 Η μέθοδος αποσιώπησης γονιδίων VIGS (Virus Induced Gene Silencing).....	19
1.4.1 Η μέθοδος VIGS - μια λειτουργική γενετική προσέγγιση .....	19
1.4.2 Πλεονεκτήματα της μεθόδου VIGS.....	21
1.4.3 Ο TRV (Tobacco rattle virus) ιός ως φορέας για την εφαρμογή των VIGS .....	23
1.5 Στόχος πειράματος.....	24
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	26
2.1 Φυτικό υλικό .....	26
2.1.1 Καλλιέργεια σπόρων ελιάς.....	26
2.2 Βακτηριακά κύτταρα, Ιικοί φορείς και Μετασηματισμός.....	26
2.2.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων .....	27
2.2.2 Διαδικασία Agroinfiltration-Παροδικός μετασηματισμός φύλλων ελιάς <i>Olea europaea</i> .....	27



2.2.3 Λειοτριβίση ιστών ελιάς.....	28
2.3 Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA) .....	29
2.4 Ανάλυση Νουκλεϊκών Οξέων .....	30
2.4.1 Διαδικασία παρασκευής( gel ) πηκτής αγαρόζης .....	30
2.5 Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Νουκλεϊκών Οξέων .....	31
2.6 Μοριακοί Χειρισμοί .....	32
2.6.1 Dnase treatment/ Χειρισμός με Dnase .....	32
2.6.2 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase-Chain Reaction)/ Σύνθεση cDNA αλυσίδας .....	32
2.6.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης .....	34
2.6.4 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία .....	35
2.6.5 Ημι-ποσοτικό RT-PCR (semi-quantitative RT-PCR .....	35
2.6.6 Real -time Quantitative PCR (qPCR) .....	36
2.7 Χειρισμοί Πρωτεϊνών .....	37
2.7.1 Απομόνωση πρωτεϊνών.....	37
2.7.2 Ενζυμικές Αντιδράσεις .....	38
2.7.3 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford .....	38
2.7.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) .....	39
2.8 Διαλύματα.....	40
3.Αποτελέσματα .....	41
3.1 Φαινοτυπική παρατήρηση φυτών ελιάς VIGS .....	41

3.2	Μοριακοί χειρισμοί για το γονίδιο PDS.....	42
3.2.1	Απομόνωση RNA και χειρισμός με το ένζυμο DnaseI.....	42
3.2.2	Σύνθεση cDNA αλυσίδας και RT-PCR .....	43
3.2.3	Semi- Quantitative RT-PCR.....	44
3.2.4	Quantitative PCR.....	44
3.3	Μοριακοί χειρισμοί για το γονίδιο OeGLU .....	45
3.3.1	Απομόνωση RNA και καθαρισμός με το ένζυμο DNaseI.....	45
3.3.2	Σύνθεση cDNA αλυσίδας και RT-PCR .....	46
3.3.3	Semi- Quantitative RT-PCR.....	47
3.3.4	Quantitative PCR Analysis για το γονίδιο OeGLU .....	48
4.	Συζήτηση .....	50
5.	Βιβλιογραφία .....	54

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Το δέντρο της ελιάς (*Olea europaea* L.)

Δένδρο αιθαλής, η ελιά (ευρωπαϊκή *Olea europaea* L.) , ανήκει στην φυλή *Oleeae* και στην οικογένεια *Oleaceae*, που συνίσταται από 600 είδη και 25 γένη εκ των οποίων αναφέρονται χαρακτηριστικά τα *Forsythia*, *Fraxinus*, *Jasminum*, *Ligustrum*, *Olea* και *Syringa*. Τα δένδρα της οικογένειας *Oleaceae* που ευδοκιμούν σε αφθονία στην εύκρατη και τροπική Ασία, θεωρούνται υψηλής οικονομικής και αισθητικής σημασίας, τόσο για τα προϊόντα που αποκομίζονται, για τροφή, ξυλεία, καλλυντικά και εδώδιμο λάδι όσο και για την καλλωπιστική τους χρήση (Obied et al., 2008)

Αξιοσημείωτο αποτελεί το γεγονός ότι στην οικογένεια *Oleaceae*, το είδος *Olea europaea* L. είναι το μόνο που καλλιεργείται για παραγωγή ελαιολάδου και βρώσιμων ελιών με πάνω από 1000 ποικιλίες να περιλαμβάνονται στην οικογένεια αυτή, με 4 βασικά υποείδη, *O.europaea ssp europaea*, *O.europaea ssp laperrinei*, *O.europaea ssp cerasiformis*, *O.europaea ssp cuspidata*. (Obied et al., 2008)

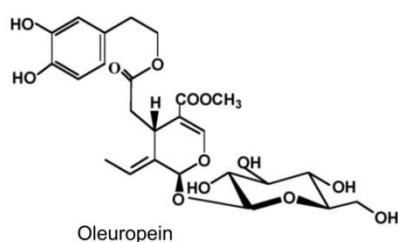
Βασικό χαρακτηριστικό της οικογένειας *Oleaceae*, αποτελεί από χημικής άποψης , η ύπαρξη βιοφαινολών και σεκοϊριδοειδών (secoiridoids) που απαντώνται μόνο στα είδη της συγκεκριμένης οικογένειας (Obied et al., 2008). Οι ενώσεις των σεκοϊριδοειδών προκύπτουν από τα ιριδοειδή, μετά από διάνοιξη του δακτυλίου του κυκλοπεντανίου των ιριδοειδών ενώσεων, με κύρια ενδιάμεση ένωση το δεοξυ-λογανικό οξύ (deoxyloganic acid). Το βιοσυνθετικό κομμάτι των σεκοϊριδοειδών μέχρι και το δεοξυ-λογανικό οξύ διαπιστώνεται ότι είναι κοινό μέσα στην οικογένεια *Oleaceae*, σε αντίθεση με την ύπαρξη τουλάχιστον 5 διακλαδώσεων έπειτα από το στάδιο αυτό μέχρι και την τελική σύνθεση των σεκοϊριδοειδών. Τα σεκοϊριδοειδή χαρακτηρίζονται από μια εξωκυκλική ενεργή ομάδα με 8,9-ολεφινικό δεσμό, και αποκαλούνται ολεοσιδικά σεκοϊριδοειδή ή ολεοσίδια, τα οποία παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς σχηματίζουν αρκετά φαινολικά προϊόντα σύζευξης, χαρακτηριστικό των φυτών της οικογένειας *Oleaceae* (Obied et al., 2008).

Τα κυρίαρχα ολεοσίδια στην ελιά είναι η ελαιοευρωπαϊνή (oleuropein) και το λιγκστροσίδιο (ligstroside) τα οποία είναι εστέρες ελενολικού οξέος με 2-(3,4-διϋδροξυφαινολ)-αιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) και 2-(4-υδροξυφαινολ)-αιθανόλη (τυροσόλη) αντίστοιχα.

Η ελαιοευρωπαϊνή εντοπίζεται εκτός από το γένος *Olea* και σε άλλα γένη της οικογένειας *Oleaceae* όπως στα *Fraxinus*, *Syringa*, *Ligustrum*, *Jasminum* και *Osmanthus* (Obied et al., 2008).

## 1.2 Το κυριότερο ολεοσίδιο της ελιάς, η ελαιοευρωπαϊνή

Η ελαιοευρωπαϊνή είναι ένας εστέρας του ελενολικού οξέος (elenolic acid) μαζί με 3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη (υδροξυτυροσόλη) (3,4-dihydroxyphenylethanol (hydroxytyrosol) με προτεινόμενη πρόδρομη ένωση ένα άλλο ολεοσίδιο, το λιγκστροσίδιο (Damtoft et al., 1993, Riachy et al., 2011). Η ελαιοευρωπαϊνή ήταν το πρώτο ολεοσίδιο που ανακαλύφθηκε και μελετήθηκε εκτενώς (Panizzi et al., 1960). Η ελαιοευρωπαϊνή ανιχνεύεται σε ιστούς όπως φύλλα, κορμό και ρίζες αλλά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση εντοπίζεται σε νεαρούς καρπούς που μπορεί να ξεπεράσει και το 14% του ξηρού τους βάρους (Amiot et al., 1986). Καθώς ο καρπός ωριμάζει η συγκέντρωση της ελαιοευρωπαϊνής μειώνεται σε πολύ χαμηλά επίπεδα, όπου δύσκολα ανιχνεύεται όταν ο καρπός είναι πλέον μαύρος.



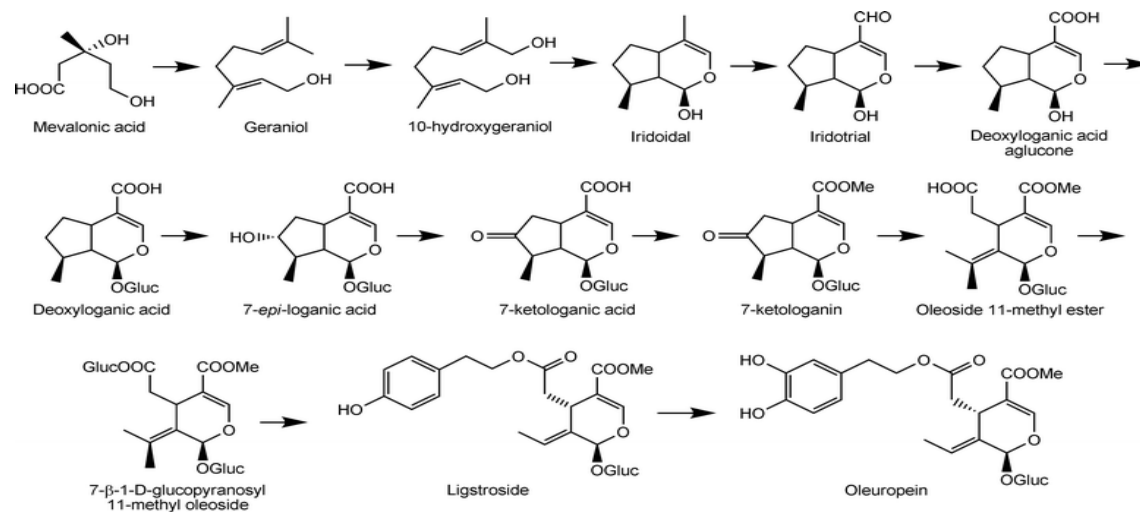
**Εικόνα 1.1:** Σχηματική απεικόνιση δομής ελαιοευρωπαϊνής

Η βιοσύνθεση, ο καταβολισμός όπως και η βιομετατροπή της ελαιοευρωπαϊνής κατά τα στάδια ανάπτυξης και ωρίμανσης των καρπών, δεν έχουν πλήρως διασαφηνιστεί ακόμη.

Στο παρθένο ελαιόλαδο και στα παραπροϊόντα των ελαιοτριβείων εμφανίζονται ουσίες όπως η 3,4-DHPEA-EDA που μαρτυρά την χημική ή ενζυματική αποδόμηση των ολεοσιδίων. Αποδεκτά μονοπάτια καταδεικνύουν ότι λόγω δράσης εστερασών, αυξάνεται η συγκέντρωση της απομεθυλοελαιοευρωπαϊνής (demethyloleuropein) και του γλυκοσιδίου του ελενολικού οξέος, με ταυτόχρονη μείωση της ελαιοευρωπαϊνής σαν αποτέλεσμα της υδρόλυσης της. (Gutierrez-Rosales et al., 2010).

Μια ακόμη αποδεκτή προσέγγιση για τον καταβολισμό της ελαιοευρωπαϊνής είναι η δράση εξειδικευμένης β-γλυκοσιδάσης, και παραγωγή της άγλυκης μορφής της (3,4-DHPEA-EA)

(Obied et al., 2008). Πρόσφατα χαρακτηρίστηκε η εξειδικευμένη **β-γλυκοσιδάση (OeGLU)**, που υδρολύει την ελαιοευρωπαϊνή στην ελιά (*O. europaea*) (Koudounas et al., 2015).



**Εικόνα 1.2:** Προτεινόμενο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ολευρωπαϊνής στην οικογένεια Oleaceae (Obied et al., 2008).

### 1.2.1 Οι βιοδραστικές λειτουργίες της ελαιοευρωπαϊνής

Σύμφωνα με επιστημονικές μελέτες, η δράση της ελαιοευρωπαϊνής και των παραγώγων της έχουν αξιοσημείωτη φαρμακευτική εφαρμογή σε ποικίλους- ιδιαίτερα σημαντικούς για την ανθρώπινη υγεία, τομείς.

Η χαρακτηριστική πικρή γεύση των πράσινων, ακόμα ανώριμων, ελιών οφείλεται στην ελαιοευρωπαϊνή. Τα ευεργετικά στοιχεία που διαθέτει το άγλυκο μόριο της ελαιοευρωπαϊνής και τα παράγωγα της, που αποτελούν την κύρια πηγή πολυφαινόλων στο παρθένο ελαιόλαδο, την καθιστούν ως ένα ισχυρό αντιοξειδωτικό, αντι-φλεγμονώδες, αντι-μικροβιακό, αντι-καρκινικό συστατικό που προσδίδει νευροπροστατευτική δράση σε συνδυασμό με πολλές άλλες φαρμακευτικές ιδιότητες που ενισχύουν την ανθρώπινη υγεία (Bulotta et al., 2013).



### 1.2.2 Η ελαιοευρωπαϊνή ως αμυντικό στοιχείο του φυτού

Τα φυτά με σκοπό να αμυνθούν έναντι φυτοφάγων και άλλων μικροοργανισμών –εχθρών τους, και προσπαθώντας να προσαρμοστούν σε αβιοτικούς παράγοντες που μπορεί να τους προκαλούν κάποιου είδους στρες, συνθέτουν δευτερογενείς μεταβολίτες (glucosides). Πολλές από αυτές τις ενώσεις άμυνας είναι αποθηκευμένες σε μη ενεργές γλυκοζυλιωμένες μορφές στις περισσότερες περιπτώσεις, στο *χυμοτόπιο*, προστατεύοντας έτσι το ίδιο το φυτό από τις τοξικές μορφές τους και τις επιπτώσεις που επιφέρουν, (Jones and Vogt, 2001) και ενεργοποιούνται μόνο όταν έρθουν σε επαφή και απογλυκοζυλιωθούν από τα κατάλληλα ένζυμα, σε περιπτώσεις όπως επίθεση από παθογόνους οργανισμούς ή έντομα που διαταράσσουν το φυτικό κύτταρο. Για την απογλυκοζυλίωση της ελαιοευρωπαϊνης είναι γνωστό ότι ευθύνεται μια εξειδικευμένη β-γλυκοσιδάση στην ελιά –**OeGLU**(Koudounas et al.,2015). Οι β-γλυκοσιδάσες σε άθικτο φυτικό κύτταρο αποθηκεύονται σε διαφορετικά μέρη του κυττάρου κυρίως σε πλαστίδια και αποπλάστες, απομακρυσμένα από τα αντίστοιχα υποστρώματα που υδρολύουν, με στόχο την σταθερότητα του συστήματος. Πρώτη φορά η αμυντική δράση της ουσίας περιγράφηκε στην αγριομυρτιά (*Ligustrum obtusifolium*) από τους Konno et al το 1999 υποστηρίζοντας ότι η ουσία βρίσκεται αποθηκευμένη στα χυμοτόπια των κυττάρων του δέντρου σε γλυκοζυλιωμένη μορφή, και είναι φυσικά διαχωρισμένη από μια ενδογενής β-γλυκοσιδάση που έχει την ικανότητα να απομακρύνει μέσω υδρόλυσης, την γλυκόζη της ελαιοευρωπαϊνης. Όμως ύστερα από καταστροφή του ιστού από οποιαδήποτε αιτία, η διαμερισματοποίηση ενζύμου και μορίου καταστρέφεται με αποτέλεσμα να έρχονται σε επαφή. Η μετατροπή της ελαιοευρωπαϊνης σε άγλυκο, την μετατρέπει σε ένα ισχυρό μόριο με δομή γλουταραλδεΐδης, με αποτέλεσμα την δημιουργία συσσωμάτων και μετουσίωσης των γύρω πρωτεϊνών (Lo Scalzo et al., 1994, Konno et al., 1999).

*Συνεπώς ο μηχανισμός αυτός, είναι ένα δυναμικό σύστημα άμυνας των φυτών που αποτελείται από ξεχωριστά διαμερισματοποιημένα αδρανή συστατικά ,που όταν έρθουν σε άμεση επαφή παρέχουν άμεση απόκριση έναντι παθογόνων. ( Morant et al., 2008).*

Η αμυντική δράση της ελαιοευρωπαϊνης έχει αποδειχθεί μέσω αναστολής της ανάπτυξης βακτηρίων όπως τα *Lactobacillus plantarum* και *Leuconostoc mesenteroides* (Marsilio and Lanza, 1998, Ruiz-Barba et al., 1991), καθώς και έναντι μύκητων που ανήκουν στο γένος *Phytophthora* (Del Rio et al., 2000), και στον μύκητα *Verticillium dahliae* (Baidez et al., 2007).

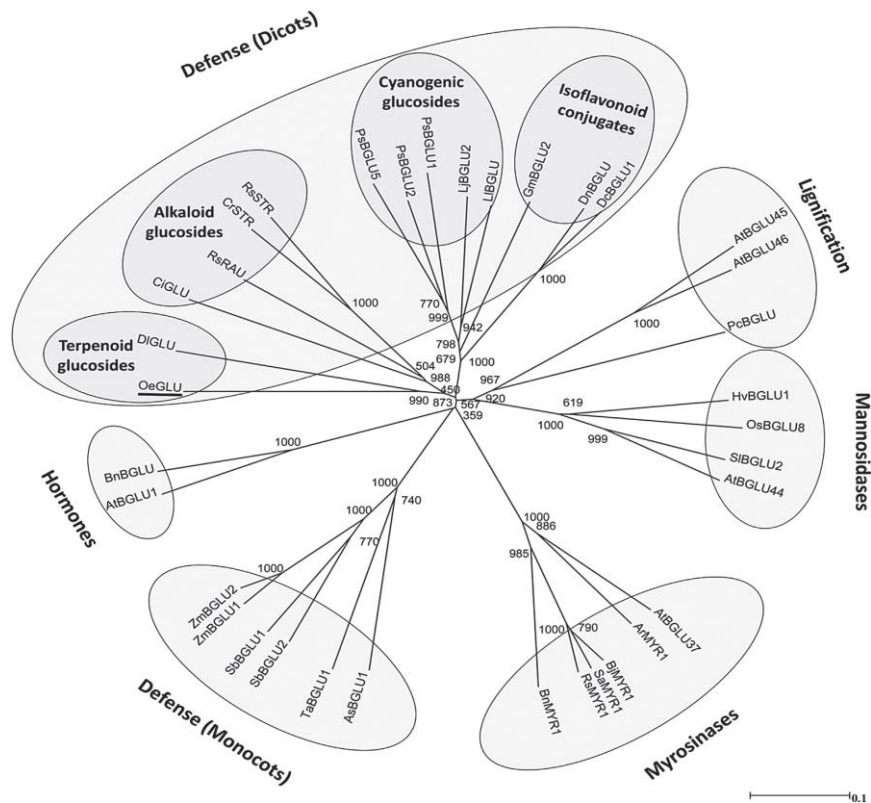
### 1.2.3 Στοιχεία για την αμυντική β-γλυκοσιδάση, OeGLU της ελιάς

Οι β-γλυκοσιδάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν γλυκοσιδικούς δεσμούς μεταξύ τμημάτων υδατανθράκων και ενός τμήματος άγλυκου προκειμένου να απελευθερώσουν υπολείμματα μη αναγωγικών γλυκοσιλίων από ολιγοσακχαρίτες και γλυκοζίτες. Ύστερα από εκτενή μελέτη των ενζύμων αυτών, δημιουργήθηκε ένα σύστημα κατηγοριοποίησης των υδρολασών (Henrissat, 1991, Henrissat and Davies, 1997, Cantarel et al., 2009), που επέτρεψε την ομαδοποίηση και ταξινόμηση των γλυκο-υδρολασών (Glycoside Hydrolases GHs) με βάση μεγάλες αμινοξικές ομοιότητες και συντηρημένες αμινοξικές περιοχές-μοτίβα, σε 135 οικογένειες (GH1-135), και 14 φυλές (GH-A --- GH-N) οι οποίες διακρίνονται με βάση την ύπαρξη δομικών ομοιοτήτων κοντά στο ενεργό κέντρο και συντηρημένων καταλυτικών αμινοξέων. (Henrissat and Davies, 1997 and Cantarel et al., 2009) Η φυλή στην οποία κατατάσσονται οι περισσότερες οικογένειες, είναι η GH-A, με **πολυπληθέστερη οικογένεια την GH1** (εξώ-1,4-βγλυκανάσες) με μέλη της να εμπλέκονται στην άμυνα ,την σηματοδότηση και τον μεταβολισμό συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος.

Η β-γλυκοσιδάση που φαίνεται να λειτουργεί σύμφωνα με το δυαδικό σύστημα άμυνας και να απογλύκοζυλιώνει την ελαιευρωπαϊνή της ελιάς είναι η OeGLU (Koudounas et al., 2015).

Το cDNA της β-γλυκοσιδάσης OeGLU αποτελείται από 1656 ζεύγη βάσεων και κωδικοποιεί για 551 αμινοξέα. Το μέγεθος της πρωτεΐνης υπολογίζεται στα 62,9 kDa με ισοηλεκτρικό σημείο (pI) 6.3. Με την χρήση BLAST πάνω σε γονιδιωματική αλληλουχία που καταχωρήθηκε πρόσφατα στο GenBank από την ποικιλία Ayvalik (accession no: KF623043.1) βρέθηκε ότι το γονίδιο έχει 10 εξώνια και 9 ιντρόνια. Μέσα από πολλαπλή στοίχιση της αμινοξικής ακολουθίας της OeGLU με ήδη χαρακτηρισμένες β-γλυκοσιδάσες της **GH1 οικογένειας**, κατασκευάστηκε ένα φυλογενετικό δένδρο που ομαδοποίησε γνωστές β-γλυκοσιδάσες σύμφωνα με τις λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται και την εξειδίκευσή τους σε υποστρώματα. Η OeGLU κατατάσσεται στις αμυντικές β-γλυκοσιδάσες των δικοτυλήδων φυτών (Εικ. 1.8) που υδρολύουν τερπενοειδή γλυκοσίδια. (Koudounas et al.,2015)





Εικόνα 1.4: Φυλογενετικό δένδρο β-γλυκοσιδάσων (Koudounas et al., 2015).

### 1.3 Η β-γλυκοσιδάση OeGLU δρα εξειδικευμένα έναντι της ελαιοευρωπαϊνης

Για να εξακριβωθεί η εξειδικευμένη δράση της β-γλυκοσιδάσης OeGLU για την απογλυκοζύλιωση της ελαιοευρωπαϊνης στην ελιά, πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραματικών διαδικασιών από τις οποίες προέκυψαν τα εξής στοιχεία:

1. Πραγματοποιήθηκε ετερόλογη έκφραση του γονιδίου OeGLU στο φυτό *Nicotiana benthamiana* με την πρωτεΐνη να ανοσοανιχνεύεται στα ~63kDa. Με ανάλυση HPLC ανιχνεύθηκε ότι ο καταβολισμός της ολευρωπαϊνης είναι 70% τα πρώτα δέκα λεπτά ενώ μετά από 30 λεπτά δεν ανιχνεύεται καθόλου το γλυκοσίδιο, επιβεβαιώνοντας έτσι ότι η OeGLU κωδικοποιεί την συγκεκριμένη β-γλυκοσιδάση που καταβολίζει ειδικά την ολευρωπαϊνη (Koudounas et al., 2015).

2. Αποδείχθηκε, επίσης, ότι ύστερα από την δράση της OeGLU, το άγλυκο της ολευρωπαίνης λειτουργεί σαν ένα μόριο γλουταραλδεϋδης που δημιουργεί ισχυρή μαζική συμπλοκοποίηση πρωτεϊνών (protein cross-linking activity) (Konno et al., 1999). Επιπρόσθετα για να επιβεβαιωθεί η ιδιότητα αυτή in vitro, πραγματοποιήθηκε μια EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) ανάλυση με πρωτεΐνη αναφοράς το BSA. Με ενζυμική αντίδραση από πρωτεϊνικά εκχυλίσματα φύλλων καπνού με την ανασυνδυασμένη OeGLU, φάνηκε ότι το BSA σχηματίζει συσσωματώματα υψηλού μοριακού βάρους αποδεικνύοντας ότι όταν υδρολύεται από την OeGLU η ολευρωπαΐνη μετατρέπεται σε έναν ισχυρό cross-linking παράγοντα.
3. Διαπιστώθηκε επίσης ότι, η γονιδιακή έκφραση της OeGLU παρουσιάζει διακυμάνσεις ανάλογα το στάδιο ανάπτυξης του καρπού και τον τύπο κυττάρου/ιστού που εξετάζουμε, με κύρια σημεία έκφρασης του γονιδίου τους ανθήρες, τις ωοθήκες και τέλος στους ανθοφόρους οφθαλμούς όπου και ανιχνεύεται σε υψηλότερα επίπεδα (Malik and Bradford, 2006). Πιο συγκεκριμένα, τα επίπεδα έκφρασης της OeGLU αυξάνονται όταν ο καρπός αρχίζει να ωριμάζει και διατηρείται σε υψηλά επίπεδα, όταν γίνει πια μαύρος, σε αντίθεση με την συγκέντρωση της ολευρωπαΐνης στα αντίστοιχα στάδια ωρίμανσης, γεγονός που καταδεικνύει την μαζική υδρόλυση της από την OeGLU. (Bianco et al., 1993 & Riachy et al., 2011)
4. Για την περαιτέρω εξακρίβωση της μοναδικότητας της δράσης της OeGLU, σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε μια πειραματική προσέγγιση ανάστροφης γενετικής, με σκοπό την αποσιώπηση του γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης στην ελιά (OeGLU) με την μέθοδο των VIGS (Virus Induced Gene Silencing). Πραγματοποιήθηκαν κατασκευές γονιδίων με χρήση των πλασμιδιακών φορέων που φέρουν τμηματικά τον ιό TRV, pTRV1/pTRV2-construct με σκοπό να επιτευχθεί αποσιώπηση στα γονίδια OeGLU και OePDS, OeChLH που αποτελούν και τους θετικούς μάρτυρες της διαδικασίας (Ελίσαβεν Αγγελή, 2018). Με την μέθοδο της αγροέγχυσης, ενέθηκαν οι κατασκευές σε νεαρά φυτά ελιάς ανά σταθερό χρονικό διάστημα (~15 ημέρες). Οι πρώτες φαινοτυπικές ενδείξεις ήταν αρκετά ενθαρρυντικές, συνεπώς στην παρούσα εργασία έγινε ενδεδειγμένη μοριακή ανάλυση και επεξεργασία, των συγκεκριμένων φυτών ελιάς (VIGS), για την διαπίστωση της πιθανής επιτυχούς αποσιώπησης του γονιδίου- στόχου OeGLU και ενός γονιδίου μάρτυρα OePDS.

## 1.4 Η μέθοδος αποσιώπησης γονιδίων VIGS (Virus Induced Gene Silencing)

Η μέθοδος των VIGS είναι ένα εργαλείο κλασσικής και ανάστροφης γενετικής στα φυτά, που εφαρμόζεται αποτελεσματικά για την μελέτη της λειτουργίας γονιδίων, και την ταυτοποίηση του ρόλου τους σε σημαντικές φυτικές διεργασίες. Η πρώτη επιτυχής αναφορά εφαρμογής της μεθόδου, αφορά την αποσιώπηση του γονιδίου **PDS** (Phytoene Desaturase) στο φυτό του καπνού *N.benthamiana*.(Kumagai et al.,1995) (Lindbo et al.,1993) Η μετέπειτα εξέλιξη της μεθόδου με τη χρήση συγκεκριμένων ικών φορέων, ( Ruiz et al.,1998) και την βελτιστοποίησή τους, μετέτρεψαν την τεχνική ευκολότερα εφαρμόσιμη. (Dinesh-Kumar et al., 2003)

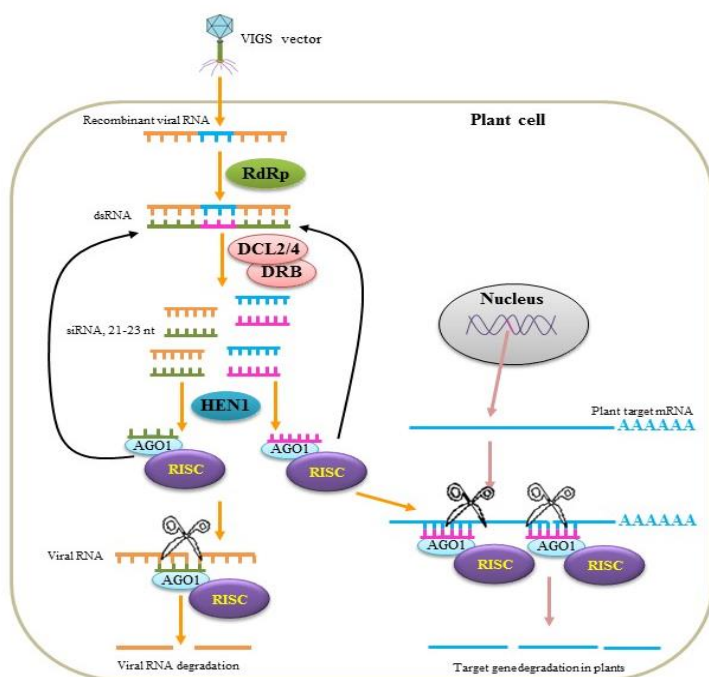
### 1.4.1 Η μέθοδος VIGS - μια λειτουργική γενετική προσέγγιση

Κατά την εφαρμογή της μεθοδολογίας των VIGS εμπλέκονται τρία σημαντικά επίπεδα για την ορθή εξέλιξη της μεθόδου: αρχικά, απαιτείται επεξεργασία του γενετικού υλικού των ιών που θα χρησιμοποιηθούν, ώστε να εμπεριέχουν τμήμα του γονιδίου -στόχου που πρόκειται να αποσιωπηθεί, επιμόλυνση των κατάλληλων φυτικών οργανισμών με τον τροποποιημένο ιο, και αποσιώπηση του γονιδίου- στόχου ως αποτέλεσμα του αμυντικού μηχανισμού του φυτού έναντι της ιικής προσβολής. (Senthil-Kumar et al.,2008) & (Burch-Smith et al.,2004) Η ιδέα της τεχνικής των VIGS εμπνεύσθηκε από την παρατήρηση της κυτοπλασματικής δραστηριότητας των φυτικών κυττάρων, όπου ξένα-ικά RNA εντοπίζονται, και αποδομούνται. ( Lindbo et al., 1993)

Αν και ο μηχανισμός των VIGS μελετάται διαρκώς, από τις πειραματικές προσπάθειες που έχουν γίνει και τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει, έχει αποσαφηνιστεί σε μεγάλο βαθμό η πορεία απόκρισης του φυτικού κυττάρου, στην επιμόλυνση με κατασκευές γονιδίων-στόχων (DNA-RNA) κατά την μέθοδο VIGS. ( Jones et al.,1998) (Robertson, D. 2004) (Alvarado ,Scholthof et al., 2009)

Πιο συγκεκριμένα, η μέθοδος VIGS είναι μια μετα-μεταγραφική τεχνική γονιδιακής σίγησης, (Lu, R. et al., 2003)που όπως αναφέρθηκε, φυσικό σκοπό έχει να προστατεύσει τα φυτικά κύτταρα από ξένα –ικά γονιδιώματα, εισβολείς. ( Waterhouse et al.,2001) Κατά τον διπλασιασμό του γενετικού υλικού των ιών, σχηματίζονται δίκλινα RNA μόρια (dsRNA) τα οποία ενισχύονται από RNA πολυμεράσες (RDR1, RDR2,RDR6) (Lu, R. et al.,2003) . Ένα από τα σημαντικότερα στοιχεία καθόλη την διαδικασία που εξετάζουμε είναι η δράση του ενζύμου Dicer (DCL4) ώστε να διασπαστούν τμήματα των dsRNA και να παραχθούν τα siRNA.( Lu, R. et al.,2003& Waterhouse et al.,2001) Τα μικρά αυτά μόρια RNA (μεγέθους 21-23nt) προσδένονται και ενεργοποιούν το σύμπλοκο RISC (RNA- induced silencing complex) και της πρωτεΐνης AGO1, το οποίο ανιχνεύει και κόβει στοχευμένα RNA/DNA

ακολουθίες βάση ομολογίας (Waterhouse et al., 2001),( Qu, F. et al., 2001),( Llave et al.,2010). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ιικών siRNA- συμπλόκου ενζύμων AGO1 και της στοχευμένης αλληλουχίας (RNA), μπορεί να οδηγήσει σε ενδονουκλεολυτική αντίδραση και μεταγραφική παρεμπόδιση των αντίστοιχων RNAs (PTGS). (Εικόνα 1.5)



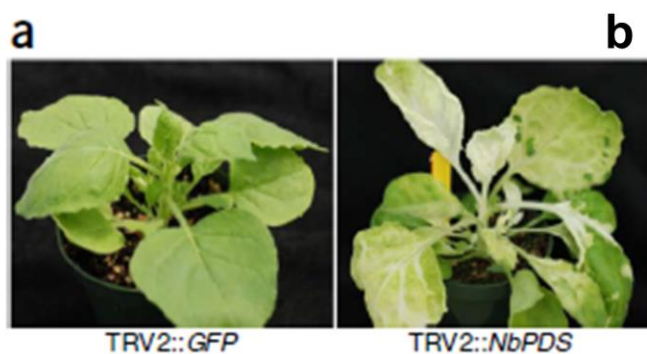
**Εικόνα 1.5:** Σχηματική απεικόνιση γονιδιακής σίγησης εντός φυτικού κυττάρου (Senthil-Kumar et al., 2014)

Αυτός ο αμυντικός μηχανισμός των φυτών για να προστατευτούν από ξένα ιικά γονιδιώματα χρησιμοποιήθηκε, λοιπόν, με σκοπό να επιτευχθεί η σίγηση ενδογενών γονιδίων στα φυτά. (Ruiz et al.,1998) Ένα τμήμα του γονιδίου -στόχου κλωνοποιείται σε ένα πλασμίδιο που περιέχει τον γενετικά τροποποιημένο ιό και με αγροέγχυση περνά στο φυτό. (Ruiz et al.,1998 & Baulcombe et al., 1999) Το τμήμα του γονιδίου που εισήχθη στον ιό πολλαπλασιάζεται μαζί με το γενετικό υλικό του ιού μέσα στο κύτταρο, και διασυστημικά μεταφέρεται μέσα στο φυτό. Όταν προκληθεί η απόκριση του φυτού και ξεκινήσει η διαδικασία PTGS όπως περιγράφηκε, θα παραχθούν siRNA ομόλογα του γονιδίου- στόχου, με αποτέλεσμα η αποσιώπηση να συμβεί για το γονίδιο που εμπεριέχεται στο ιό-φορέα.

#### 1.4.2 Εφαρμογή της μεθόδου TRV-VIGS στον καπνό *Nicotiana benthamiana*

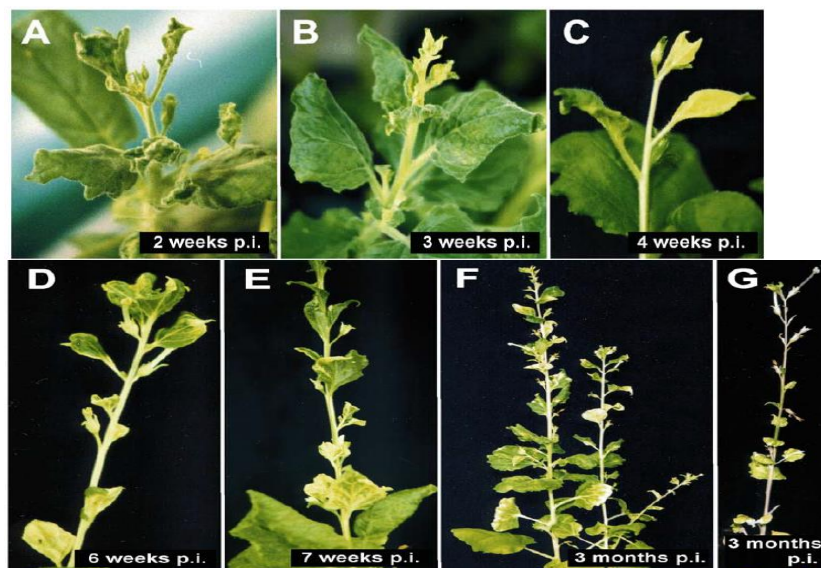
Η μέθοδος TRV-VIGS έχει εφαρμοστεί σε αρκετά είδη φυτικών οργανισμών. Συγκεκριμένα στο φυτό του καπνού *Nicotiana benthamiana*, το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε αποδείχθηκε αρκετά αποτελεσματικό με τσό τα φαινοτυπικά όσο και τα μοριακά δεδομένα να αποδεικνύουν την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου. Για το φυτό αυτό έχουμε στοιχεία από δημοσιευμένες εργασίες για την αποσιώπηση του γονιδίου PDS (Senthil-Kumar et al., 2014) και του γονιδίου ChLH. (Hiriart et al., 2002,2003)

Αποσιώπηση του γονιδίου PDS οδήγησε στην εμφάνιση λευκών φύλλων photobleaching σε φυτά καπνού TRV-VIGS όπως φαίνεται και στην εικόνα 1.6. Συγκεκριμένα, λόγω της μειωμένης έκφρασης του γονιδίου PDS (phytoene desaturation) επηρεάζεται ένα κρίσιμο στάδιο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των καροτενοειδών ( $\beta$ -carotene). (Qin et al., 2007)



**Εικόνα 1.6:** Εμφάνιση φαινομένου photobleaching σε φυτά καπνού που έχει γίνει σίγηση του γονιδίου PDS (εικόνα b). Στην εικόνα a) το φυτό control αντίθετα, δεν παρουσιάζει λευκά φύλλα (Senthil-Kumar et al., 2014)

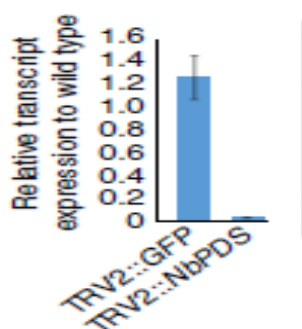
Αντίστοιχα, αποσιώπηση του γονιδίου ChlH με την τεχνική TRV-VIGS, διαπιστώθηκε ότι προκαλεί χλώρωση, με εμφανή κιτρίνισμα φύλλων καπνού. Η φαινοτυπική αυτή παρατήρηση, (yellow phenotype) προκύπτει από την επιτυχή σίγηση του γονιδίου ChlH που άμεσα εμπλέκεται στο βιοσυνθετικό μονοπάτι των χλωροφυλλών.



**Εικόνα 1.7:** Φαινοτυπική παρατήρηση κιτρινισμένων φύλλων καπνού *N.benthamiana*, μετά από εφαρμογή μεθόδου TRV-VIGS για την αποσιώπηση του γονιδίου ChlH. Στις εικόνες A,B,C το φυτό είναι ανεπτυγμένο στο στάδιο δυο, τριών και τεσσάρων εβδομάδων αντίστοιχα. Στις εικόνες D,E,F,G το φυτό αναπτύσσεται και παρατηρείται έως και το στάδιο των τριών μηνών ανάπτυξης. (Hiriart et al., 2003)

Για την επιβεβαίωση της επιτυχημένης αποσιώπησης των γονιδίων PDS, ChlH, σε συνδυασμό με τα πρώτα φαινοτυπικά δεδομένα, έγιναν μοριακοί χειρισμοί, όπως εφαρμόστηκαν και στην παρούσα ερευνητική εργασία. Αρχικά απομονώθηκε RNA από φυτικούς ιστούς VIGS, και με τεχνικές όπως semi-quantitative PCR, RT- qPCR, ελέγχθηκαν τα επίπεδα έκφρασης των προς σίγηση γονιδίων-στόχων στα φυτά VIGS.

Διαπιστώθηκε ότι σε ορισμένους φυτικούς ιστούς που χειρίστηκαν με την μέθοδο VIGS, υπήρξε μείωση των μεταγραφικών επιπέδων του γονιδίου-στόχου περίπου 90% όπως φαίνεται και στο διάγραμμα της εικόνας 1.8, γεγονός που αποδεικνύει πως η μέθοδος αποσιώπησης που εφαρμόστηκε, ήταν επιτυχημένη. Για τον υπολογισμό του ποσοστού μείωσης της έκφρασης του αποσιωπημένου γονιδίου, μετά από εφαρμογή της μεθόδου VIGS, λαμβάνεται υπόψη και η φύση και η λειτουργία του γονιδίου στόχου. (Senthil-Kumar et al., 2014)

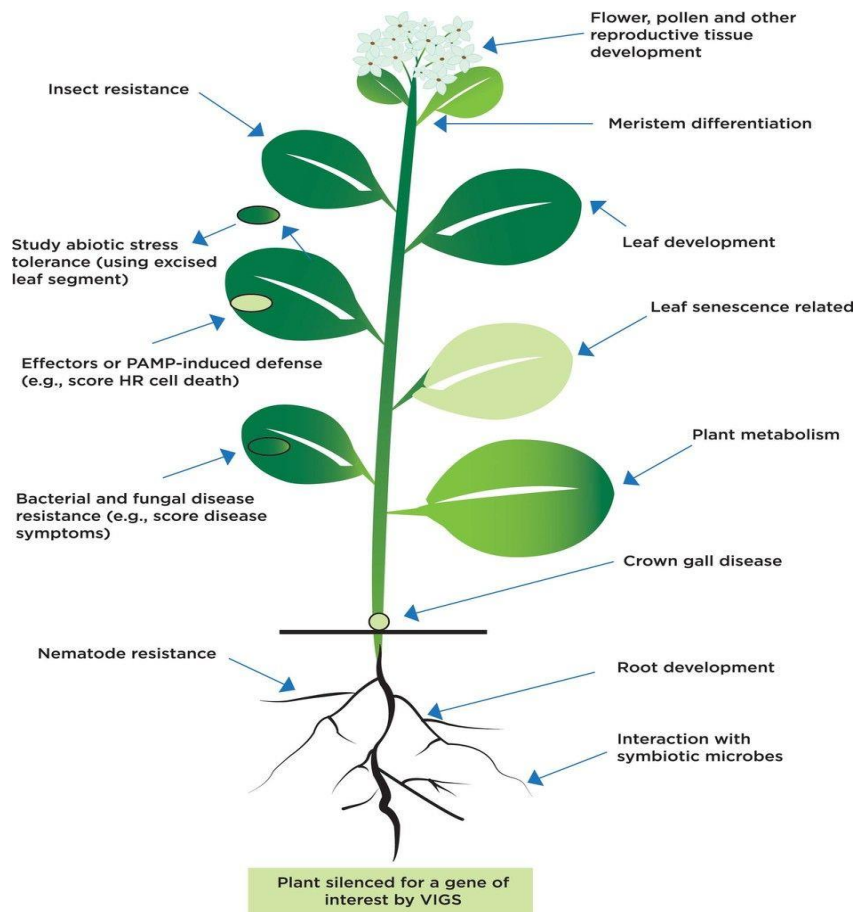


**Εικόνα 1.8:** Γράφημα απεικόνισης ποσοστού της έκφρασης του ενδογενούς γονιδίου PDS σε φυτό VIGS σε σύγκριση με φυτικό δείγμα μάρτυρα που δεν πραγματοποιήθηκε σίγηση γονιδίου μετά από εφαρμογή τεχνικής RT-qPCR. Το ποσοστό μείωσης της έκφρασης του γονιδίου PDS εκτιμάται ~90%. Senthil-Kumar et al., 2014

### 1.4.3 Πλεονεκτήματα της μεθόδου VIGS

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της εφαρμογής των VIGS, είναι αρχικά, πως πρόκειται για μια ταχεία και εύκολη μέθοδο γονιδιακής σίγησης, χωρίς να απαιτείται σταθερός μετασηματισμός φυτών. Ακόμη, είναι απαραίτητο να εισαχθεί, μόνο ένα τμήμα της αλληλουχίας του ενδογενούς γονιδίου-στόχου στο ιο-φορέα, για την επίτευξη της σίγησης. Επιπλέον, είναι μια τεχνική η οποία μπορεί να εφαρμοστεί τόσο σε κλασσικές μεθόδους γενετικής όσο και σαν εργαλείο ανάστροφης γενετικής. Αξιοσημείωτη είναι η χρήση των VIGS όσον αφορά την μελέτη της λειτουργίας γονιδίων, των οποίων οι μεταλλάξεις, οδηγούν τα έμβρυα σε θνησιμότητα. Τέλος, η μέθοδος VIGS εφαρμόζεται αποτελεσματικά και σε πολυπλοειδή φυτά (σιτάρι, *Triticum aestivum*) όπου το γονίδιο-στόχος υπάρχει σε πολλαπλά αντίγραφα ( Senthil-Kumar et al., 2008),( Scofield et al., 2009),( Di Stilo et al.,2011),(Burch et al., 2006).

Οι εφαρμογές των VIGS σε πολλά είδη φυτών, αφορούν τον χαρακτηρισμό γονιδίων που εμπλέκονται στις διαδικασίες ανάπτυξης (Senthil-Kumar et al.,2008),( Yang et al., 2010), στις συμβιωτικές σχέσεις που αναπτύσσουν τα φυτά (Gronlund et al., 2010) και στην αντοχή έναντι ασθενειών (Van der Linde et al. 2011), νηματωδών μικροοργανισμών (Mao et al.,2011) και εντόμων (Mantelin,et al.,2011). Ακόμη, χρησιμοποιούνται για την μελέτη γονιδίων που εμπλέκονται στην αντίδραση των φυτών έναντι καταστάσεων, θρεπτικού ή αβιοτικού στρες. (Εικόνα 1.6)



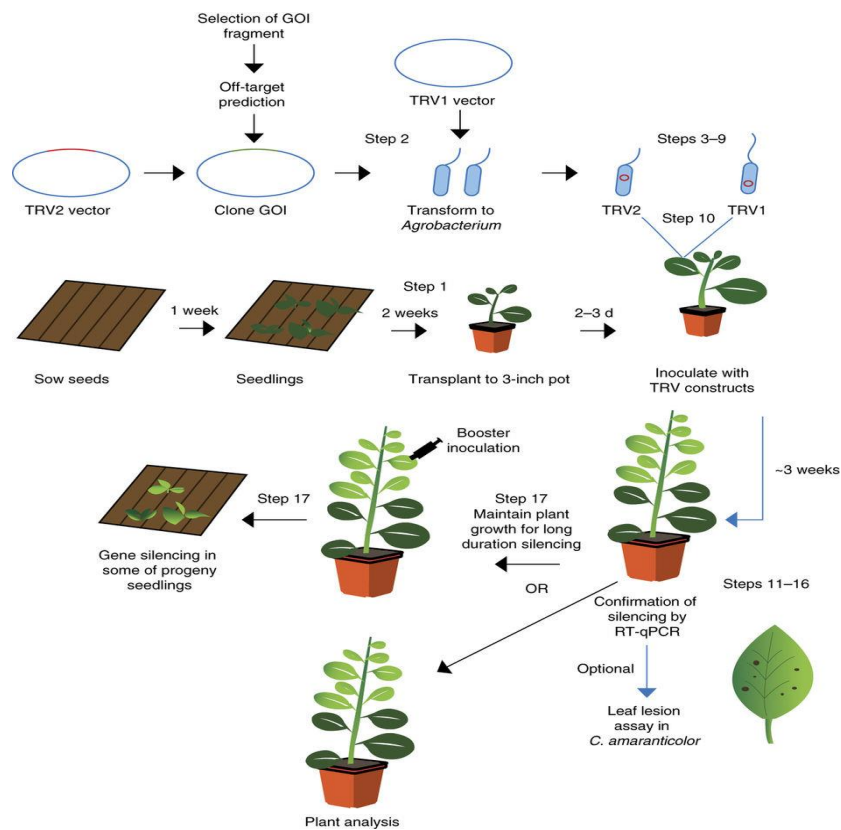
**Εικόνα 1.6:** Πιθανοί ερευνητικοί τομείς σε φυτά που έχουν αποσιωπηθεί γονίδια με την μέθοδο VIGS. (Senthil-Kumar, 2014)

#### 1.4.4 Ο TRV (Tobacco rattle virus) ιός ως φορέας για την εφαρμογή των VIGS

Η ανάπτυξη της μεθόδου των VIGS και η εφαρμογή της σε ποικίλους τομείς μελέτης όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.4.2, συνεπάγεται με την ανάπτυξη αρκετών ιικών φορέων ικανών να χρησιμοποιηθούν στην αποσιώπηση γονιδίων εντός ποικίλων φυτικών κυττάρων. (Becker et al., 2010) Οι ιικοί φορείς-TRV χρησιμοποιούνται ευρέως σε πολλά φυτικά είδη, κυρίως σε φυτά της οικογένειας Solanaceae όπως ο καπνός και η τομάτα. ( Senthil-Kumar et al., 2011)

Ο TRV-ιός είναι ένας διμερής RNA ιός, το γονιδίωμα του οποίου αποτελείται από τα TRV1 και TRV2 τμήματα, που συνιστούν το σύνολο του. Το TRV1τμήμα του ιού (RNA1) αποτελείται από 6971kb και ευθύνεται για την διακίνηση του ιού (Ziegler-Graff et al., 1991). Το TRV2 (RNA2) τμήμα του ιού αποτελείται περίπου από 9663 kb, και περιέχει γονίδια που κωδικοποιούν για πρωτεΐνες του περιβλήματος-καψιδίου του ιού και άλλες μη δομικές πρωτεΐνες (MacFarlane,1999). Συγκεκριμένα δυο γονίδια φαίνεται να αντιστοιχούν στην σύνθεση των μη δομικών αυτών πρωτεϊνών. Με αντικατάσταση αυτών των δυο περιοχών επάνω στο γονιδίωμα, με θέσεις κλωνοποίησης ξένου γενετικού υλικού (MultiCloningSite) , το TRV2 τμήμα του ιού γίνεται κατάλληλο για την μεταφορά κομματιού του γονιδίου-στόχου

στο γονιδίωμα του ιικού φορέα (Ratcliff et al., 2001). Στη συνέχεια οι pTRV1 και pTRV2-GOI (gene of interest) φορείς μετασηματίζουν βακτηριακά κύτταρα *Agrobacterium tumefaciens*. Στο τελευταίο στάδιο με την μέθοδο της αγραέγχυσης οι κατασκευές αυτές παρνούν σε φυτικούς οργανισμούς. (Εικόνα 1.7)



**Εικόνα 1.7:** Διαδικασία εφαρμογής της μεθόδου VIGS για ένα συγκεκριμένο γονίδιο ενδιαφέροντος στον καπνό *N. benthamiana*. (Senthil-Kumar et al., 2014)

Ο TRVιός μπορεί να μολύνει μεριστωματικούς ιστούς (Liu et al., 2002) σε αντίθεση με άλλους ιικούς φορείς που δεν έχουν την ικανότητα αυτή, και προκαλεί πιο ήπια συμπτώματα στα φυτά σε σύγκριση με άλλους φορείς, όπως ο ιός PVX. (Ruiz et al., 1998) Ο ιός TRV έχει χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την σίγηση γονιδίων σε πολλά διαφορετικά φυτικά είδη όπως στον καπνό, στην ντομάτα (Quandrina et al., 2011), στο φυτό κολομπίνα (Gould and Kramer, 2007), στην παπαρούνα (Hileman et al., 2005), και σε πολλά άλλα, καθώς φαίνεται να μην επιδρά στην ανάπτυξη ή την αναπαραγωγή των φυτών.



## 1.5 Στόχος πειράματος

Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 1.2.3, το ένζυμο που εντοπίστηκε να δρα για την απογλυκοζυλίωση της ελαιοευρωπαϊνης στην ελιά είναι η OeGLU. Με βάση τις πειραματικές τεχνικές κλασσικής γενετικής που πραγματοποιήθηκαν, και τα αποτελέσματα που προέκυψαν την καθιστούν, το εξειδικευμένο ένζυμο (OeGLU) για το καταβολισμό της ελαιοευρωπαϊνης. Η παρούσα μελέτη κύριο σκοπό έχει, εφαρμόζοντας μια μέθοδο ανάστροφης γενετικής, να προσεγγίσει εναλλακτικά το στοιχείο για την μοναδικότητα και την εξειδίκευση της δράσης του ενζύμου OeGLU στην ελιά. Έγινε μοριακή ανάλυση όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος- OeGLU και του γονιδίου μάρτυρα -OePDS στα φυτικά δείγματα που χειριστήκαμε με την μέθοδο Agroinoculation VIGS.

Πραγματοποιήθηκε στοχευμένη σίγηση του γονιδίου OeGLU με την μέθοδο VIGS, με χρήση των ανασυνδυασμένων ιών- φορέων pTRV1/pTRV2. Οι κατασκευές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι pTRV2-OeGLU,, pTRV2-OeChlH, pTRV2-OePDS (η δημιουργία των κατασκευών αυτών περιγράφονται στην πτυχιακή εργασία της Αγγελί Ε., 2018).

- Χειρισμός φυτών με Agroinoculation VIGS διάρκειας 2-3 μηνών
- Πρώτη παρατήρηση φαινοτυπικών φαινομένων σε φυτά που έγινε σίγηση του γονιδίου OePDS.
- Μοριακή ανάλυση των φυτικών δειγμάτων –RNA extraction
- Ποσοτικοποίηση της σίγησης των γονιδίων *OeGLU*, *OePDS*.
- Απομόνωση πρωτεϊνών από OeGLU-vigs φυτά και προσδιορισμός ενζυμικής αντίδρασης χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την ελαιοευρωπαϊνη με την χρήση HPLC μεθόδου.

## 2. Υλικά και Μέθοδοι

### 2.1 Φυτικό υλικό

Κατά την εκπόνηση των πειραματικών διαδικασιών της παρούσας επιστημονικής μελέτης χρησιμοποιήθηκαν φύλλα από ελιές *O. europaea L. ssp. europaea var. Sativa*, της γνωστής ποικιλίας κορωνέικης από δένδρα που βρίσκονται στον ελαιώνα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών καθώς και από δενδρύλλια που μεγαλώσαμε μέσα στο εργαστήριο από το στάδιο του σπόρου.

#### 2.1.1 Καλλιέργεια σπόρων ελιάς

Για την απομόνωση σπόρων ελιάς, επεξεργαστήκαν καρποί ελιάς που συλλέχθηκαν σε περίοδο καρποφορίας, με διάλυμα NaOH 15% ώστε να απομακρυνθούν τα εξωτερικά υπολείμματα σάρκας του καρπού. Ύστερα έγιναν διαδοχικά ξεπλύματα με νερό, και σπάζοντας το κουκούτσι απομονώθηκαν σπόροι ελιάς.

Οι σπόροι ελιάς ύστερα απολυμαίνονται με ειδικό διάλυμα, 25% χλωρίνη / 0,01 % Triton-X σε ασηπτικές συνθήκες και φυλάσσονται στο ψυγείο στους 4° C για διάστημα 7 ημερών για την διακοπή του ληθάργου. Έπειτα, οι σπόροι τοποθετούνται απευθείας σε γλαστράκια με χώμα ώστε να βλαστήσουν.

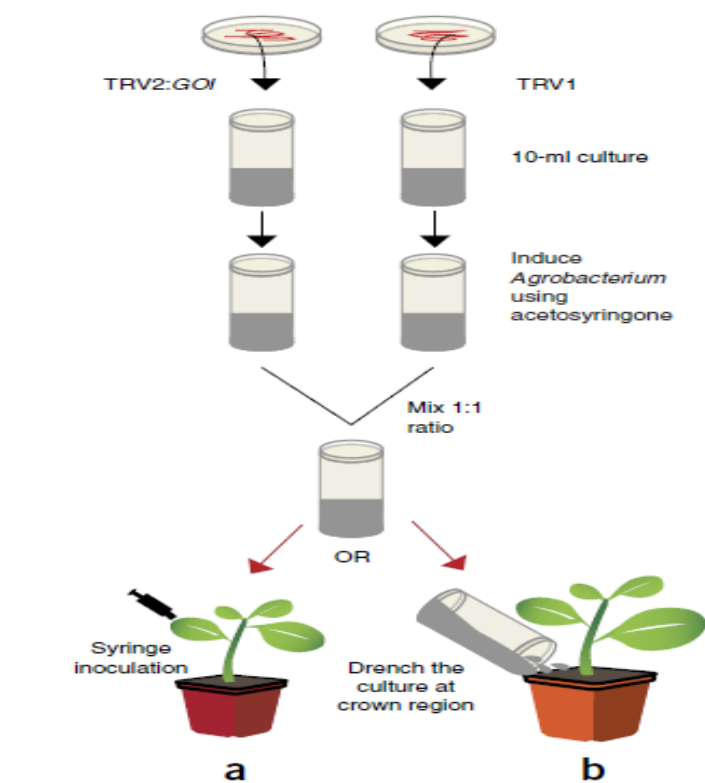
### 2.2 Βακτηριακά κύτταρα και Μετασχηματισμός.

Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, έγινε χρήση του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*, στέλεχος *GV3101*. Επίσης, για τον μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων *Agrobacterium*, χρησιμοποιήθηκε ο διμερής ιός του μωσαϊκού του καπνού, **TRV** (tobacco mosaic virus) που μολύνει κυρίως μεριστωματικούς ιστούς (Liu et al., 2002 & Ratcliff et al., 2001) και επιλέχθηκε διότι προκαλεί πιο ήπια συμπτώματα στα φυτά σε σχέση με άλλους φυτικούς ιούς. Το γονιδίωμα του ιού αποτελείται από δυο τμήματα, το TRV1 μέρος που είναι υπεύθυνο για την κωδικοποίηση πρωτεϊνών για την διακίνηση του ιού (Ziegler-Graff, Guilford & Baulcombe, 1991) και το TRV2 μέρος του γονιδιώματος που κωδικοποιεί για τις πρωτεΐνες του περιβλήματος και άλλες μη δομικές πρωτεΐνες. (MacFarlane, 1999) Για την επιτυχή εφαρμογή της μεθόδου VIGS, οι δυο γονιδιακές περιοχές που κωδικοποιούν για τις μη δομικές πρωτεΐνες αντικαθίστανται στο TRV2 μέρος, από περιοχές εισαγωγής ξένων γονιδιακών τμημάτων –ένθετων κομματιών (MCS-multi cloning sites) του γονιδίου-στόχου που μας ενδιαφέρει για την πραγματοποίηση της σίγησης. (Ratcliff et al., 2001)

### 2.2.1 Υγρές και στερεές καλλιέργειες βακτηρίων

Τα βακτήρια *Agrobacterium tumefaciens* (στέλεχος GV3101) μεγαλώνουν σε υγρά ή στερεά θρεπτικά μέσα LB με την προσθήκη των κατάλληλων αντιβιοτικών (τριπλή επιλογή), τα οποία εξαρτώνται από το γενωματικό τους υλικό και τα πλασμίδια που μεταφέρουν, και τους προσδίδουν την αντίστοιχη ανθεκτικότητα. Τα *Agrobacterium tumefaciens* αναπτύσσονται στους 28° C ιδανικά για 30-48hr. Στην διαδικασία αναπτυξης των βακτηρίων με τις κατασκευές των ιών TRV1-TRV2 και των γονιδίων στόχων τα τρυβλία στα οποία αναπτύσσουμε τις στερεές καλλιέργειες επωάζονται στους 28° C για 2 ημέρες ώσπου να αναπτυχθούν μονές αποικίες κλώνοι. Ύστερα οι υγρές καλλιέργειες παραμένουν σε μηχανήμα ανακίνησης (shaker) για 2 ημέρες επίσης στους 28° C, και τις αξιοποιούμε όταν ακόμα βρίσκονται στην εκθετική φάση.

### 2.2.2 Διαδικασία Agroinfiltration-Παροδικός μετασχηματισμός φύλλων ελιάς *Olea europaea*.



Εικόνα 2.1: Πρωτόκολλο αγραόγχυσης αγραοβακτηρίων με ένεση όπως εφαρμόστηκε σε φύλλα φυτών *Arabidopsis*. Senthil Kumar 2014

- 1,5 mL υγρής καλλιέργειας τοποθετείται σε erpendorf και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 3.600 στροφές/λεπτό.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και ξεπλένεται προσεκτικά το ίζημα με 500 µL Dilution Buffer χωρίς να διαλυθεί το ίζημα,
- Τα κύτταρα επαναωρούνται με Dilution Buffer προσεκτικά χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες. Χρησιμοποιείται όση ποσότητα διαλύματος θεωρείται αναγκαία ώστε τα κύτταρα να είναι αρκετά συμπυκνωμένα.
- Τα κύτταρα κάθε κατασκευής αραιώνονται 1:50 και φωτομετρούνται στα 600nm.
- Κατασκευή ενέσεων: Μέσω των αποτελεσμάτων της φωτομέτρησης των αραιωμένων βακτηριακών διαλυμάτων, υπολογίζονται οι συγκεντρώσεις των πυκνών. Στο τελικό διάλυμα πρέπει τα βακτηριακά κύτταρα, να έχουν οπτική πυκνότητα (O.D) 3. Κατ' επέκταση υπολογίζονται οι ποσότητες των βακτηριακών στελεχών της εκάστοτε κατασκευής που θα χρησιμοποιήσουμε με διάλυμα βακτηριακών στελεχών που φέρουν το pTRV1, και τέλος ο όγκος συμπληρώνεται με Dilution buffer. Στο διάλυμα της ένεσης προστίθενται επίσης, acetosyringone σε αναλογία 1,5µL/mL ένεσης, η οποία επάγει την διαδικασία μετασχηματισμού των φυτικών κυττάρων από το *Agrobacterium tumefaciens*.
- Τα διαλύματα αφήνονται για 3 ώρες στους 28°C.
- Με το πέρας των 3 ωρών πραγματοποιείται η έγχυση των αγροβακτηρίων με τη βοήθεια σύριγγας με πολύ λεπτή βελόνα, αφήνοντας ποσότητα ένεσης στην κάτω επιφάνεια των φύλλων ελιάς, καθώς και κάποια μικρή ποσότητα στην ρίζα του φυτού.
- Τα φύλλα στα οποία πραγματοποιήθηκε έγχυση βακτηρίων μαρκάρονται με κλωστή.
- Τηρούμε την διαδικασία της αγροέγχυσης ανα 15 ημέρες τακτικά, χτυπώντας είτε το ακριβώς απέναντι φύλλο από αυτό που ενέθηκε την τελευταία φορά στον ίδιο κόμβο, είτε πηγαίνοντας ένα κόμβο πιο πάνω προς τα νεαρότερα φύλλα.

### 2.2.3 Λειοτριβίση ιστών ελιάς.

Μετά από διαδοχικές επαναλήψεις αγροέγχυσης συλλέγονται τα φύλλα του κόμβου πάνω από τα φύλλα τα οποία έχουν ενεθεί, με τις κατασκευές και με την διαδικασία της λειοτριβίσης με υγρό άζωτο γίνονται σκόνη, η οποία φυλάσσεται σε falcon στους -80° C για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

## 2.3 Απομόνωση ριβονουκλεϊκών οξέων (RNA)

Διαδικασία:

- Χρήση ιστού σε μορφή σκόνης (έχει προηγηθεί λειοτριβήση).
  - Για κάθε 0,1 gr ιστού προσθέτουμε σε eppendorf 100μL RNA Extraction Buffer και 100μL φαινόλη.
  - Έντονη ανάδευση για 1 min (vortex).
  - Φυγοκέντρωση για 5min στις 13000 rpm.
- (Δημιουργούνται 2 φάσεις, η υδατική είναι πάνω και η οργανική κάτω)
- Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό eppendorf.
  - Προσθέτουμε ίσο όγκο φαινόλης και αναδεύουμε έντονα για 1min (vortex).
  - Φυγοκέντρωση για 5min στις 13000 rpm.
  - Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό eppendorf.
  - Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος 1:1 (φαινόλη)/(24:1 χλωροφόρμιο:ισομυλική αλκοόλη).
  - Έντονη ανάδευση για 1 min.
  - Φυγοκέντρωση για 5min στις 13000 rpm.
  - Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό eppendorf.
  - Προσθέτουμε ίσο όγκο διαλύματος 24:1 χλωροφόρμιο:ισομυλική αλκοόλη.
  - Έντονη ανάδευση για 1min.
  - Φυγοκέντρωση για 5min στις 13000 rpm.
  - Μεταφέρουμε το υπερκείμενο (υδατική φάση) σε καθαρό eppendorf.
  - Προσθέτουμε 2,5 όγκους 100% EtOH (παγωμένη από τους -20°C) και 1/10 του όγκου της υδατικής φάσης CH<sub>3</sub>COONA 3M (pH 4,8).
  - Αναδεύουμε αργά 20-30 φορές με το χέρι και βάζουμε το eppendorf στους -20°C για 16-18 ώρες (overnight).
  - Φυγοκεντρούμε για 20 min στις 13000 rpm στους 4°C.
- Αποχύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει.

## 2.4 Ανάλυση Νουκλεϊκών Οξέων

Η ηλεκτροφόρηση, αποτελεί μια δισδιάστατη βασική μέθοδο ανάλυσης νουκλεϊνικών οξέων (DNA,RNA) και πρωτεϊνών.

Τα αρνητικά φορτισμένα μόρια DNA θα κινηθούν λόγω ηλεκτρικού πεδίου μέσα σε μια πηκτή αγαρόζης προς το θετικό πόλο και θα διαχωριστούν με βάση το μεγεθός τους σε διαφορετικά κλάσματα.

Η πηκτή αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό μεγάλων μορίων νουκλεϊνικών οξέων (πάνω από 100bp) ,ενώ η πηκτή πολυακρυλαμίδης εφαρμόζεται στο διαχωρισμό ολιγονουκλεοτιδίων και πρωτεϊνών.

Ανάλογα το μέγεθος του μορίου που θα αναλυθεί παρασκευάζουμε αγαρόζη με συγκεκριμένη συγκέντρωση.

### 2.4.1 Διαδικασία παρασκευής( gel ) πηκτής αγαρόζης

- Ποσότητα αγαρόζης 0.8-3% προστίθεται σε κατάλληλο όγκο νερού και θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων για μερικά λεπτά,μέχρι να είναι το διάλυμα διαυγές.
- Προστίθεται ποσότητα TAE τελικής συγκέντρωσης 1X
- Ακολούθως προστίθεται ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου EtBr 50μg/ml, το οποίο έχει την ικανότητα να μεταξύ των βάσεων των νουκλεϊνικών οξέων.
- Η πηκτή τοποθετείται σε κατάλληλο δοχείο συσκευής ηλεκτροφόρησης με την ανάλογη χτένα και αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου.
- Μετά την στερεοποίηση του πηκτώματος αγαρόζης, αφαιρούνται τα χτενάκια και τοποθετείται το δοχείο-καλούπι στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα (1x TAE + EtBr).
- Τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται χρωστική (loading dye) τελικής συγκέντρωσης 1x. Η χρωστική επιτρέπει στο δείγμα να καθιζάνει μέσα στα πηγαδάκια που έχουν δημιουργηθεί από την χτένα στην πηκτή, λόγω της παρουσίας σακχαρόζης.
- Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης εφαρμόζεται σταθερή τάση 50-120 V.
- Το αποτέλεσμα διαχωρισμού που συνέβη κατά την ηλεκτροφόρηση εξετάζεται σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV).

### Ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης

- 20ml 1xTAE
- 50μl βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr)
- 980ml ddH<sub>2</sub>O

Τελικός όγκος 1000ml

**TAE (50x)** : 100ml από 0.5M EDTA pH=8, 57ml CH<sub>3</sub>COOH, 242gr Tris base σε τελικό όγκο 1 lt

**EtBr** : 10mg/ml (φυλάσσεται σε σκουρόχρωμο δοχείο)

**Loading dye 6x**: 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF, 40% (w/v) sucrose.

## 2.5 Προσδιορισμός Συγκέντρωσης Νουκλεϊκών Οξέων

Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιείται μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) μέσω του φωτόμετρου PerkinElmer. Τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν κοντά στα 260 nm, και με την βοήθεια του τύπου των Beer-Lambert υπολογίζεται η συγκέντρωσή τους:

$$c \text{ (}\mu\text{g/ml)} = \text{OD}_{260} * a * \text{DF}$$

Όπου a ορίζεται ως η συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων που παρατηρείται όταν  $\text{O.D}_{260}=1$  και συγκεκριμένα για δείγματα DNA,  $a=50\mu\text{g/mL}$  ενώ για RNA,  $a=40\mu\text{g/mL}$ , DF είναι ο συντελεστής αραίωσης και ισούται με την αραίωση που έχει πραγματοποιηθεί για να γίνει η φωτομέτρηση.

Όμως εκτός από τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης είναι εξίσου σημαντικό να γνωρίζουμε και την καθαρότητα του δείγματος ως προς τις πρωτεΐνες και τα φαινολικά παράγωγα. Οι πρωτεΐνες προσδιορίζονται μέσω φωτόμετρου στα 280nm λόγω της παρουσίας της τρυπτοφάνης ενώ τα φαινολικά παράγωγα στα 240 nm. Επομένως οι λόγοι  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  και  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{240}$  αντιπροσωπεύουν την καθαρότητα του διαλύματος ως προς τις πρωτεΐνες και τα φαινολικά αντίστοιχα. Ο ιδανικός λόγος πρέπει να πλησιάζει το 2 και στις δύο περιπτώσεις για το RNA.

## 2.6 Μοριακοί Χειρισμοί

### 2.6.1 Dnase treatment/ Χειρισμός με Dnase

Για την απομάκρυνση του DNA κατά την απομόνωση του RNA από φυτικά δείγματα γίνεται χειρισμός με Dnase.

Πραγματοποιήθηκαν οι εξής αντιδράσεις σε PCR eppendorfs:

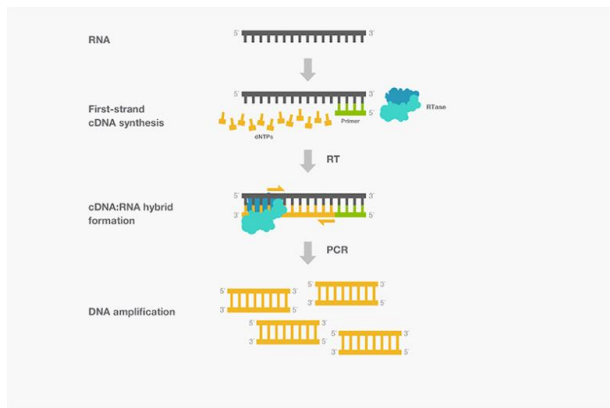
Δείγματα leafs <i>O.europaea</i>	
Nucleic Acids	~4 µg
RQ1 BUFFER	8µl
RQ1 Dnase 1u/µl	2µl
Rnaseout	1µl
ddH <sub>2</sub> O	Up to 80µl
Total	80µl

- 1ώρα στους 37°C.
- Προσθέτουμε 1unit ενζύμου (RQ1 Dnase) και αφήνουμε την αντίδραση για άλλα 30 min.
- Ανεβάζουμε τον όγκο στα 500µL.
- Ακολουθεί καθαρισμός με φαινόλη/SEVAG, καθίζηση με αιθανόλη ανάλυση νουκλεϊκών οξέων σε πηκτή αγαρόζης και προσδιορισμός της συγκέντρωσης όπως αναφέρθηκε παραπάνω.(Παράγραφος 2.4)

### 2.6.2 RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase-Chain Reaction)/ Σύνθεση cDNA αλυσίδας

Για την σύνθεση της πρώτης αλυσίδας cDNA χρησιμοποιείται το ένζυμο της αντίστροφης μεταγραφάσης (Reverse transcriptase- RTII). Το ένζυμο αυτό έχει την ικανότητα να μεταγράψει το σύνολο των μορίων mRNA σε μονόκλωνα DNA με αποτέλεσμα μόρια cDNA εκ των οποίων η μία αλυσίδα είναι RNA αλληλουχία και η δεύτερη DNA. Για να ξεκινήσει την μεταγραφή η RT χρησιμοποιούμε έναν oligo (dT)25 µM εκκινητή ο οποίος υβριδίζει στην poly A<sup>+</sup> ουρά των μορίων mRNA. (Εικόνα 2.3)





**Εικόνα 2.3 :** Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)

- Η αντίδραση της RT γίνεται σε 2 βήματα (RT STEP1/ RT STEP2)
- Προετοιμάζουμε το Step1 σε αποστειρωμένο eppendorf.

STEP 1	
RNA	~400 ng
25OligodT	2μl
10mMdNTP's	1.5μl
ddH2O	Up to 12.5μl
Total	12.5μl

- Ανακατεύουμε ελαφρά και κάνουμε spin στην φυγόκεντρο.
- Επιάζουμε στους 65°C για 6 λεπτά στο μηχάνημα της PCR.
- Τοποθετούμε τα Eppendorfs στον πάγο.

Το Step1 πραγματοποιείται στους 65°C για να γίνει αποδιάταξη της δευτεροταγούς δομής του mRNA. Η αντίστροφη μεταγραφή (RT) είναι πολύ ευαίσθητο ένζυμο και λειτουργεί αστηρά στους 42°C, για αυτό τον λόγο γίνεται ξεχωριστά το Step 2 της αντίδρασης.

- Για το Step2 προσθέτουμε τα ακόλουθα στα Eppendorfs:

STEP2	
Fs Buffer 5x	4μl
DTT 0.1M	2μl
RNase out(40unit/μl)	1μl
SSI/RT (200unit/μl)	0.5μl
Total	20μl

- Πιπετάρουμε ελαφρά και επωάζουμε στους 42°C για 1 ώρα.
- Τέλος η αντίδραση αδρανοποιείται με επώαση στους 70°C για 15 λεπτά.
- Τα δείγματα αραιώνονται 1/5 και φυλάσσονται στους -20°C.

### 2.6.3 PCR (Polymerase Chain Reaction)- Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Για την εξακρίβωση της ενίσχυσης των γονιδίων- στόχων και τον έλεγχο των κύκλων που παίρνουμε το επιθυμητο προϊόν, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της PCR με ένζυμο την KAPA Taq DNA Polymerase (KAPA Biosystems), και αντίστοιχα έγινε χρήση των κατάλληλων εκκινητών.

Μια τυπική αντίδραση PCR με το ένζυμο KAPA Taq (5unit/μl):

Συστατικά αντίδρασης	Πυκνό διάλυμα	Όγκος διαλυμάτων	Τελικές Συγκεντρώσεις
Ρυθμι. Διάλυμα αντίδρασης PCR	10x	2.5μl	1x
DNTP's	2mM	2.5μl	200μM
Ορθός εκκινητής	3μM	2.5μl	0.4μM
Ανάστροφος εκκινητής	3μM	2.5μl	0.4μM
KAPA Taq DNA Polymerase	5u/μl	0.2μl	0.5U
DNA		1μl	<250 ng
ddH2O		Up to 25μl	
Total		25μl	

STEPS	TEMPRATURE °C	TIME	NUMBER OF CYCLES
Initial denaturation	95 °C	3min	1
Denaturation	98°C	20 sec	15-35 times
Annealing	Tm*	30 sec	
Extension	72°C	15-60 sec/kb	
Final extension	72°C 12°C forever	1 min/kb	1

#### 2.6.4 Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία

OeACTIN FOR (5'-3')	GTATGTTGCTATCCAGGCTGTT	101bp
OeACTIN REV(5'-3')	AAATGGGTACTGTGTGACTCAC	
OeC-Ter For (5'-3')	GCTGCTGGATTTCAGTGTTAGA	181bp
OeC-Ter Rev (5'-3')	GGTGCTGCCTCTAAGCCTTTT	
OePDSRT For (5'-3')	AAACTCCAAGGTCCGTCTATAA	105bp
OePDSRT Rev (5'-3')	GCTTTGTGTAATCACCAGCTAAA	
T17XhoI	GTCGACCTCGAGTTTTTTTTTTTTTTTTTT	

**Πίνακας 2.1:** Ακολουθίες εκκινητών όπως κατασκευάστηκαν για τις πειραματικές διαδικασίες PCR, RT-PCR, semi-Q PCR, QPCR.

#### 2.6.5 Ημι-ποσοτικό RT-PCR (semi-quantitative RT-PCR)

Η τεχνική του ημι-ποσοτικού RT-PCR είναι μια ευαίσθητη διαδικασία που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση μορίων RNA. Η μέθοδος αυτή δίνει την δυνατότητα ανίχνευσης συγκεκριμένων mRNA από ένα συνολικό RNA που έχει απομονωθεί από κύτταρο ενός ιστού. Η τεχνική RT-PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά για την

ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων RNA στόχων, από πολύ μικρότερα αρχικά δείγματα. Σε πρώτο στάδιο ποσοτικοποιείται η αρχική μήτρα του PCR και παίρνουμε ως παραδοχή ότι η συγκέντρωση των προϊόντων της PCR μετά από συγκεκριμένο αριθμό κύκλων ενίσχυσης εξαρτάται από την αρχική συγκέντρωση της μήτρας. Τα επίπεδα mRNA που θα πάρουμε τελικά μπορούν να συγκριθούν με συγκεκριμένα mRNA γονιδίων αναφοράς.

Στην δεδομένη εργασία έγινε προσπάθεια εκτίμησης της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων από δείγματα φυτικών ιστών που έχουμε διαχειριστεί με την μέθοδο VIGS. Στην ανάλυση των δεδομένων είναι απαραίτητη η χρήση ενός γονιδίου αναφοράς, του οποίου τα επίπεδα έκφρασης δεν μεταβάλλονται μεταξύ των διαφορετικών δειγμάτων RNA (*house keeping genes*). Με τον τρόπο αυτό, ρυθμίζεται η ποσότητα του cDNA η οποία θα χρησιμοποιηθεί σε κάθε αντίδραση, έτσι ώστε να λαμβάνεται σταθερή ποσότητα από το προϊόν ενίσχυσης του γονιδίου αναφοράς. Η διαδικασία αυτή μας επιτρέπει να συμπεραίνουμε ότι τυχόν διαφορές στην ποσότητα του προϊόντος ενίσχυσης του μεταγραφήματος στόχου, οφείλονται στη διαφορετική έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου στα διαφορετικά δείγματα που εξετάζουμε και όχι σε διαφορετικές ποσότητες ολικού cDNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση. Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το γονίδιο της *ακτίνης*, το οποίο εκφράζεται σταθερά μέσα στα φυτικά κύτταρα λόγω τους σημαντικού ρόλου στον κυτταροσκελετό των κυττάρων. Οι αντιδράσεις των PCR τόσο των μεταγραφημάτων στόχων όσο και του γονιδίου αναφοράς πρέπει να τερματίζουν όταν ακόμη η συσσώρευση των προϊόντων ενίσχυσης ,βρίσκεται στην εκθετική φάση.

### 2.6.6 Real -time Quantitative PCR (qPCR)

Για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης ενός γονιδίου μια από τις ακριβέστερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η qPCR τεχνική. Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται στην ποσοτικοποίηση των δεδομένων, αφορούν είτε απόλυτες μετρήσεις (*absolute quantification*) του γονιδίου που εξετάζουμε και αξιολόγησής τους σε σχέση με κάποια δεδομένη καμπύλη αναφοράς, είτε μετρήσεις της έκφρασης ενός γονιδίου που μας ενδιαφέρει σε σχέση με την έκφραση ενός άλλου γονιδίου-αναφοράς (*relative expression*) (Burch et al., 2004). Στην παρούσα πειραματική διαδικασία, για να επιτευχθεί η ανάλυση και ποσοτικοποίηση της έκφρασης των γονιδίων των οποίων επιχειρήθηκε η αποσιώπησή, στο φυτικό οργανισμό της ελιάς (VIGS), χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος  $C_T$  ή  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ . Τα γονίδια ενδιαφέροντος για εμάς είναι το OePDS και το γονίδιο OeGLU, ενώ ως γονίδιο αναφοράς (internal control) για την τεχνική της qPCR χρησιμοποιήθηκε το *house keeping* γονίδιο της ακτίνης. Ως  $C_T$  ορίζεται ο κύκλος της real-time PCR όπου το φθορίζον σήμα της χρωστικής ουσίας (SYBR Green I) που μας δίνει σήμα, αγγίζει ένα οριακό σημείο ενώ ακόμα η αντίδραση βρίσκεται στην εκθετική φάση ενίσχυσης του προϊόντος.

Με την συγκριτική μέθοδο  $C_T$  ή  $2^{-\Delta\Delta CT}$  γίνονται αρχικά, κάποιες παραδοχές, όπως ότι η αποδοτικότητα της qPCR είναι κοντά στην τιμή 1, και τόσο το γονίδιο ενδιαφέροντος που εξετάζουμε καθώς και το γονίδιο αναφοράς που έχουμε επιλέξει, έχουν παρόμοια αποδοτικότητα. Τιμές  $2^{-\Delta\Delta CT}$  δειγμάτων που είναι χαμηλότερες του 1, θεωρούμε ότι αντιπροσωπεύουν μείωση στην έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος που εξετάζουμε, ενώ αντίστοιχα τιμές μεγαλύτερες του 1 υποδεικνύουν υπερέκφραση του γονιδίου (Schmittgenl & Livak, 2008)

Τα κυριότερα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής, είναι η εύκολη εφαρμογή και η δυνατότητα παρουσίασης των δεδομένων όπως προκύπτουν με βάση τις μεταβολές της έκφρασης των γονιδίων. Η μεταβολή στην έκφραση ενός γονιδίου υπολογίζεται μέσω της εξίσωσης που διαμορφώνεται ως  $Fold\ Change = 2^{-\Delta\Delta CT}$ . Συγκεκριμένα για τα δυο γονίδια που εξετάζουμε στην παρούσα εργασία, ο τύπος διαμορφώνεται ως εξής:

- $[(C_T\ OePds - C_T\ Actine)_{OePdsVIGS}] - [(C_T\ OePds - C_T\ Actine)_{E.Vector}]$
- $[(C_T\ OeGlu - C_T\ Actine)_{OeGLUVIGS}] - [(C_T\ OeGLU - C_T\ Actine)_{E.Vector}]$

Για την ορθή διαδικασία στατιστικής ανάλυσης των δεδομένων και την διεξαγωγή συμπερασμάτων, η διαδικασία της qPCR επαλαμβάνεται για τουλάχιστον τρεις βιολογικές επαναλήψεις, οι οποίες πραγματοποιούνται για το ίδιο φυτό για το γονίδιο ενδιαφέροντος που εξετάζουμε, έχοντας πάντα ως control της μεθόδου το γονίδιο αναφοράς της ακτίνης. (Schmittgenl & Livak, 2008)

## 2.7 Χειρισμοί Πρωτεϊνών

### 2.7.1 Απομόνωση πρωτεϊνών

Λειοτριβημένος ιστός μεταφέρεται σε eppendorf και ομογενοποιείται σε αναλογία 50 mg ιστού σε 500  $\mu$ L Extraction Buffer με έντονη ανάδευση για 2 min.

Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 10.000 rpm για 10 min στους 4 oC.

Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε άλλο eppendorf και αποτελεί το υδατοδιαλυτό πρωτεϊνικό κλάσμα.

## 2.7.2 Ενζυμικές Αντιδράσεις

Σε αποστειρωμένο eppendorf προστίθενται τα εξής:

Πυκνά διαλύματα	Ποσότητα	Τελική συγκέντρωση
Πρωτεϊνικό εκχύλισμα	1.5-3 µg	
Ολευρωπαΐνη (15 mM)	33.33 µL	5 mM
BSA (0.5%)	10 µL	0.05%
CH <sub>3</sub> COONa 1.5M pH 5,5	10 µL	150 mM
Συνολικός όγκος	100 µL	

Η αντίδραση επωάζεται για επιθυμητό χρόνο στους 37° C και στην συνέχεια τερματίζεται με προσθήκη ίσου όγκου 100% μεθανόλης.

Κάθε ενζυμική αντίδραση αφού τερματιστεί με προσθήκη ίσου όγκου μεθανόλης, φυγοκεντρείται στις 13.000rpm για 1 min. Όγκος 20 µL από το υπερκείμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο eppendorf και στην συνέχεια προστίθενται 580 µL διαλύματος ddH<sub>2</sub>O/μεθανόλης (40:60). Το δείγμα αναμιγνύεται ήπια και αποθηκεύεται στους -20 C ή αναλύεται μέσω HPLC.

## 2.7.3 Ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με την μέθοδο Bradford

Από πυκνό διάλυμα BSA 100X (10 mg/mL), δημιουργείται αραιώση 1X (0.1 mg/mL).

Σε eppendorfs προστίθενται τα εξής:

BSA1x	0	40	60	80	100	120	160	200
ddH <sub>2</sub> O	800µl	760µl	740µl	720µl	700µl	680µl	640µl	600µl
Bradford solution 5x	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl	200µl
Τελικός όγκος	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Τελική συγκέντρωση BSA	0µg	4µg	6µg	8µg	10µg	12µg	16µg	20µg

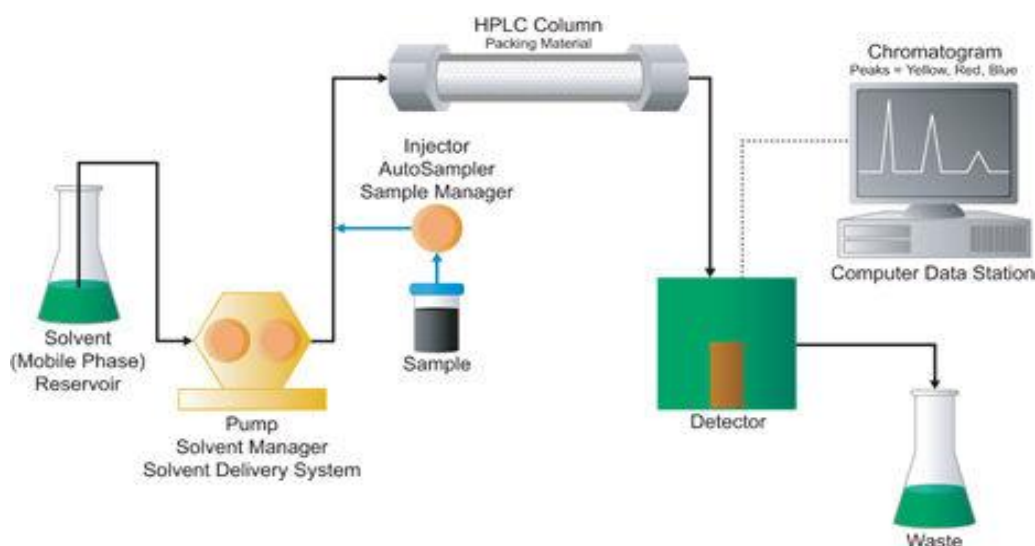
Για την μέτρηση των άγνωστων δειγμάτων προστίθενται 20µL από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα, 780µL ddH<sub>2</sub>O, και 200µL Bradford Solution 5x. Κάθε δείγμα φτιάχνεται και φωτομετρείται δυο φορές προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η λάθος ποσοτικοποίηση.

Το Bradford Solution προστίθεται τελευταίο, τα δείγματα επωάζονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως καταγράφεται η οπτική απορρόφηση όλων των δειγμάτων στα 595 nm.

Βάσει των τιμών απορρόφησης των δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης (BSA) δημιουργείται πρότυπη καμπύλη αναφοράς και από αυτήν υπολογίζεται η συγκέντρωση των αγνώστων δειγμάτων.

#### 2.7.4 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) είναι μια τεχνική αναλυτικής χημείας μέσω της οποίας μπορούν να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν ουσίες από ένα δείγμα. Ο διαχωρισμός γίνεται λόγω διαφορετικής κατανομής κάθε ουσίας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης εντός μιας χρωματογραφικής στήλης. Στατική φάση είναι το υλικό πλήρωσης της στήλης και κινητή φάση είναι το υγρό που κινείται διαμέσου της στήλης.



Εικόνα 2.4 : Σχηματική απεικόνιση της διάταξης ενός οργάνου HPLC

Στην παρούσα μελέτη, η ποσότητα γλυκοζυλιωμένης ολευρωπαΐνης μετρήθηκε μέσω ενός συστήματος της Jasco (Tokyo) εξοπλισμένο με την αντλία PU-2089, τον 64 ανιχνευτή UV-2070 και την στήλη ανάστροφης φάσης Discovery HS C18 (5 μm, 24 cm, 4.6 mm) της Supelco. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0.5 mL/min και η ανίχνευση της ουσίας έγινε στα 254 nm. Η κινητή φάση αποτελείτο από τον διαλύτη Α (ddH<sub>2</sub>O με 1% CH<sub>3</sub>COOH) και τον διαλύτη Β (μεθανόλη 100%) και η έκλουση έγινε με ισοκρατική ροή 60:40 (Α:Β) για 40 min και στην συνέχεια βαθμιδωτή ροή έως 30:70 (Α:Β) εντός 5 min.

## 2.8 Διαλύματα

### ❖ Αντιβιοτικά

- Ampicillin (αμπικιλίνη): 100mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Kanamycin (καναμυκίνη): 50mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Gentamicin (τζενταμυκίνη): 50mg/ml σε ddH<sub>2</sub>O. Φυλάσσεται στους -20°C.
- Rifampicin (ριφαμπικίνη): 5mg/ml σε μεθανόλη. Φυλάσσεται στους -20°C.

### ❖ Agroinfiltration

- Dilution buffer: 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MES, pH: 5.6.
- Ακετοσυριγκόνη: το πυκνό διάλυμα ακετοσυριγκόνης έχει συγκέντρωση 100 mM και φυλάσσεται στους -20 °C.

### ❖ Διαλύματα παρασκευής gel αγαρόζης και διάλυμα ηλεκτροφόρησης:

<b>Agarose gel 0.8%</b>	<b>Electrophoresis Buffer 1000ml</b>
<b>Αγαρόζη 0,8 gr</b>	<b>50x TAE 20 ml</b>
<b>50X TAE 2ml</b>	<b>50 μl EtBr</b>
<b>EtBr 5 μl</b>	<b>980 ml ddH<sub>2</sub>O</b>

### ❖ Πρωτεϊνικά διαλύματα

**Bradford Solution 5X**: 0.05% Coomassie Brilliant Blue G-250, 42.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 25% Μεθανόλη.

**Extraction buffer**: 100mM Tris-HCl pH 8.8, 100mM EDTA, 1mM PMSF, 100mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 10mM Glycine



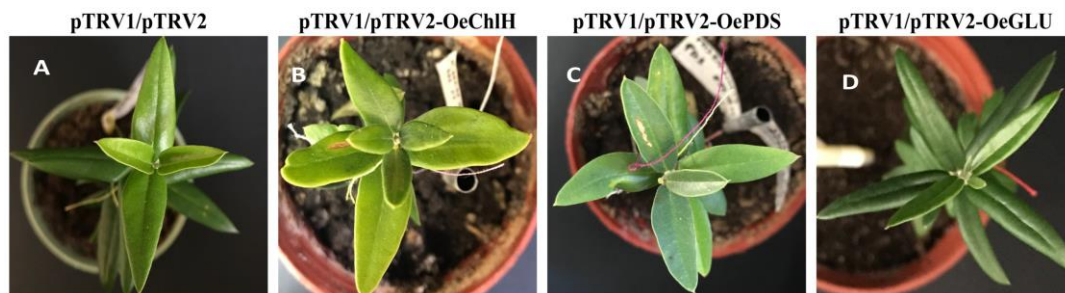
### 3. Αποτελέσματα

Δεδομένα από προηγούμενες έρευνες, οδήγησαν στον χαρακτηρισμό της β-γλυκοσιδάσης (OeGLU) ως το εξειδικευμένο ένζυμο απογλυκοζυλίωσης της ολευρωπαΐνης στο φυτό της ελιάς *Olea europaea*. (Koudounas et al., 2015)

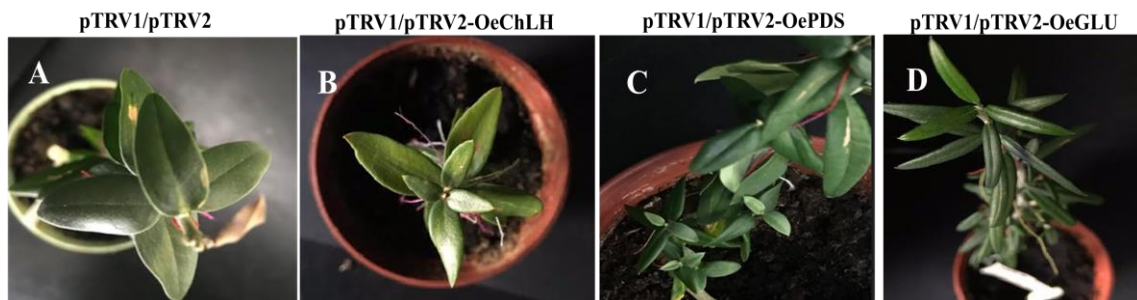
Για την εξακρίβωση της μοναδικότητας της δράσης της OeGLU στην παρούσα ερευνητική μελέτη, εφαρμόστηκε η μέθοδος των VIGS (Virus induced Gene Silencing) στα πλαίσια ανάστροφης γενετικής. Επιλέχθηκαν να αποσιωπηθούν τρία γονίδια, δυο εκ των οποίων λειτουργούν ως θετικοί μάρτυρες για το πείραμα, τα γονίδια PDS και ChlH, και η OeGLU. Τέλος, ως αρνητικά control της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκαν φυτά στα οποία ενέθηκε ο pTRV1 με κενό πλασμίδιο- pTRV2( Empty Vector –MCS).(Αγγελή Ελισάβετ 2018)

#### 3.1 Φαινοτυπική παρατήρηση φυτών ελιάς VIGS

Αναπτύσσοντας νεαρά φυτά ελιάς στο εργαστήριο, έγινε αγροέγχυση των κατασκευών pTRV1/pTRV2, pTRV1/pTRV2-OeChlH, pTRV1/pTRV2-OePDS, pTRV1/pTRV2-OeGLU σε νεαρά φύλλα, σταθερά κάθε 15 ημέρες, και σε διάστημα περίπου δυο μηνών παρατηρήσαμε τα πρώτα φαινοτυπικά αποτελέσματα. (Εικόνα 3.1)



**Εικόνα 3.1:** Φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών που έχει γίνει agroinoculation με την μεθοδο VIGS των κατασκευών Α) pTRV1/pTRV2 Β)για το γονίδιο OeChLH C)για το γονίδιο PDS D)και το γονίδιο της OeGLU σε νεαρά φύλλα ελιάς, με εφαρμογή της μεθόδου για διάστημα περίπου **τεσσάρων** εβδομάδων.



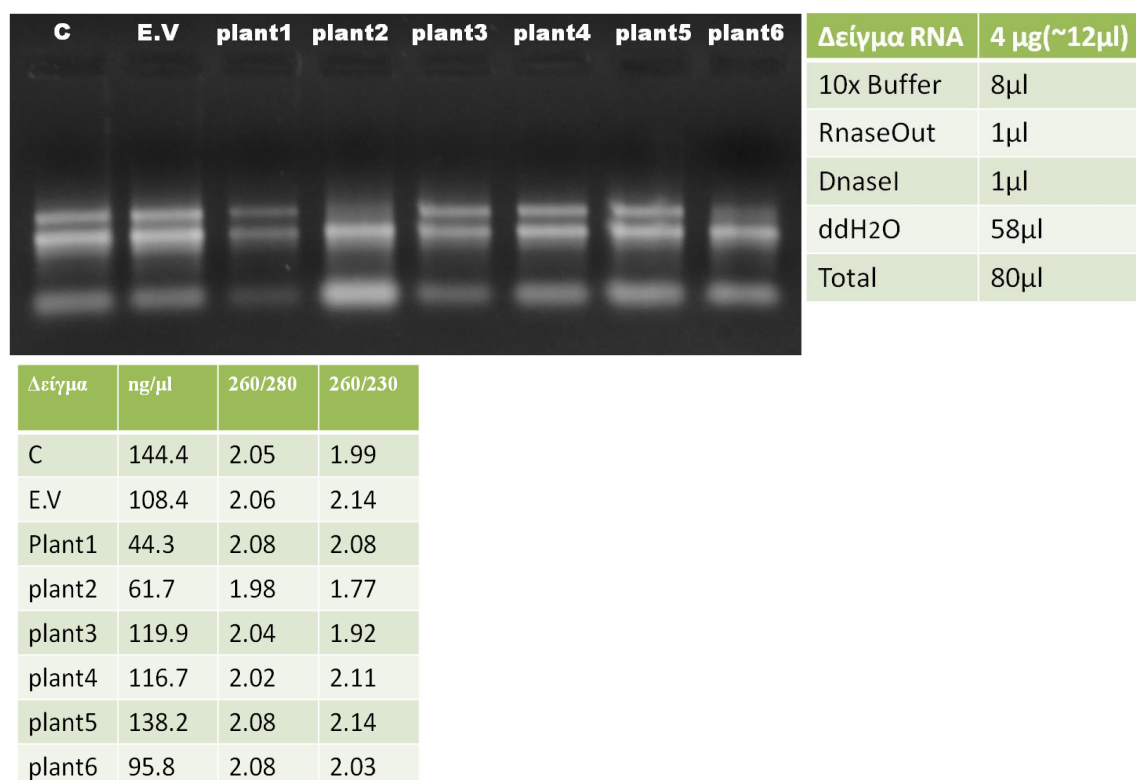
**Εικόνα 3.2:** Φαινοτυπική παρατήρηση των φυτών που έχει γίνει agroinoculation με την μεθοδο VIGS των κατασκευών Α)άδειου πλασμιδίου pTRV1/pTRV2 Β)για το γονίδιο OeChLH C)για το γονίδιο PDS D)και το γονίδιο της OeGLU σε νεαρά φύλλα ελιάς, με εφαρμογή της μεθόδου για διάστημα περίπου **δυο μηνών**.

## 3.2 Μοριακοί χειρισμοί για το γονίδιο PDS

### 3.2.1 Απομόνωση RNA και χειρισμός με το ένζυμο DnaseI

Αρχικά, έγινε απομόνωση RNA από ιστούς φυτών VIGS-PDS όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3. Στους μοριακούς χειρισμούς που έγιναν, χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες καθόλες τις διαδικασίες, δείγματα από φυτά που αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο χωρίς καμία κατασκευή (Untreated ) και φυτά με άδειο πλασμιδιακό βέκτορα pTRV2 (empty vector/ μαζί με τον pTRV1.

Απομονώθηκε RNA από έξι φυτικούς ιστούς. Στην συνέχεια, προσδιορίστηκε η ποσότητα RNA και η καθαρότητα των δειγμάτων. Για την απομάκρυνση πιθανού DNA έγινε χειρισμός των δειγμάτων με το ένζυμο DNaseI με αρχική ποσότητα περίπου 4μg RNA.

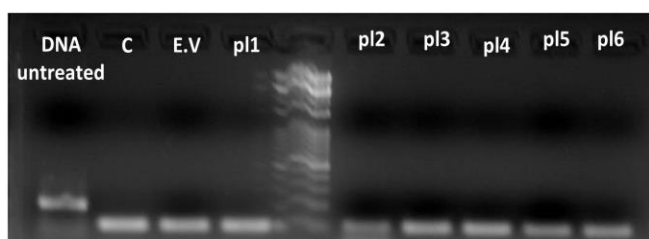


**Εικόνα 3.3:** Εικόνα δειγμάτων RNA μετά από DNase treatment. Agarose gel 1.5%

Μετά την αντίδραση τα δείγματα καθαρίζονται με φαινόλη/SEVAG για να απομακρυνθεί το ένζυμο όπως αναφέρεται την παράγραφο 2.6.1

### 3.2.2 Σύνθεση cDNA αλυσίδας και RT-PCR

Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της αντίστοιχης μεταγραφάσης χρησιμοποιήθηκαν 400 ng μήτρα RNA. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε δυο στάδια όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.6.2 αναλυτικότερα. Για να ξεκινήσει την μεταγραφή η RT χρησιμοποιούμε έναν Oligo(dT) εκκινητή ο οποίος υβριδίζει στην poly A<sup>+</sup> ουρά των μορίων mRNA. Ύστερα από 1ώρα επώασης στους 42°C στο μηχάνημα της PCR το RT αραιώθηκε 4-5 φορές με ddH<sub>2</sub>O. Προκειμένου να εξεταστεί αν η αντίδραση δούλεψε μπαίνει η πρώτη PCR με μήτρα το RT του κάθε δείγματος και ενισχύεται το house keeping γονίδιο της ακτίνης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι ο OeActinFor και OeActinRev και ενισχύουν ~200bp στο DNA του γονιδίου της ακτίνης και 100bp στη cDNA αλληλουχία γιατί οι εκκινητές έχουν σχεδιαστεί εκατέρωθεν ιντρονίου(Εικόνα 3.4). Επομένως, το αποτέλεσμα της PCR όπως φαίνεται παρακάτω και στην εικόνα 3.4, δείχνει ότι το RT είναι λειτουργικό. Επιπλέον έχει απομακρυνθεί το DNA από τα δείγματα, το οποίο διαπιστώνεται από το μοναδικό κομμάτι ενίσχυσης στις 100bp.

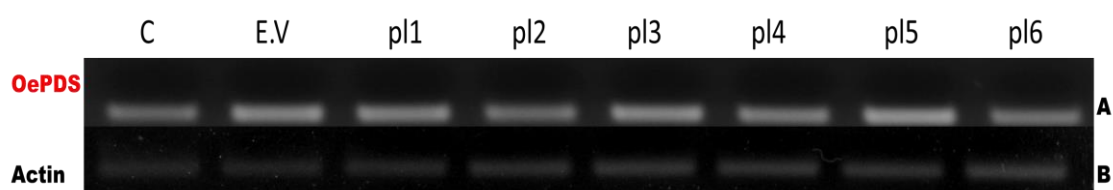


Actin 1 <sup>st</sup> OePDS	
RT	2µl
OeActinFor	2.5µl
OeActinRev	2.5µl
dNTP's	2.5µl
10xBuffer	2.5µl
Kapa Taq	0.1µl
ddH <sub>2</sub> O	12.9µl
Total	25µl

Εικόνα 3.4: Πρώτη PCR με εκκινητές OeACTINFOR/OeACTINREV για το γονίδιο OePDS. Gel 1%

### 3.2.3 Semi- Quantitative RT-PCR

Η διαδικασία του semi-quantitative PCR πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε αναλυτικότερα στην παράγραφο 2.6.5. Στην συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, μέσω του ημιποσοτικού PCR γίνεται προσπάθεια να ελέγξουμε με ποσοτική προσέγγιση την έκφραση του γονιδίου PDS σε φυτικούς ιστούς ελιάς, ύστερα από την μέθοδο των VIGS. Αρχικά, έγινε ενίσχυση του γονιδίου της ακτίνης χρησιμοποιώντας ποσότητα μήτρας από κάθε δείγμα τέτοια ώστε μετά την PCR το προϊόν της ακτίνης για όλα τα δείγματα να είναι σε ίσο-ποσότητες. (Εικόνα 3.5 B) Με αυτό τον τρόπο μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τυχόν διαφορές στην ποσότητα του προϊόντος ενίσχυσης του μεταγραφήματος στόχου, οφείλονται στη μειωμένη πιθανώς έκφραση του αντίστοιχου γονιδίου, στα διαφορετικά δείγματα και όχι σε διαφορετικές ποσότητες ολικού cDNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο PDS αναφέρονται στον Πίνακα 2.1.

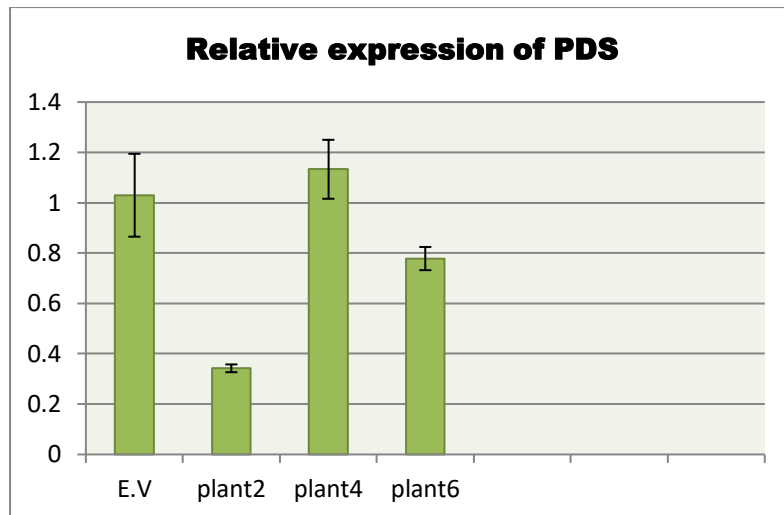


Εικόνα 3.5: Αποτελέσματα semi-quantitative PCR Agarose gel 1.5%

Όπως φαίνεται στην εικόνα 3.5A διακρίνεται χαμηλότερη ένταση προϊόντος στην ζώνη του plant 2, plant 4, plant 6 ως αποτέλεσμα πιθανώς μειωμένης έκφρασης του γονιδίου PDS στους συγκεκριμένους φυτικούς ιστούς. Με βάση τα στοιχεία αυτά προχωρήσαμε σε περαιτέρω ανάλυση των δεδομένων ώστε να εξακριβώσουμε το ποσοστό της μείωσης της έκφρασης του γονιδίου (Q-PCR).

### 3.2.4 Quantitative PCR

Η ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου στα φυτά VIGS, προσεγγίστηκε μοριακά με την εφαρμογή qPCR για όλα τα δείγματα, με γονίδιο αναφοράς το house keeping γονίδιο της ακτίνης. Εφαρμόστηκε επίσης, η μέθοδος CT για τους χειρισμούς των αποτελεσμάτων και την μετέπειτα διεξαγωγή των τελικών γραφημάτων. Εκτός από τα τρία φυτικά δείγματα στα οποία ενέθηκαν οι κατασκευές και επιλέξαμε να αναλύσουμε περαιτέρω (plant 2,4,6) με βάση το semi-Q, έχουμε και ένα control φυτό στο οποίο ενέθηκε άδειοι οι πλασμιδιακοί βέκτορες pTRV2/pTRV1.



**Εικόνα 3.6:** Γράφηματα ποσοτικοποίησης έκφρασης του γονιδίου OePDS ανα φυτό με βάση τα στοιχεία από την qPCR. Τιμές >1 αναπαριστούν θετική έκφραση (υπερέκφραση) τιμές<1 αρνητική έκφραση (αποσιώπηση γονιδίου)

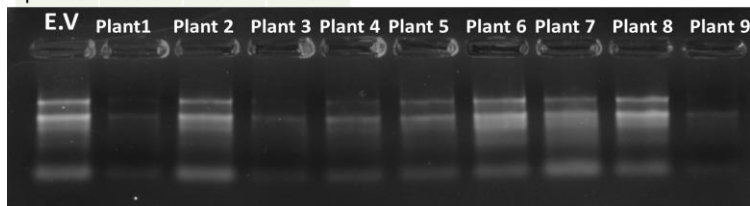
### 3.3 Μοριακοί χειρισμοί για το γονίδιο OeGLU

#### 3.3.1 Απομόνωση RNA και καθαρισμός με το ένζυμο DNaseI

Αντίστοιχα, για να εξετάσουμε την γονιδιακή έκφραση του OeGLU στα φυτά που χειριστήκαμε με την μέθοδο VIGS αρχικά, απομονώθηκε RNA από τα φυτικά δείγματα που είχαμε συλλέξει, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3. Στους μοριακούς χειρισμούς που έγιναν για το γονίδιο αυτό χρησιμοποιήθηκαν επίσης, ως θετικοί μάρτυρες, φυτά στα οποία αντίστοιχα, ενέθηκε άδειος ο πλασμιδιακός βέκτορας pTRV2 (Empty vector)/pTRV1.

Απομονώθηκε RNA από δέκα φυτικούς ιστούς, για να μελετηθεί η έκφραση του γονιδίου OeGLU. Στη συνέχεια, έγινε μέτρηση της ποσότητας και της καθαρότητας του απομονωμένου RNA, και έγινε καθαρισμός με το ένζυμο της DNaseI για την απομάκρυνση του DNA σε όλα τα δείγματα. Η αρχική ποσότητα των δειγμάτων υπολογίστηκε περίπου στα 2μg. Στην αντίδραση υπολογίστηκε να προστεθεί η ίδια ποσότητα RNA για όλα τα δείγματα ώστε να είναι όσο πιο κοντά γίνεται σε ποσοτήτες των RNA των δειγμάτων μετά τον χειρισμό. Το γεγονός αυτό βοηθά στην συνέχεια του πειράματος ώστε να διευκολύνει την διαδικασία του semi-quantitative PCR.

Δείγμα	ng/μl	260/280	260/230
E.V	190.6	1.82	1.89
plant1	92.6	1.78	1.80
Plant2	166.6	1.76	1.89
plant3	132.8	1.66	1.72
plant4	117.7	1.66	1.81
plant5	184.9	1.73	1.90
plant6	174.0	1.93	2.04
plant7	143.7	1.76	1.86
plant8	148.2	1.75	1.86
plant9	103.5	1.62	1.73



Δείγμα RNA	2 μg~16μl
10x Buffer	8 μl
RnaseOut	1 μl
DnaseI	1 μl
ddH2O	54μl
Total	80μl

**Εικόνα 3.7:** Εικόνα δειγμάτων RNA μετά από χειρισμό με DNaseI. Agarose gel 1.5%

Μετά το τέλος της αντίδρασης όπως αναφέρεται και στην διαδικασία 2.6.1 τα δείγματα καθαρίζονται με φαινόλη/SEVAG για την απομάκρυνση του ενζύμου της DNaseI.

### 3.3.2 Σύνθεση cDNA αλυσίδας και RT-PCR

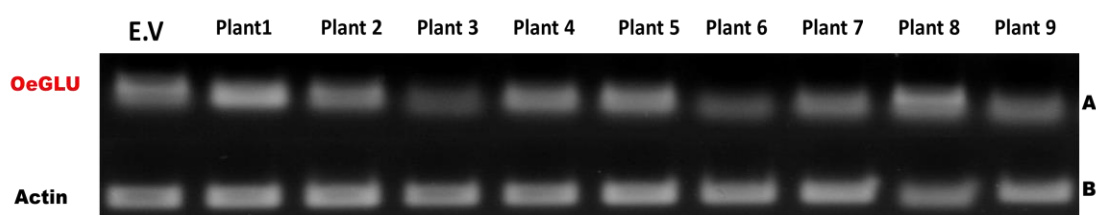
Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση της αντίστοιχης μεταγραφάσης χρησιμοποιήθηκαν 200 ng μήτρα RNA. Η αντίδραση ολοκληρώνεται σε δυο στάδια όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.6.2 αναλυτικότερα. Για να ξεκινήσει την μεταγραφή η RT χρησιμοποιούμε έναν Oligo(dT) εκκινητή ο οποίος υβριδίζει στην poly A<sup>+</sup> ουρά των μορίων mRNA. Ύστερα από 1 ώρα επώασης στους 42°C στο μηχάνημα της PCR το RT αραιώθηκε 4 φορές με ddH<sub>2</sub>O. Προκειμένου να εξεταστεί αν η αντίδραση δούλεψε μπαίνει η πρώτη PCR με μήτρα το RT του κάθε δείγματος και ενισχύεται το house keeping γονίδιο της ακτίνης. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι ο OeActinFor και OeActinRev (Εικόνα 3.7). Επομένως, το αποτέλεσμα της PCR όπως φαίνεται παρακάτω και στην εικόνα 3.7, δείχνει ότι το RT είναι λειτουργικό ώστε να χρησιμοποιηθεί στην συνέχεια του πειράματος.



**Εικόνα 3.8:** Πρώτη PCR με εκκινητές OeACTINFOR/OeACTINREV για το γονίδιο OeGLU. Gel 1%

### 3.3.3 Semi- Quantitative RT-PCR

Η διαδικασία του semi-quantitative PCR πραγματοποιήθηκε, όπως περιγράφηκε αναλυτικότερα στην παράγραφο 2.6.5. Αντιστοίχως, στην δεδομένη πειραματική φάση για το γονίδιο OeGLU, με χρήση του ημιποσοτικού PCR, έγινε προσπάθεια να ελέγξουμε ποσοτικά την έκφραση του γονιδίου (OeGLU) σε φυτικούς ιστούς ελιάς, ύστερα από την εφαρμογή της μεθόδου των VIGS. Σε πρώτο στάδιο, ενισχύθηκε το γονίδιο της ακτίνης με αρχική μήτρα από τα δείγματα κατάλληλα υπολογισμένη, έτσι ώστε μετά την PCR να παίρνουμε σε ίσες ποσότητες τα προϊόντα. (Εικόνα 3.9) Συνεπώς, όπως και στους χειρισμούς που έγιναν για το γονίδιο PDS, και στην παρούσα εφαρμογή της RT- PCR για το γονίδιο OeGLU, τυχόν διαφορές στην ποσότητα του προϊόντος ενίσχυσης του μεταγραφήματος στόχου, πιθανώς να οφείλονται στη μειωμένη έκφραση του γονιδίου στα δείγματα και όχι σε διαφορετικές αρχικές ποσότητες -cDNA που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε αντίδραση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για το γονίδιο OeGLU αναφέρονται στον Πίνακα 1.

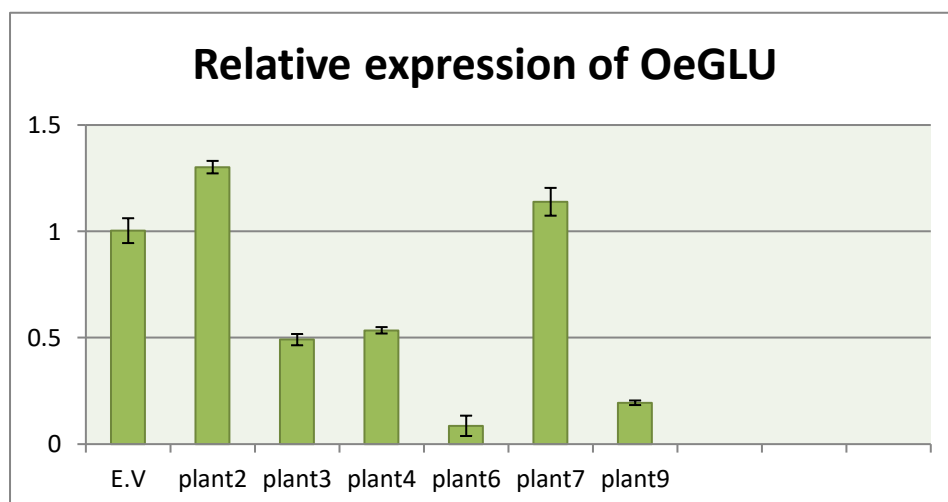


**Εικόνα 3.9:** Αποτελέσματα semi-quantitative PCR Agarose gel 1.5%

Στην εικόνα 3.8 διακρίνεται χαμηλότερη ένταση προϊόντος στην ζώνη του plant 3, plant 4, plant 6 και plant 9. Με βάση την εικόνα αυτή, προχωρήσαμε σε περαιτέρω αναλύσεις ποσοτικοποίησης και ελέγχου του ποσοστού της μείωσης της έκφρασης του γονιδίου OeGLU στα φυτικά δείγματα.

### 3.3.4 Quantitative PCR Analysis για το γονίδιο OeGLU

Διατηρήθηκε σταθερά, η ίδια διαδικασία της qPCR για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου-στόχου και στα φυτά OeGLU-VIGS, αντίστοιχα με χρήση ως γονιδίου αναφοράς το house keeping γονίδιο της ακτίνης. Χρησιμοποιήθηκε επίσης η μέθοδος CT για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Εκτός από τα εννέα φυτικά δείγματα στα οποία ενέθηκαν αντίστοιχα οι κατασκευές κρατήσαμε και ως θετικό control ένα φυτικό δείγμα στο οποίο είχε ενεθεί με κενό τον pTRV2/pTRV1.



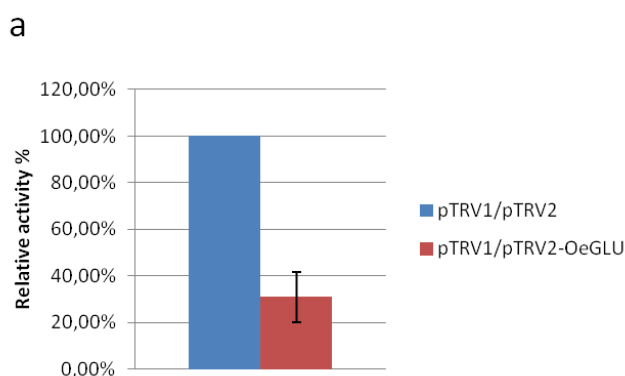
**Εικόνα 3.10:** Γράφηματα ποσοτικοποίησης έκφρασης του γονιδίου OeGLU ανα φυτό με βάση τα στοιχεία από την qPCR. Τιμές >1 αναπαριστούν θετική έκφραση (υπερέκφραση) τιμές <1 αρνητική έκφραση (αποσιώπηση γονιδίου)

## 3.4 HPLC ανάλυση

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το RT-qPCR και την αξιολόγηση του ποσοστού έκφρασης του γονιδίου-στόχου στα φυτικά δείγματα που αναλύσαμε, διαπιστώθηκε ότι στα φυτά 3, 4, 6 και 9 υπήρξε σημαντική μείωση της έκφρασης του γονιδίου OeGLU (εικόνα 3.10). Συγκεκριμένα για το φυτό 6, που φαίνεται να δίνει τα πιο αξιολογικά δεδομένα επιτυχούς αποσιώπησης, έγινε απομόνωση πρωτεϊνών και πραγματοποιήθηκε ενζυμική αντίδραση με την χρήση του πρωτεϊνικού εκχυλίσματος έναντι της ελαιοευρωπαϊνή. Η ενζυμική αντίδραση διήρκεσε 15 λεπτά αλλά πήραμε δείγμα της αντίδρασης και σε ενδιάμεσους χρόνους (t0, t1, t3, t6, t15) προκειμένου να έχουμε την δυνατότητα να μελετήσουμε την πορεία της.



Για να επιτευχθεί αυτό σε κάθε μέρος της αντίδρασης του εκάστοτε χρόνου γίνονταν προσθήκη μεθανόλης προκειμένου να σταματήσει η αντίδραση ακαριαία. Στην συνέχεια μέσω HPLC έγινε μέτρηση της συγκέντρωσης της ελαιοευρωπαϊνης που απέμεινε ύστερα από την ενζυμική αντίδραση στον εκάστοτε χρόνο. Για την διεξαγωγή αξιόπιστων συμπερασμάτων για την ενζυμική αντίδραση πραγματοποιήθηκαν τρεις τεχνικές επαναλήψεις της διαδικασίας (3 ενζυμικές αντιδράσεις) για το φυτό 6. Ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν και με πρωτεϊνικό εκχύλισμα φυτού που δεν έγινε αποσιώπηση κάποιου γονιδίου αλλά είχε υποστεί τον χειρισμό VIGS με άδειο πλασμιαδικό φορέα p.TRV2 (Control). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η ίδια με αυτή για το φυτό 6 και οι ενζυμικές αντιδράσεις αναλύθηκαν μέσω HPLC. Όπως βλέπουμε παρακάτω, στην εικόνα 3.11, σε ορισμένο χρόνο  $t_6$ , από την έναρξη της αντίδρασης, το φυτό 6 παρουσιάζει μειωμένη ενζυμική αντίδραση κατά 70% σε σχέση με το φυτικό δείγμα control. Με Bradford επιβεβαιώθηκε ότι τα πρωτεϊνικά εκχυλίσματα που χρησιμοποιήθηκαν στις ενζυμικές αντιδράσεις ήταν σε ισοποσότητες (1.5 μg).



**Εικόνα 3.11:** Στο διάγραμμα της εικόνα a απεικονίζεται για δεδομένο χρόνο  $t_6$  η μειωμένη ενζυμική αντίδραση του φυτού 6 VIGS (κόκκινη στήλη) κατά 70 % σε σχέση με δείγμα από untreated φυτό (μπλε στήλη).

## 4. Συζήτηση

Στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, έχουν εκπονηθεί αξιοσημείωτες ερευνητικές μελέτες σχετικά με το δένδρο της ελιάς, ένα φυτό ιδιαίτερης οικονομικής, παραγωγικής και διατροφικής αξίας. Κύριος άξονας της εργαστηριακής έρευνας, αποτελεί η μελέτη και κατανόηση λειτουργίας του αμυντικού συστήματος της ελιάς, καθώς και των σημαντικότερων παραγόντων που εμπλέκονται στους μηχανισμούς άμυνας.

Έχει διαπιστωθεί πως τα σεκοϊριδοειδή αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες βιοδραστικών ουσιών στην ελιά. Συγκεκριμένα, ιδιαίτερο ενδιαφέρον μελέτης προκαλεί η υποκατηγορία των ολεοσιδίων, που απαντώνται αποκλειστικά στην οικογένεια των Oleaceae, με κύριαρχο γλυκοζίτη την ελαιουρωπαϊνή, η οποία συμμετέχει σε ένα δυναμικό **δυναδικό σύστημα** άμυνας της ελιάς. (Konno et al., 1999) Το σύστημα αυτό έχει μελετηθεί εκτενώς και γνωρίζουμε ότι αποτελείται από τους εξής δυο παράγοντες, από τον γλυκοζίτη-ελαιουρωπαϊνή η οποία αποθηκεύεται στο χυμοτόπιο ή στο κυτταρόπλασμα σε αδρανή μορφή (Konno et al., 1999), και το ένζυμο OeGLU, μια εξειδικευμένη β-γλυκοσιδάση που εντοπίζεται στον πυρήνα του κυττάρου (Koudounas et al., 2017), όπως επιβεβαιώσαμε σε προηγούμενες ερευνητικές εργασίες. Όταν το φυτικό κύτταρο καλείται να ανταπεξέλθει σε δυσμενείς καταστάσεις που προκαλούνται είτε από εισβολείς, είτε από αβιοτικούς παράγοντες, διαπιστώθηκε ότι το ένζυμο OeGLU απογλυκοζυλιώνει εξειδικευμένα την ελαιουρωπαϊνή (Koudounas et al., 2015, 2017) μετατρέποντάς την, στην τοξική άγλυκη μορφή της.

Λόγω του ιδιαίτερου αυτού αμυντικού συστήματος στην ελιά και των ποικίλων ιδιοτήτων της ελαιουρωπαϊνής ως φαρμακευτικής ουσίας μελετήσαμε ενδελεχώς το ένζυμο OeGLU, με πολύπλευρες προσεγγίσεις. Εφαρμόζοντας κλασσικές μεθόδους γενετικής διαπιστώθηκε η εξειδικευμένη δράση καταβολισμού της OeGLU, έναντι της ελαιουρωπαϊνής. (Koudounas et al., 2015, 2017)

Στην παρούσα ερευνητική εργασία, έγινε μοριακή ανάλυση σε ιστούς φυτών που εφαρμόστηκε μια τεχνική **ανάστροφης γενετικής**, η μέθοδος **VIGS** (Virus Induced Gene Silencing) για την αποσιώπηση του ενδογενούς γονιδίου της β-γλυκοσιδάσης OeGLU της ελιάς.

Παράλληλα, ελέγχθηκαν μοριακά, φυτά στα οποία έγινε αποσιώπηση του γονιδίου OePDS τα οποία αποτέλούσαν τα φυτά-μάρτυρες της διαδικασίας (VIGS).

Χρησιμοποιήθηκαν τεχνικές για την ποσοτικοποίηση της έκφρασης των προς σίγηση γονιδίων ώστε να διαπιστώσουμε το ποσοστό επιτυχίας της αποσιώπησης, όπως Semi-Quantitative PCR, RT-qPCR και HPLC ανάλυση.

Από δημοσιεύσεις πειραματικών εργασιών σχετικών με την αποσιώπηση του γονιδίου PDS, διαπιστώθηκε πως επηρεάζεται ένα κρίσιμο στάδιο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης των καροτενοειδών με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός λευκού φαινοτύπου στα φυτά που έγινε σίγηση του γονιδίου. (Senthil-Kumar et al.,2017) Ομοίως, οι φαινοτυπικές ενδείξεις που παρατηρήθηκαν στα φυτά ελιάς που είχαμε στο εργαστηριό μας, (OePDS VIGS) ήταν ενθαρρυντικές με ευκρινή εμφάνιση λευκών φύλλων-photobleaching , όπως διαπιστώθηκε και σε αντίστοιχα πειράματα VIGS για το γονίδιο PDS σε φυτά καπνού. (Qin et al., 2007) Σημαντικό γεγονός στην εξέλιξη του πειράματος, ήταν ο μικρός αριθμός φυτών που είχαμε εμφάνιση του λευκού φαινοτύπου και παράγοντες που επηρέασαν πιθανώς, ήταν οι θάλαμοι ανάπτυξης των φυτών-VIGS όπου μπορεί να μην παρείχαν κατάλληλο φωτισμό, ή ακόμη το ίδιο φυτό της ελιάς που είναι ένας δύσκολος φυτικός ιστός. Επίσης, η μέθοδος των VIGS, είναι πιθανό, να μην απέδωσε το ίδιο αποτελεσματικά όπως σε άλλα φυτικά είδη, όπως ο καπνός (Kumagai et al.,1995) ενώ τέλος και η χρονική περίοδος που εφαρμόστηκε η μέθοδος μπορεί να μην ήταν επαρκής για την επιτυχή σίγηση του OePDS στην ελιά. Με βάση τον φαινότυπο που είχαμε βέβαια, που μας επιβεβαίωσε την σίγηση του OePDS, προχωρήσαμε σε μοριακή ανάλυση των φυτικών δειγμάτων που είχαμε στην διαθεσή μας. Από το semi-quantitative τα αποτελέσματα δεν ήταν ενθαρρυντικά για όλα τα δείγματα παρά μόνο για τα φυτά plant2, plant 4, plant6 στα οποία παρατηρήθηκε χαμηλότερη έκφραση. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε Q-PCR για τα τρία αυτά φυτικά δείγματα και διαπιστώσαμε ότι τα plant4, plant 6 πλησιάζουν εξαιρετικά την μέτρηση του φυτού-control γεγονός που μας διαψεύδει την επιτυχή αποσιώπηση του OePDS στα δυο αυτά φυτά. Για το plant 2 καταλήξαμε ότι πιθανώς, έχει πραγματοποιηθεί κάποιος λανθασμένος χειρισμός στην πειραματική διαδικασία και κρίνεται απαραίτητο να επαναληφθεί η μοριακή ανάλυση για την διαπίστωση της αποσιώπησης του OePDS.

Παράλληλα, εφαρμόσαμε την μέθοδο VIGS για την σίγηση του γονιδίου ChLH που εμπλέκεται άμεσα με το βιοσυνθετικό μονοπάτι των χλωροφυλλών. Όπως παρατηρήθηκε σε πειραματικές δημοσιεύσεις, συγκεκριμένα για φυτά καπνού, η σίγηση του γονιδίου προκαλεί την εμφάνιση κιτρινίσματος στα φύλλα-yellow phenotype (Hiriart et al.,2003) Στα φυτά ελιάς του εργαστηρίου μας στα οποία εφαρμόσαμε την μέθοδο VIGS για το συγκεκριμένο γονίδιο, επίσης παρατηρήθηκε όπως βλέπουμε παραπάνω στις εικόνες 3.1B, 3.2B ο φαινότυπος αυτός (yellow phenotype) και μένει πλέον να διαπιστωθεί μοριακά αν έχει επιτευχθεί και σε τι ποσοστό η αποσιώπηση του γονιδίου ChLH.

Πραγματοποιήθηκε επίσης, ενδεδειγμένη μοριακή ανάλυση στα φυτά OeGLU-VIGS. Στα φυτά αυτά δεν είχαμε κάποιο συγκεκριμένο- αναμενόμενο φαινότυπο ώστε να μας ενθαρρύνει για την επιτυχή σίγηση του γονιδίου OeGLU, για τον λόγο αυτό προχωρήσαμε σε μοριακό έλεγχο των φυτών OeGLU-VIGS. Το γονίδιο OeGLU εμπλέκεται στην άμυνα του φυτού της ελιάς και τον εξειδικευμένο καταβολισμό της ελαιοευρωπαϊκής όπως έχει διαπιστωθεί. (Koudounas et al., 2015, 2017)

Τα πρώτα αποτελέσματα από το Semi-Quantitative PCR έδειξαν μοριακά την επιτυχία της μεθόδου VIGS για την σίγηση του γονιδίου OeGLU. Από το RT-qPCR διαπιστώθηκε ότι τα αποτελέσματα συνάδουν με τα αποτελέσματα που είχαμε από το semi-Q και εντοπίσαμε τέσσερα τουλάχιστον φυτικά δείγματα (plant3, plant4, plant6, plant9) με αξιόλογο ποσοστό αποσίωπησης του γονιδίου OeGLU, με αποτέλεσμα, για το φυτό 6 συγκεκριμένα που είχαμε μέχρι και 95% μείωση της έκφρασης, να πραγματοποιήσουμε στη συνέχεια και πρωτεϊνική ανάλυση μέσω HPLC. Έγιναν τρεις επαναλήψεις, για ορισμένο χρόνο t6, αντιδράσεων πρωτεϊνικού εκχυλίσματος του φυτικού δείγματος 6 έναντι ελαιοευρωπαϊκής, και διαπιστώθηκε κατά 70% μειωμένη ενζυμική αντίδραση (Εικόνα 3.11).

Συνοψίζοντας τα παραπάνω δεδομένα που συλλέξαμε κατά τη διάρκεια των μοριακών χειρισμών σε φυτά VIGS καταλήγουμε στα εξής συμπεράσματα. Εφαρμόζοντας σε νεαρά φυτά ελιάς την μέθοδο αναστροφής γενετικής VIGS, αποδεικνύεται μέσω και αυτής της προσέγγισης (όπως και στην δημοσίευση των Koudounas et al., 2015) ότι **η OeGLU είναι το εξειδικευμένο ένζυμο που δρα έναντι της ελαιοευρωπαϊκής της ελιάς**. Όπως είδαμε στα παραπάνω γραφήματα στην εικόνα 3.11, η σίγηση του γονιδίου OeGLU είχε άμεση επίδραση στην ενζυμική αντίδραση- καταβολισμού της ελαιοευρωπαϊκής (μείωση κατά 70%). Καταλήγοντας, αν και το γονιδίωμα της ελιάς δεν έχει ακόμα πλήρως καταγραφεί, γεγονός που θα λειτουργούσε προς όφελος των ερευνητικών εργασιών μας, φαίνεται πως οι πειραματικές προσεγγίσεις και τα εργαλεία που εφαρμόζουμε για την μελέτη του βιοσυνθετικού μονοπατιού της ελαιοευρωπαϊκής στην ελιά αποδίδουν σημαντικά δεδομένα. Για την διαμόρφωση μιας εμπειριστομένης εικόνας σχετικά με το συγκεκριμένο βιοσυνθετικό μονοπάτι, κρίνεται απαραίτητη η μελέτη και ανεύρεση νέων γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση της ελαιοευρωπαϊκής.

Αξιοσημείωτα δεδομένα επιτυχίας της μεθόδου VIGS, αναφέρονται και στην ερευνητική ανάλυση που πραγματοποιήθηκε στο φαρμακευτικό φυτό που είναι πηγή σπουδαίων αντικαρκινικών ουσιών, (Van der Heijden et al., 2004) το *Catharanthus roseus*. (Salim V, DeLuca et al., 2013)

Οι ερευνητές επικεντρώθηκαν στην μελέτη των γονιδίων που εμπλέκονταν στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της σεκολογανίνης (secologanin) εξίσου σημαντικής φαρμακευτικής ουσίας που ανήκει στην κατηγορία των ιριδοειδών, με σκοπό την στοχευμένη υπερ-παραγωγή βιοτεχνολογικά της ουσίας αυτής, που είναι βασική και για πολλά φάρμακα αντιμετώπισης της λευχαιμίας και των λεμφωμάτων.

Παρότι αρκετά γονίδια που εμπλέκονται στο μονοπάτι έχουν απομονωθεί, και η λειτουργία τους έχει χαρακτηριστεί μοριακά, παρέμεναν κάποια των οποίων ο ρόλος τους δεν είχε πλήρως διασαφηνιστεί κατά την βιοσύνθεση της σεκολογανίνης. (O'Connor and Maresh, 2006; El-Sayed and Verpoorte, 2007; Oudin et al., 2007) Βιοπληροφορική ανάλυση και μελέτη μεταξύ και άλλων φυτών όπως το *L.japonica*, ανέδειξε τρία γονίδια που πιθανώς εμπλέκονταν άμεσα στο βιοσυνθετικό μονοπάτι της σεκολογανίνης και οι ερευνητές, προχώρησαν στην σιγήσής τους με την μέθοδο **VIGS** στο φυτό *C.roseus*. Με την ανάλυση των δεδομένων μετέπειτα, διαπιστώθηκε ότι από την αποσιώπηση και των τριών γονιδίων, είχε προκληθεί αξιοσημείωτη μείωση παραγωγής σεκολογανίνης σε **μια** σειρά φυτών **VIGS**, στα οποία είχε αποσιωπηθεί ένα συγκεκριμένο γονίδιο από τα τρία, γεγονός που συνέβαλε στην αποσαφήνιση των παραγόντων που εμπλέκονταν στη βιοσύνθεση της σεκολογανίνης.(Salim V,DeLuca et al., 2013)

Από τα στοιχεία που έχουν, λοιπόν, συλλεχθεί μέχρι στιγμής, μπορούμε να συνεχίσουμε και να διευρύνουμε την μελέτη σε επιμέρους παράγοντες-γονίδια που πιθανώς να εμπλέκονται στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της ελαιοευρωπαϊνης ομοίως, χρησιμοποιώντας την τεχνική **VIGS** ώστε να κατανοήσουμε πλήρως τα στάδια σύνθεσης αυτής της σπουδαίας φαρμακευτικής ουσίας. Η μέθοδος αυτή τέλος, μας δίνει την δυνατότητα να τη χρησιμοποιήσουμε ως μια χρήσιμη τεχνική, για να επιβεβαιώσουμε σχέσεις εξειδίκευσης μεταξύ και άλλων ενζύμων-πιθανού υποστρώματος, όπως έγινε με την ελαιοευρωπαϊνη και το ένζυμο OeGLU, ιδιαίτερα σημαντικού αμυντικού μηχανισμού για το φυτό της ελιάς.

## 5. Βιβλιογραφία

- Alvarado, V. and Scholthof, H.B.** (2009) Plant responses against invasive nucleic acids: RNA silencing and its suppression by plant viral pathogens. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20, 1032–1040
- Amiot M. J., , Annie Fleuriet, Jean Jacques Macheix** (1986) *Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation*, *J. Agric. Food Chem.*,34: 823–826
- Baidez A. G., et al.,** (2007) *Dysfunctionality of the Xylem in Olea europaea L. Plants Associated with the Infection Process by Verticillium dahliae Kleb. Role of Phenolic Compounds in Plant Defense Mechanism.* *J. Agric. Food Chem.*, 55 (9): 3373–3377
- Barbaro, B.; Toietta, G.; Maggio, R.; Arciello, M.; Tarocchi, M.; Galli, A.; Balsano, C.** *Effects of the Olive-Derived Polyphenol Oleuropein on Human Health.* *Int. J. Mol. Sci.* **2014**, 15, 18508-18524.
- Becker, A. and Lange, M.** (2010) *VIGS genomics goes functional.* *Trends Plant Sci.* 15, 1–4
- Bianco A, et al.,**(1993) *Isolation of cornoside from Olea europaea and its transformation into halleridone.* *Phytochemistry* 32: 455–457.
- Bulotta S., et al.,** (2013). *Biological activity of oleuropein and its derivatives*, In: Ramawat KG, Mérillon JM, eds. *Natural products* . Berlin/Heidelberg: Springer, 3605–3638.
- Burch-Smith, T.M. et al.** (2004) *Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants.* *Plant J.* 39,734–746
- Burch-Smith, T.M. et al.** (2006) *Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis.* *Plant Physiol.* 142, 21–27
- Cantarel BL., et al.,** (2009) *The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for glycogenomics.* *Nucleic Acids Res* 37:233–238
- Carrillo-Tripp, J. et al.** (2006) Use of geminiviral vectors for functional genomics. *Curr. Opin. Plant Biol.* 9, 209–215
- Damtoft, S., et al.** (1993). *"Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae.* *Phytochemistry* 34(5): 1291-1299.
- Di Stilio, V.S.** (2011) *Empowering plant evo-devo: virus induced gene silencing validates new and emerging model systems.* *BioEssays* 33, 711–718
- Dinesh-Kumar, S.P. et al.** (2003) *Virus-induced gene silencing.* In *Plant Functional Genomics* (Grotewold, E., ed.), pp. 287–293, Humana Press
- El-Sayed, M. and Verpoorte, R** (2007) *Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation.* *Phytochem. Rev.* 6, 277–305.
- Gronlund, M. et al.** (2010) *Protocol: using virus-induced gene silencing to study the arbuscular mycorrhizal symbiosis in Pisum sativum.* *Plant Methods* 6, 28
- Gutierrez-Rosales F., Romero, M.P., Casanovas, M., Motilva, M.J, and Minguéz-Mosquera, M.I.**(2010) *Metabolites Involved in Oleuropein Accumulation and Degradation in Fruits of Olea europaea L.: Hojiblanca and Arbequina Varieties.* *Journal of agricultural and food chemistry* 60, 4348-4358
- Henrissat B.,** (1991) *A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.* *Biochem J* 280:309–316
- Henrissat B., Davies G.,** (1997) *Structural and sequence-based classification of glycosyl hydrolases.* *Curr Opin Struct Biol* 7:637–644  
*in Catharanthus roseus alkaloid biosynthesis.* *Phytochem. Rev.* 6 259–276.
- Jean-Baptiste Hiriart, Eva-Mari Aro, and Kirsi Lehto** *Dynamics of the VIGS-Mediated Chimeric Silencing of the Nicotiana benthamiana ChlH Gene and of the Tobacco Mosaic Virus Vector.* The American Phytopathological Society 2003

- Jean-Baptiste Hiriart\***, **Kirsi Lehto**, **Esa Tyystjärvi**, **Teemu Junttila** and **Eva-Mari Aro** *Suppression of a key gene involved in chlorophyll biosynthesis by means of virus-inducing gene silencing* Department of Biology, Laboratory of Plant Physiology and Molecular Biology, University of Turku, Tykistokatu, *Plant Molecular Biology* **50**: 213–224, 2002.
- Jones P., Vogt T.** *Glycosyltransferases in secondary plant metabolism: tranquilizers and stimulant controllers* *Planta* 2001 pp164-174
- Jones, A.L. et al.** (1998) De novo methylation and co-suppression induced by a cytoplasmically replicating plant RNA virus. *EMBO J.* **17**, 6385–6393
- Jones, L. et al.** (1999) RNA–DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* **11**, 2291–2302
- Josh Haimes, Melissa Kelley, Dharmacon, now part of GE Healthcare, Lafayette, CO, USA.** *Demonstration of a  $\Delta\Delta Cq$  Calculation Method to Compute Relative Gene Expression from qPCR Data* GE Healthcare
- Konno K., Hirayama, C., Yasui, H., and Nakamura, M.** (1999). *Enzymatic activation of oleuropein: a protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree.* Proceedings of the National Academy of Sciences **96**: 9159–9164.
- Koudounas K., et al.,** (2015) *A defence-related Olea europaea  $\beta$ -glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent, J. Exp. Bot.* **66** : 2093-2106.
- Koudounas K., et al.,** (2017) *The C-Domain of Oleuropein  $\beta$ -Glucosidase Assists in Protein Folding and Sequesters the Enzyme in Nucleus.* *Plant Physiology* July 2017, **174** (3) 1371-1383
- Kumagai, M.H. et al.** (1995) *Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA.* *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1679–1683
- Lindbo, J.A. et al.** (1993) *Induction of a highly specific antiviral state in*
- Liu, Y.L., Schiff, M., Marathe, R. & Dinesh-Kumar, S.P.** Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1*-like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J.* **30**, 415–429 (2002).
- Llave, C.** (2010) *Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions.* *Trends Plant Sci.* **15**, 701–707
- Llave, C.** (2010) *Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions.* *Trends Plant Sci.* **15**, 701–707
- Lo Scalzo R., et al.,** (1994). *Olea europaea chemicals repellent to Dacus oleae females.* *Journal of Chemical Ecology* **20**: 1813–1823
- Lu, R. et al.** (2003) *Virus-induced gene silencing in plants.* *Methods* **30**, 296–303
- MacFarlane, S.A.** *Molecular biology of the tobnaviruses.* *J. Gen. Virol.* **80**, 2799–2807 (1999).
- Malik NS, Bradford JM.,** (2006) *Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives.* *Scientia Horticulturae* **110**: 274–278.
- Mantelin, S. et al.** (2011) *The receptor-like kinase SlSERK1 is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato.* *Plant J.* **67**, 459–471
- Mao, Z.C. et al.** (2011) *The new CaSn gene belonging to the snaking family induces resistance against root-knot nematode infection in pepper.* *Phytoparasitica* **39**, 151–164
- Marsilio, V., Lanza B.,** *Characterisation of an oleuropein degrading strain of Lactobacillus plantarum. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity.* *J. Sci. Food Agric.* **76**: 520-524., (1998)
- Molnar, A. et al.** (2010) *Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells.* *Science* **328**, 872–875
- Molnar, A. et al.** (2011) *Silencing signals in plants: a long journey for small RNAs.* *Genome Biol.* **12**, 215
- Morant A. V., et al.,** (2008)  *$\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense.* *Phytochemistry* **69**: 1795–1813
- O'Connor, S.E. and Maresh, J.J.** (2006) *Chemistry and biology of monoterpeneindole alkaloid biosynthesis.* *Nat. Prod. Rep.* **23**, 532–547.
- Obied, H.K., Prenzler, P.D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., and Robards, K.** (2008) *Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated*

*oleosidic secoiridoids from Olea europaea L.* Natural Product Reports, 25: 1167-1179

DOI: 10.1039/b719736e

**Oudin, A., Courtois, M., Rideau, M. and Clastre, M.** (2007) *The iridoid pathway*

**Panizzi, et al.**, (1960) *Chemical structure of oleuropein, bitter glucoside of olive with hypotensive activity* Gazz. Chim. Ital., 90: 1449-1485.

**Qin, G. et al.** *Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in Arabidopsis by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis.* Cell Res. **17**, 471–482 (2007)

**Qu, F. et al.** (2008) *Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105,14732–14737

**Ratcliff, F., Martin-Hernandez, A.M. & Baulcombe, D.C.** Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *Plant J.* **25**, 237–245 (2001).

**Riachy EL., et al.**, (2011a) *Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality*, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 113: 678-691

**Robertson, D.** (2004) VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 495–519

**Ruiz, M.T. et al.** (1998) *Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing.* Plant Cell 10, 937–946

**Ruiz-Barba, J. L. et al.**, *Bactericidal action of oleuropein extracted from green olives against Lactobacillus plantarum.* Lett. Appl. Microbiol. 12Q 65-68. (1991)

**Salim Vonny, Fang Yu, Joaquin Altarejos and Vincenzo De Luca** (2013) *Virus-induced gene silencing identifies Catharanthus roseus 7-deoxyloganic acid-7-hydroxylase, a step in iridoid and monoterpene indole alkaloid biosynthesis* The Plant Journal (2013) 76, 754–765

**Scofield, S.R. and Nelson, R.S.** (2009) *Resources for virus-induced gene silencing in the grasses.* Plant Physiol. 149, 152–157

**Senthil-Kumar M., Ramegowda, H.V, Mysore, K.S** *Virus-induced gene silencing is a versatile tool for unrevealing the functional relevance of multiple abiotic-stress-responsive genes in crop plants.* Front. Plant Sci., 08 July 2014

**Senthil-Kumar, M. & Mysore, K.S.** *Virus-induced gene silencing can persist for more than 2 years and also be transmitted to progeny seedlings in Nicotiana benthamiana and tomato.* Plant Biotechnol. J. **9**, 797–806 (2011).

**Senthil-Kumar, M. et al.** *A systematic study to determine the extent of gene silencing in Nicotiana benthamiana and other Solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing.* New Phytol. **176**, 782–791 (2007).

**Senthil-Kumar, M., Ramegowda, H.V., Hema, R., Mysore, K.S. & Udayakumar, M.** *Virus-induced gene silencing and its application in characterizing genes involved in water-deficit-stress tolerance.* J. Plant Physiol. **165**, 1404–1421 (2008).

**Tessa M. Burch-Smith, Jeffrey C. Anderson, Gregory B. Martin and S. P. Dinesh-Kumar.** *Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants.* The Plant Journal 2004, 39, 734–746

**Thomas D Schmittgen<sup>1</sup> & Kenneth J Livak.** *Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method,* Nature 2008

*transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance.* Plant Cell 5, 1749–1759

**Vainstein, A. et al.** (2011) *Permanent genome modifications in plant cells by transient viral vectors.* Trends Biotechnol. 29, 363–369

**Van Der Heijden R, Jacobs DI, Snoeijs W, Hallard D, Verpoorte R.** (2004) *The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology* Curr Med Chem. 2004 Mar;11(5):607-28



**Van der Linde, K. et al.** (2011) *Systemic virus-induced gene silencing allows functional characterization of maize genes during biotrophic interaction with Ustilago maydis.* New Phytol. 189, 471–483

**Velásquez, A.C., Chakravarthy, S. & Martin, G.B.** Virus-induced gene silencing (VIGS) in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *J. Vis. Exp.* e1292 (2009).

**Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and Baulcombe, D.** (2003) *An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus.* *The Plant journal* 33, 949-956

**Waterhouse, P.M., Wang, M.-B. & Lough, T.** Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411, 834–842 (2001).

**Yang, Y. et al.** (2010) *Silencing Sl-EBF1 and Sl-EBF2 expression causes constitutive ethylene response phenotype, accelerated plant senescence, and fruit ripening in tomato.* *J. Exp. Bot.* 61, 697–708

**Ziegler-Graff, V., Guilford, P.J. & Baulcombe, D.C.** Tobacco rattle virus RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology* 182, 145–155 (1991).

**Θωμοπούλου Μ.** (2016) *Δυναμικό σύστημα άμυνας ολευρωπαϊνης/β-γλυκοσιδάσης της ελιάς και ομοιόσταση μέσα στο κύτταρο.* Μεταπτυχιακή Μελέτη

**Κουδουνάς Κ.** (2016) *Μοριακή δικτύωση στην ανάπτυξη φυτών.* Διδακτορική Μελέτη.

**Αγγελή Ελισάβετ** (2018) *Ιικό-επαγόμενη αποσιώπηση του ενζύμου β-γλυκοσιδάση της ελιάς σε φυτά ελιάς.* Πτυχιακή Μελέτη

