

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης Περιβάλλοντος



Διδακτορική διατριβή

ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ
ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Ε ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ
(*Olea europaea* L.)

Αίγλη Γεωργιάδου

Λεμεσός, Ιανουάριος 2017

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
Σχολή Γεωτεχνικών Επιστημών και Διαχείρισης Περιβάλλοντος
Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης
Τροφίμων

ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ
ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Ε ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ
(*Olea europaea* L.)

Αίγλη Γεωργιάδου

Λεμεσός, Ιανουάριος 2017

ΕΝΤΥΠΟ ΕΓΚΡΙΣΗΣ

Διδακτορική διατριβή

ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΤΟΥ ΒΙΟΣΥΝΘΕΤΙΚΟΥ ΜΟΝΟΠΑΤΙΟΥ ΤΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ Ε ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ (*Olea europaea* L.)

Παρουσιάστηκε από

Αίγλη Γεωργιάδου

Επιβλέπων καθηγητής: Βασίλειος Φωτόπουλος, Επίκουρος Καθηγητής, ΤΠΚ

Συν-επιβλέπων καθηγητής: Γιώργος Μαγγανάρης, Επίκουρος Καθηγητής, ΤΠΚ

Μέλος συμβουλευτικής επιτροπής: Παναγιώτης Καλαϊτζής, Συντονιστής Σπουδών και Έρευνας, ΜΑΙΧ

Μέλος εξεταστικής επιτροπής: Ανδρέας Κατσιώτης, Καθηγητής, ΤΠΚ

Μέλος εξεταστικής επιτροπής: Άγγελος Πατάκας, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Πατρών

Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Ιανουάριος, 2017

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Αίγλη Γεωργιάδου, Ιανουάριος 2017

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυτικής Παραγωγής του Τμήματος Γεωπονικών Επιστημών, Βιοτεχνολογίας και Επιστήμης Τροφίμων (ΓΕΒΕΤ) του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου (ΤΠΚ). Μετά την ολοκλήρωση της αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στο να καταστεί δυνατή η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέπων Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Βασίλειο Φωτόπουλο και στο συν-επιβλέπων Επίκουρο Καθηγητή Δρ. Γιώργο Μαγγανάρη, που με εμπιστεύτηκαν αναθέτοντάς μου την έρευνα ενός πολύ σημαντικού, ενδιαφέροντος και εξαιρετικά επίκαιρου θέματος. Η καθοδήγηση και επίβλεψή τους, καθώς επίσης και το ενδιαφέρον και οι συστάσεις τους για την επίλυση προβλημάτων συνέβαλαν καθοριστικά στην ολοκλήρωση της διατριβής. Η φιλική τους στάση απέναντί μου και η επικοινωνία μας όλα αυτά τα χρόνια ήταν εξαιρετική, καθιστώντας τη συνεργασία μας πραγματικά ευχάριστη. Επίσης, θα ήθελα να τους ευχαριστήσω για την ανάγνωση και διόρθωση της παρούσας διατριβής, καθώς και των δημοσιεύσεων που υποβλήθηκαν σε διεθνή έγκριτα επιστημονικά περιοδικά.

Για την εκπόνηση και ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν επίσης καθοριστική η συμβολή του Δρ. Παναγιώτη Καλαϊτζή, Συντονιστής Σπουδών και Έρευνας του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων (ΜΑΙΧ), ο οποίος μας παρείχε το φυτικό υλικό της ποικ. 'Κορωνέικης' από τον πειραματικό ελαιώνα του ΜΑΙΧ (Κρήτη, Ελλάδα). Το Δρ. Παναγιώτη Καλαϊτζή, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την αγορά αναλωσίμων και την τεχνική υποστήριξη στην ανάλυση ανοσοαποτύπωσης καθώς επίσης για τη φιλοξενία του στο ΜΑΙΧ για διάρκεια 5 μηνών.

Ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Ειδικό Εκπαιδευτικό Προσωπικό (ΕΕΠ) Δρ. Βλάσιο Γούλα για τη πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε στο προσδιορισμό των τοκοχρωμανολών και τη κριτική ανάγνωση των δημοσιεύσεων. Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στο Δρ. Γεώργιο Κουμπούρη ο οποίος μας παρείχε το φυτικό υλικό των 5 ποικιλιών ('Κορωνέικη', 'Καλαμών', 'Μαυρελιά', 'Καλοκαιρίδα' και 'Λιανολιά Κερκύρας') από το Ινστιτούτο Ελιάς, Υποτροπικών Φυτών και Αμπέλου (Κρήτη, Ελλάδα), καθώς επίσης για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Ελαιοκομίας του Ινστιτούτου κατά τη

διάρκεια 3 μηνών στα πλαίσια εκπόνησης της έρευνάς μου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα το Δρ. Νικόλαο Νικολουδάκη, Ειδικό Εκπαιδευτικό Προσωπικό (ΕΕΠ), για τη πολύτιμη βοήθεια που μου παρείχε στην ανάλυση ανοσοαποτύπωσης, καθώς και την πολύ καλή φιλία που αναπτύξαμε μέσα από αυτή την συνεργασία. Ευχαριστίες θέλω να εκφράσω επίσης στη Δρ. Παναγιώτα Φιλίππου που με βοήθησε στα πρώτα βήματα μου και ακόμα και σήμερα όταν τη χρειαστώ είναι πρόθυμη να με βοηθήσει.

Δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τα μέλη της ομάδας του Επίκουρου Καθηγητή Δρ. Βασίλειου Φωτόπουλου και όλους όσους μοιράστηκαν μαζί μου όλο αυτό τον καιρό τον ίδιο εργαστηριακό χώρο λόγω της συνεργασίας, το ευχάριστο κλίμα αλλά και των φιλικών σχέσεων που αναπτυχθήκαν κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου.

Θα ήταν παράβλεψη μου να μην ευχαριστήσω όλους τους φίλους μου και ιδιαίτερα τη φίλη μου Αναστασία Κουτζουράδη καθώς και τον αρραβωνιαστικό μου Λέκτορα Δρ. Ηρόδοτο Ηροδότου για τη συμπαράσταση και την αγάπη τους καθόλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Τις θερμές μου ευχαριστίες οφείλω στο Ίδρυμα Α.Γ. Λεβέντη για την υποτροφία που μου παρείχε στα 2 έτη των σπουδών μου.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στους γονείς μου για την ηθική και την οικονομική υποστήριξη και την αγάπη, που μου προσέφεραν όλα τα χρόνια των σπουδών μου και όχι μόνο έτσι ώστε να περατωθούν με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Τους ευχαριστώ γιατί πίστεψαν στις δυνάμεις μου και με εμπύχωναν σε κάθε προσπάθεια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιταμίνη E είναι μία ομάδα ενώσεων που είναι γνωστές ως τοκοχρωμανόλες και είναι ένα απαραίτητο λιποδιαλυτό αντιοξειδωτικό στη διατροφή του ανθρώπου. Οι τοκοχρωμανόλες είναι μία μικρή ομάδα φυσικών προϊόντων τα οποία συντίθενται μόνο από φωτοσυνθετικούς οργανισμούς και συμπεριλαμβάνουν δύο υποομάδες (τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες). Κάθε υποομάδα αποτελείται από τέσσερις μορφές (α -, β -, γ - και δ -), αποδίδοντας ένα σύνολο από οκτώ μορφές. Η βιταμίνη E έχει ισχυρή αντιοξειδωτική ικανότητα και βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε καρπούς ελιάς. Στην παρούσα εργασία, χαρτογραφήθηκε το βιοσυνθετικό μονοπάτι της βιταμίνης E στον καρπό της ελιάς, σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια. Για αυτό το σκοπό, χρησιμοποιήθηκε ένας συνδυασμός φυσιολογικών, αναλυτικών, βιοχημικών και μοριακών προσεγγίσεων. Για σκοπούς υλοποίησης της διδακτορικής εργασίας πραγματοποιήθηκαν τέσσερα ανεξάρτητα και ταυτόχρονα αλληλένδετα πειράματα.

Στο πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε η εκχύλιση RNA από καρπό ελιάς με διάφορες μεθόδους, όπως με τη χρήση του αντιδραστηρίου τριζόλης, την απομόνωση και κατακρήμνιση με χλωριούχο λίθιο (LiCl) και άλλες συνδυασμένες μεθόδους, με απώτερο σκοπό την εκτίμηση της ποιότητας/ποσότητας και απόδοσης του RNA. Η απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από φυτικούς ιστούς ελιάς, είναι μια ιδιαίτερα επίπονη και χρονοβόρα διαδικασία, καθώς οι ιστοί αυτοί είναι πλούσιοι σε πολυσακχαρίτες και πολυφαινολικές ενώσεις. Το πείραμα περιγράφει το επιλεγμένο πρωτοκόλλο εκχύλισης ολικού RNA, το οποίο επιτρέπει την απομόνωση ολικού RNA ικανοποιητικής ποσότητας και υψηλής ποιότητας από μικρές ποσότητες ιστού καρπών ελιάς. Η ενίσχυση της αλληλουχίας του δομικού γονιδίου αναφοράς *OeUBQ2* από απομονωμένο RNA, μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR) υποστηρίζει περαιτέρω την απόδοση του προτεινόμενου πρωτοκόλλου και τη χρήση του για μετέπειτα μοριακές εφαρμογές. Επιπλέον, έχει διαφανεί ότι η προαιρετική επεξεργασία του απομονωθέντος νουκλεϊκού οξέος με το ένζυμο RNase A παρέχει τη δυνατότητα απομόνωσης επαρκούς ποσότητας και ικανοποιητικής ποιότητας γενωμικού DNA για την επακόλουθη διεξαγωγή αναλύσεων PCR, όπως αποδεικνύεται από την ενίσχυση της αλληλουχίας των γονιδίων αναφοράς με τη χρήση PCR, χρησιμοποιώντας ως πρότυπο γενωμικό DNA. Το βελτιστοποιημένο αυτό πρωτόκολλο

επιτρέπει την εύκολη, γρήγορη και οικονομική απομόνωση RNA υψηλής ποιότητας από μικρές ποσότητες ιστών, όπως ο καρπός ελιάς.

Στο δεύτερο πείραμα επιχειρήθηκε η πλήρης χαρτογράφηση του βιοσυνθετικού μονοπατιού της βιταμίνης E στον καρπό της ελιάς (ποικ. 'Κορωνέικη'). Καρποί ελιάς συγκομίστηκαν σε δεκαεπτά διαδοχικά αναπτυξιακά στάδια, από τα μέσα Ιουνίου μέχρι τα τέλη Ιανουαρίου και συγκεκριμένα 6-38 εβδομάδες μετά την άνθιση (EMA). Τα αποτελέσματα έδειξαν διαφορική έκφραση των εξεταζόμενων γονιδίων μεταξύ των 6-38 EMA και μεγαλύτερος βαθμός ρύθμισης (επαγωγής/καταστολής) της γονιδιακής έκφρασης καταγράφηκε στα αρχικά και ενδιάμεσα γονίδια του βιοσυνθετικού μονοπατιού (*VTE5*, *CHL P*, *HPPD*, *VTE2*, *HGGT* και *VTE3*) σε σχέση με τα υπόλοιπα γονίδια (*VTE1* και *VTE4*). Ειδικότερα, τα γονίδια *HGGT* και *VTE2* παρουσίασαν καταστολή της γονιδιακής έκφρασης σε όλες τις εβδομάδες μετά την άνθιση (EMA). Τα αποτελέσματα από τη συνολική εκτίμηση των επιπέδων των μεταβολιτών έδειξαν ότι τα πρώτα και τα ενδιάμεσα στάδια της ανάπτυξης (6-22 EMA) έχουν υψηλότερα επίπεδα μεταβολιτών (τοκοφερόλες και τοκοτριενόλες) σε σύγκριση με τα τελικά στάδια (ξεκινώντας από 24 EMA), όπου ωριμάζει ο καρπός ελιάς πάνω στο δένδρο. Τα επίπεδα α-τοκοφερόλης (16,15 – 32,45 mg/100 g v.β.) ήταν σημαντικά υψηλότερα (μέχρι και 100 φορές) από εκείνα των β-, γ- και δ-τοκοφερολών (0,13 – 0,25 mg/100 g v.β., 0,13 – 0,33 mg/100 g v.β., 0,14 – 0,28 mg/100 g v.β., αντίστοιχα). Από τις τοκοτριενόλες, μόνο η γ-τοκοτριενόλη ανιχνεύθηκε σε χαμηλά επίπεδα. Συνολικά, οι καρποί ελιάς (ποικ. 'Κορωνέικη') περιέχουν σημαντικά υψηλότερα επίπεδα βιταμίνης E μέχρι τις 22 EMA σε σύγκριση με τα τελικά στάδια, σε στενή αντιστοιχία με το προφίλ έκφρασης του *VTE5*, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως ένα γονίδιο δείκτης λόγω της σημασίας του στη βιοσύνθεση της βιταμίνης E. Εξ'όσων γνωρίζουμε, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που διερευνά το πλήρες βιοσυνθετικό μονοπάτι της βιταμίνης E σε δενδρώδη καλλιέργεια, όπως η ελιά, που συνδέει ανάλυση μοριακής γονιδιακής έκφρασης με την περιεκτικότητα σε τοκοχρωμανόλες.

Για το τρίτο πείραμα, διερευνήθηκε η χρονική βιοσύνθεση των τοκοχρωμανολών στον καρπό ελιάς (ποικ. 'Κορωνέικη') κατά τη διάρκεια ανάπτυξης και ωρίμανσης πάνω στο δένδρο για τρία διαδοχικά έτη, με ένα συνδυασμό αναλυτικών, μοριακών και αντιοξειδωτικών τεχνικών, συμπεριλαμβανομένου βιοπληροφορικής ανάλυσης και ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών (western blot). Καρποί ελιάς

συγκομίστηκαν από οκτώ αναπτυξιακά στάδια (10-30 εβδομάδες μετά την άνθιση) σε τρία διαδοχικά έτη. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι οι κλιματικές συνθήκες επηρέασαν τα σχετικά επίπεδα των μεταγραφημάτων των βιοσυνθετικών ενζύμων της βιταμίνης E. Στο 1^ο έτος παρατηρήθηκε μια γενική καταστολή που οδηγήθηκε σε επαγωγή (με εξαίρεση VTE5) στο 3^ο έτος, που πιθανότητα συσχετίζεται με μείωση των επιπέδων βροχόπτωσης και υψηλότερης θερμοκρασίας κατά το 3^ο έτος, ιδιαίτερα κατά τα τελευταία αναπτυξιακά στάδια του καρπού. Μια σταδιακή μείωση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνη VTE5 ανιχνεύθηκε κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του καρπού του κάθε έτους. Η ενδεικτική μείωση σημειώθηκε μετά από 16 EMA. Η α-τοκοφερόλη ήταν η μεγαλύτερη σε αφθονία από όλους τους μεταβολίτες με μέσο ποσοστό 96,82%, 91,13%, και 88,53% (κατά τη διάρκεια του 1^{ου}, 2^{ου}, και 3^{ου} έτους, αντίστοιχα) της συνολικής περιεκτικότητας σε βιταμίνη E στις 10-30 EMA. Οι συγκεντρώσεις της α-τοκοφερόλης αποκάλυψαν ένα γενικό μοτίβο μείωσης, τόσο κατά τη διάρκεια ωρίμανσης του καρπού της ελιάς πάνω στο δένδρο όσο και στα 3 έτη, που συνοδεύεται από μια παράλληλη μείωση της ολικής αντιοξειδωτικής ικανότητας του ελαιόκαρπου. Αντίθετα, όλες οι άλλες τοκοχρωμανόλες έδειξαν ένα αντίστροφο μοτίβο με τα χαμηλότερα επίπεδα να καταγράφονται κατά τη διάρκεια του 1^{ου} έτους. Είναι πιθανό ότι, στην προσπάθεια άμυνας ενάντια στις συνθήκες έλλειψης νερού και αύξησης της θερμοκρασίας του αέρα, τα μεταγραφήματα των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της βιταμίνης E (με εξαίρεση VTE5) να ήταν σε επαγωγή στον καρπό της ελιάς, και πιθανώς να οδήγησαν στο μπλοκάρισμα/απενεργοποίηση του μονοπατιού μέσω του ρυθμιστικού μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης.

Στο τέταρτο πείραμα πραγματοποιήθηκε σύγκριση της έκφρασης των γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της βιταμίνης E, την περιεκτικότητα των τοκοχρωμανολών και την αντιοξειδωτική ικανότητα πέντε ποικιλιών ελιάς (ποικ. 'Κορωνέικη', 'Καλαμών', 'Μαυρελιά', 'Καλοκαιρίδα' και 'Λιανολιά Κερκύρας') με βάση το εξωτερικό μέγεθος και την ωριμότητα του καρπού. Η γονιδιακή έκφραση επηρεάζεται από το μέγεθος του καρπού και την ωριμότητα της υπό εξέταση ποικιλίας. Επίσης, η γονιδιακή έκφραση έδειξε μία γενική καταστολή (στο βαθμό ωριμότητας πρασινοκίτρινο) των γονιδίων VTE5, CHL P, HPPD, VTE2 και HGGT κατά την διάρκεια αύξησης του μεγέθους και της ωριμότητας του καρπού σε όλες τις ποικιλίες που εξετάστηκαν, με κάποιες εξαίρεση. Η α-τοκοφερόλη ήταν η μεγαλύτερη σε αφθονία τοκοχρωμανόλη, με μέσο όρο 84,04%. Οι υπόλοιπες τοκοφερόλες ήταν το

8,63%, και οι τοκοτριενόλες ήταν το 7,33%, για όλες τις ποικιλίες. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε τοκοχρωμανόλες καταγράφηκε στις ποικιλίες ‘Καλοκαιρίδα’ και ‘Λιανολιά Κερκύρας’ (με μέσο όρο 24,13 mg/100g v.β. και 15,86 mg/100g v.β., αντίστοιχα), σημαντικά μεγαλύτερη από την ποικιλία ‘Κορωνέικη’ (κατά μέσο όρο 14,07 mg/100g v.β.). Η υψηλή περιεκτικότητα σε τοκοχρωμανόλες σχετιζόταν με το υψηλό επίπεδο του γονιδίου της *HPPD*.

Συμπερασματικά, η ποσότητα της βιταμίνης E είναι αυξημένη μέχρι το στάδιο σπασίματος του χρώματος (22 EMA) του καρπού της ελιάς και μετά άρχισε να μειώνεται. Αυτό σχετίζεται άμεσα με το γονίδιο *VTE5*, το οποίο βρίσκεται σε επαγωγή μέχρι το στάδιο σπασίματος του χρώματος (22 EMA) και ακολούθως καταστέλλεται. Κατά τη διάρκεια των τριών ετών βρέθηκε ότι η θερμοκρασία και η βροχόπτωση συνιστούν παράγοντες που επηρεάζουν το βιοσυνθετικό μονοπάτι της βιταμίνης E. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και μειώνεται η βροχόπτωση, μειώνεται η ποσότητα της βιταμίνης E, η πρωτεΐνη *VTE5* και η αντιοξειδωτική ικανότητα του καρπού της ελιάς, ενώ τα γονίδια από καταστολή οδηγούνται σε επαγωγή (εκτός από το γονίδιο *VTE5*). Στη προσπάθεια άμυνας κατά της αύξησης της θερμοκρασίας και μείωσης της βροχόπτωσης, το φυτό πιθανότατα επάγει την έκφραση των πλείστων γονιδίων που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση της βιταμίνης E, το οποίο ενδεχομένως οδηγεί σε μπλοκάρισμα/απενεργοποίηση του μονοπατιού μέσω του ρυθμιστικού μηχανισμού αρνητικής ανατροφοδότησης και συνάμα μειώνει τις τοκοχρωμανόλες, την ποσότητα της πρωτεΐνης *VTE5* και την αντιοξειδωτική ικανότητα. Τέλος, παρατηρήθηκε ότι η περιεκτικότητα της βιταμίνης E, η έκφραση των γονιδίων και η αντιοξειδωτική ικανότητα εξαρτώνται από την ποικιλία, το στάδιο ωρίμανσης και το μέγεθος του καρπού.

Λέξεις κλειδιά: *Olea europaea* L., γονιδιακή έκφραση, τοκοφερόλες, τοκοτριενόλες, τοκοχρωμανόλες

ABSTRACT

Vitamin E is a group of eight fat-soluble compounds known as tocopherols and it is an essential lipid-soluble antioxidant in the human diet. Tocopherols are a small group of natural products synthesized exclusively by photosynthetic organisms and are divided into two groups (tocopherols and tocotrienols). Each group contains four forms identified by prefixes α -, β -, γ -, and δ -, yielding a total of eight forms. Vitamin E has strong antioxidant capacity and is found in high concentrations in olive fruits, with previously demonstrated protective effect against cancer, diabetes, cardiovascular and neurological diseases. The current dissertation in biosynthetic pathway of vitamin E in olive fruits was mapped. To this extent, a combination of physiological, analytical, biochemical, and molecular approaches for a total of four independent, yet interrelated, experiments were employed.

The first experiment included RNA extraction from the olive fruit, using various methods (such as the use of the trizol reagent, the isolation and precipitation with lithium chloride (LiCl), and other combined methods) with the ultimate goal of assessing the quality/quantity of RNA. Olive plant tissues and particularly fruit material are rich in polysaccharides and polyphenolic compounds, thus rendering the isolation of nucleic acids a tedious task. The experiment describes a new protocol which enables the isolation of high quantity and quality of total RNA from small amounts of olive fruit. Reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification of *OeUBQ2* housekeeping gene from isolated RNA further supports the proposed protocol efficiency and its use for downstream molecular applications. In addition, optional treatment with RNase A, following initial nucleic acid extraction can provide sufficient quantity and quality of genomic DNA for subsequent PCR analyses, as evidenced from PCR amplification of housekeeping genes using extracted genomic DNA as template. Overall, this optimized protocol allows easy, rapid and economic isolation of high quality RNA from small amounts of an important fruit crop, such as olive.

The second experiment aimed to generate a high resolution temporal mapping of the biosynthetic pathway of vitamin E in olive fruit (cv. 'Koroneiki') during 17 successive on-tree developmental stages. Fruit material was collected from the middle of June until the end of January, corresponding to 6–38 weeks after flowering (WAF).

Results revealed a variable gene regulation pattern among 6–38 WAF studied and more pronounced levels of differential regulation of gene expression for the first and intermediate genes in the biosynthetic pathway (*VTE5*, *CHL P*, *HPPD*, *VTE2*, *HGGT* and *VTE3*) compared with the downstream components of the pathway (*VTE1* and *VTE4*) were monitored. Notably, expression of *HGGT* and *VTE2* genes were significantly suppressed throughout the developmental stages examined. Metabolite analysis indicated that the first and intermediate stages of development (6–22 WAF) have higher concentrations of tocochromanols compared with the last on-tree stages (starting from 24 WAF onwards). The concentration of α -tocopherol (16.15 – 32.45 mg/100 g F.W.) was substantially greater (up to 100-fold) than those of β -, γ -, and δ -tocopherols (0.13 – 0.25 mg/100 g F.W., 0.13 – 0.33 mg/100 g F.W., 0.14 – 0.28 mg/100 g F.W., respectively). In regard with tocotrienol content, only γ -tocotrienol was detected. Overall, olive fruits (cv. “Koroneiki”) exhibited higher concentrations of vitamin E until 22 WAF as compared with later WAF, concomitant with the expression profile of phytol kinase (*VTE5*), which could be used as a marker gene due to its importance in the biosynthesis of vitamin E. To the best of our knowledge, this is the first study that explores the complete biosynthetic pathway of vitamin E in a fruit tree crop of great horticultural importance such as olive, linking molecular gene expression analysis with tocochromanol content.

The aim of the third experiment was to explore the temporal biosynthesis of tocochromanols in olive (cv. ‘Koroneiki’) fruit during on-tree development and ripening over successive growing years. A combined array of analytical, molecular, bioinformatics, immunoblotting protein (western blot), and antioxidant techniques were employed. Fruits were harvested at eight successive developmental stages [10–30 weeks after flowering (WAF)], over three consecutive years. Intriguingly, climatic conditions affected relative transcription levels of vitamin E biosynthetic enzymes; a general suppression to induction pattern (excluding *VTE5*) was monitored moving from the 1st to the 3rd growing year, probably correlated to decreasing rainfall levels and higher temperature, particularly at the fruit ripening stage. A gradual diminution of *VTE5* protein content was detected during the fruit development of each year, with a marked decrease occurring after 16 WAF. Alpha-tocopherol was the most abundant metabolite with an average percentage of 96.82 %, 91.13 %, and 88.53 % (during the 1st, 2nd and 3rd

year, respectively) of total vitamin E content in 10–30 WAF. The concentrations of α -tocopherol revealed a generally declining pattern, both during the on-tree ripening of the olive fruit and across the 3 years, accompanied by a parallel decline of the total antioxidant capacity of the drupe. Contrarily, all other tocopherols demonstrated an inverse pattern with lowest levels being recorded during the 1st year. It is likely that, in a defense attempt against water deficit conditions and increased air temperature, transcription of genes involved in vitamin E biosynthesis (excluding *VTE5*) is up-regulated in olive fruit, probably leading to the blocking/deactivating of the pathway through a negative feedback regulatory mechanism.

The fourth experiment focused on the comparison of gene expression involved in vitamin E biosynthesis, tocopherols content, and antioxidant activity of five olive cultivars (cvs. ‘Koroneiki’, ‘Kalamata’, ‘Mavrelia’, ‘Kalokairida’ and ‘Lianolia Kerkyras’) based on external fruit size and ripening. Gene expression was highly affected by fruit size and ripening on the cultivar considered. A general down-regulation (with calibrator green-yellow category) of *VTE5*, *CHL P*, *HPPD*, *VTE2* and *HGGT* genes during fruit size increases and ripening were observed in all cultivars, with few exceptions. Alpha-tocopherol was the most abundant tocopherol, averaging at 84.04%, with the other tocopherols at 8.63% and tocotrienols at 7.33%, for all cultivars. The highest tocopherols content was monitored in the cv. ‘Kalokairida’ and cv. ‘Lianolia Kerkyras’ fruits (averaging 24.13 mg/100g F.W. and 15.86 mg/100g F.W., respectively), significantly higher than the global cultivar ‘Koroneiki’ (averaging 14.07 mg/100g F.W.). Notably, the high tocopherol content is concomitant with the high level of *HPPD*.

Overall, we conclude that the quantity of vitamin E increases until the breaker stage (22 WAF) of the olive fruit and then starts to decrease. This is concomitant with the *VTE5* gene which is up-regulated at the breaker stage (22 WAF) and then it is in down-regulated. During three successive years, we found that the temperature and the rainfall are critical factors that have an impact on the biosynthetic pathway of vitamin E. As the temperature increases and the rainfall decreases the quantity of vitamin E, the protein of *VTE5* decreases as well as the antioxidant activity of the olive fruit, while the genes from down-regulation go to up-regulation (except for gene *VTE5*). In an attempt to respond to temperature increases and the rainfall decreases, the plant induces the

expression of most genes involved in vitamin E biosynthesis, likely leading to blocking of the pathway via a negative feedback regulatory mechanism which results in reduced tocopherol content, VTE5 protein content and overall antioxidant activity. Finally, it is observed that the content of vitamin E, the gene expression and the antioxidant activity are highly dependent on the cultivar, considered.

Keywords: *Olea europaea* L., gene expression, tocopherols, tocotrienols, tocopherols