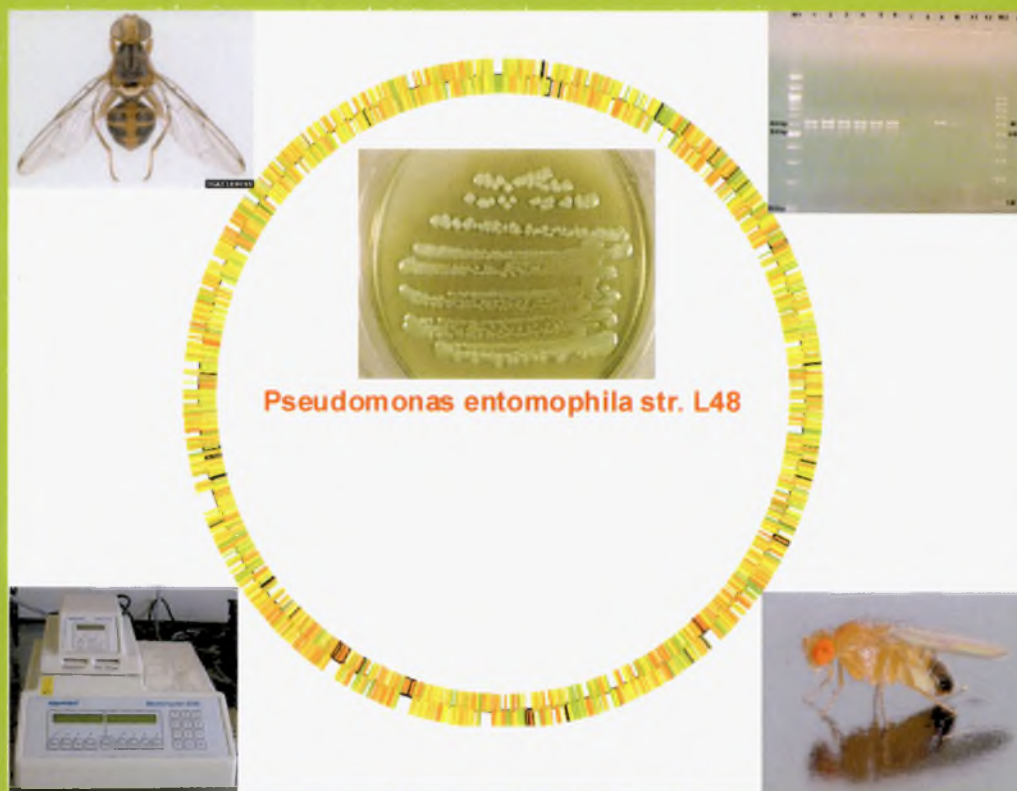


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΑΠΑΓΙΑΝΝΟΥΔΗΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ
Γεωπόνος Α.Π.Θ

"ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΧΡΗΣΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΗΣ PCR
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ *PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA*
ΣΕ ΦΥΣΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΕΝΤΟΜΩΝ
ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗΣ ΣΗΜΑΣΙΑΣ "



ΛΑΡΙΣΑ 2009



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 6997/1
Ημερ. Εισ.: 16-10-2009
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
571.638 293
ΠΑΠ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087181

"Ανάπτυξη και χρήση διαγνωστικής PCR
για την ανίχνευση *Pseudomonas entomophila*
σε φυσικούς πληθυσμούς εντόμων
οικονομικής σημασίας "

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

- Μαρκουλάτος Παναγιώτης, Καθηγητής, Εφαρμοσμένη Μικροβιολογία με έμφαση στη Βιοτεχνολογία, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Παν/μιο Θεσσαλίας
- Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Παν/μιο Θεσσαλίας
- Μόσιαλος Δημήτριος, Λέκτορας, Βιοτεχνολογία Μικροβίων, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Παν/μιο Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Μικροβιολογίας και Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κατά το χρονικό διάστημα Μάρτιος – Νοέμβριος του 2008 υπο την επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Ματθιόπουλου Κωνσταντίνου και του Λέκτορα Βιοτεχνολογίας Μικροβίων Μόσιαλου Δημητρίου.

Θα ήθελα να εκφράσω την εκτίμησή μου στους καθηγητές μου κυρίους Μαρκουλάτο Παναγιώτη και Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο που με ευχαρίστηση δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην τριμελή επιτροπή για την παρούσα μελέτη.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω την βαθύτατη εκτίμησή μου στον καθηγητή μου και άμεσο επιβλέποντα της παρούσας προσπάθειας, Λέκτορα Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας Μόσιαλο Δημήτριο για το ήθος του, την υπομονή του, την επιμονή και τον ζήλο του να μου μεταδώσει όσο το δυνατόν περισσότερη γνώση μέσα στα στενά χρονικά πλαίσια της συνεργασίας μας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	11
PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA	11
1.1 Περιγραφή και σημασία	11
1.2 Δομή γενώματος	12
1.3 Κυτταρική δομή και μεταβολισμός.....	13
1.4 Οικολογία.....	13
1.5 Παθολογία.....	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	16
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	16
2.1 Καλλιέργεια μικροοργανισμών.....	16
2.2 Απομόνωση DNA από βακτηριακά στελέχη.....	17
2.3 Απομόνωση DNA από έντομα.....	17
2.4 Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης , PCR.....	18
2.4.1 Πρωτόκολλο PCR.....	20
2.4.2 Ευαισθησία PCR.....	21
2.5 Σχεδιασμός εκκινητών (primers).....	21
2.6 Πειραματική επιμόλυνση της <i>Drosophila melanogaster</i> από την <i>Pseudomonas entomophila</i>	23
2.7 Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	25
ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
3.1 Ανάπτυξη της μεθόδου.....	25
3.1.1 Ανίχνευση ειδών που ανήκουν στο γένος <i>Pseudomonas</i>	25
3.1.2. Ανίχνευση του είδους <i>Pseudomonas entomophila</i>	27
3.2 Ευαισθησία της μεθόδου.....	28
3.3 Ανίχνευση <i>Pseudomonas entomophila</i> με την χρήση duplex PCR.....	30
3.4 Ανίχνευση του <i>Pseudomonas entomophila</i> σε δείγματα εντόμων.....	31
3.4.1 Ανίχνευση του <i>Pseudomonas entomophila</i> σε εργαστηριακούς πληθυσμούς εντόμων του είδους <i>Drosophila melanogaster</i>	31
3.4.2. Εφαρμογή της μεθόδου σε φυσικούς πληθυσμούς Δάκου της ελιάς.....	33

3.4.2.1.Εφαρμογή της μεθόδου σε έντομα του είδους <i>Bactrocera oleae</i> , Δάκος της ελιάς.....	34
<i>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4</i>	39
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	42

*Στη μητέρα μου Αναστασία και στη θεία μου Ζωή
χωρίς τη συμβολή των οποίων
θα ήταν αδύνατο να πραγματοποιήσω τις μέχρι τώρα σπουδές μου
και να πετύχω τους όποιους στόχους μου...*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Πριν από 350 με 400 εκατομμύρια χρόνια εμφανίστηκαν στην γη κάποιες μορφές ζωικών οργανισμών που έμελλε να διαδραματίσουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στην γεωργία παγκοσμίως, τα έντομα. Η σπουδαιότητά τους ανεκτίμητη όσον αφορά την συνεισφορά τους στην γεωργική παραγωγή. Από την άλλη όμως, πολλά από αυτά αποτελούν σοβαρούς εχθρούς των φυτικών καλλιεργειών αλλά συνάμα και φορείς ασθeneιών για άλλους ζωικούς οργανισμούς, ανάμεσά τους και ο άνθρωπος. Από πολύ νωρίς, η ανάγκη αντιμετώπισης των εντόμων απασχόλησε τον άνθρωπο και έτσι το 1874 παρασκευάστηκε το DDT, ένα δίχλωροδιφαινυλοτριχλωροαιθάνιο, οι εντομοκτόνες ιδιότητες του οποίου όμως έγιναν γνωστές μέσα στην δεκαετία του 1930. Το DDT χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα για την εξολόθρευση κουνουπιών και άλλων εντόμων και παρασίτων. Δυστυχώς, από το 1960 και έπειτα άρχισαν να γίνονται γνωστά τα συμπτώματα τοξικότητας του DDT, όπως νεκρά ψάρια σε ποτάμια ή λίμνες μετά από ραντίσματα, μείωση των χρήσιμων εντόμων και αναπόφευκτα των πουλιών (που τρέφονται με αυτά) στις γεωργικές περιοχές. Ανάλογες παρατηρήσεις έκαναν και ορνιθολόγοι, που διαπίστωσαν μείωση αρπακτικών πουλιών (γεράκια, αετοί) σε διάφορες αγροτικές περιοχές. Έτσι, η απαγόρευσή του ήταν αποτέλεσμα κυρίως των προβλημάτων περιβαλλοντικής τοξικότητας και της μακροχρόνιας βιοσυσσώρευσης σε λιπαρούς ιστούς των οργανισμών και όχι τόσο εξαιτίας της τοξικότητάς του στον άνθρωπο, η οποία δεν είναι τόσο υψηλή ώστε να δικαιολογήσει την απαγόρευσή του. Πέραν τούτου, μεταλλάξεις σε γονίδια των νευρικών κυττάρων των εντόμων όπου και δρούσε το DDT οδηγούσαν αναγκαστικά στην χρήση μεγαλύτερων δόσεων του φαρμάκου με οξύτερα αποτελέσματα. Τελικώς, μόλις το 1972 απαγορεύτηκε η χρήση του σε πάρα πολλές χώρες. Το ίδιο ίσχυσε βέβαια και για πάρα πολλά άλλα εντομοκτόνα αργότερα αφού προηγήθηκε αλόγιστη και λανθασμένη τους χρήση για πολλά χρόνια.(1,2).

Η υπολειμματικότητα και η διείσδυση των εντομοκτόνων στην τροφική αλυσίδα με ταυτόχρονες τοξικές επιδράσεις σε πληθώρα ζωικών οργανισμών αλλά και η επιτάχυνση πρόκλησης φυσικής επιλογής με την δημιουργία ολοένα και πιο ανθεκτικών ειδών εντόμων οδήγησαν τους επιστήμονες στην παρασκευή πιο ήπιων δραστικών ουσιών

κυρίως όσον αφορά τις συνέπειες σε οργανισμούς μη στόχους. Τα επονομαζόμενα "βιολογικά εντομοκτόνα" άρχισαν να κερδίζουν ολοένα και περισσότερο έδαφος τα τελευταία χρόνια και αυτό εξαιτίας τεσσάρων κύριων χαρακτηριστικών τους όπως : α) χαμηλή υπολειμματικότητα β) ελάχιστη τοξικότητα σε οργανισμούς μη στόχους γ) δράση κυρίως εξ' επαφής και όχι διασυστηματικά , οπότε μπορούν και απομακρύνονται εύκολα από τις επιφάνειες όπου εφαρμόζονται, όπως για παράδειγμα σε εδώδιμα προϊόντα και δ) το γεγονός ότι η παρασκευή τους στηρίζεται σε φυτικές ουσίες ή ουσίες προερχόμενες από μικροοργανισμούς που ήδη υπάρχουν στην φύση και εμφανίζουν εντομοπαθογόνο δράση (3). Σε καμία περίπτωση βέβαια δεν στερούνται και αυτά δυσμενών επιδράσεων με το πρόβλημα της ανθεκτικότητας κάποιων ειδών εντόμων να εμφανίζεται και να αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα της αποτελεσματικότητά τους. Με την ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας προϊόντα τέτοιων μικροοργανισμών κλωνοποιήθηκαν δημιουργώντας διαγονιδιακά φυτά, που η καλλιέργειά τους στο πεδίο προκάλεσε ανεπιθύμητα αποτελέσματα και αμφιβολίες για την έως τότε θεωρούμενη αθώα χρήση των συγκεκριμένων μικροοργανισμών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα η περίπτωση του *Bacillus thuringiensis*, ενός βακτηρίου η τοξίνη του οποίου παραγόμενη σε διαγονιδιακά φυτά παρουσίασε τροποποιημένη δράση με ανεπιθύμητες παρενέργειες (4,5). Κατά συνέπεια λοιπόν, το επόμενο βήμα ήταν και είναι η ανακάλυψη και χρησιμοποίηση νέων μικροοργανισμών ως όπλα για την καταπολέμηση των εντόμων.

Το 2001 απομονώθηκε ένα βακτηριακό στέλεχος το οποίο είχε πολλά κοινά χαρακτηριστικά με το ήδη γνωστό στην επιστημονική κοινότητα βακτήριο *Pseudomonas putida*, η *Pseudomonas entomophila*, η οποία και παρουσίαζε ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς της να θανατώνει έπειτα από κατάποση της το έντομο *Drosophila melanogaster*(6,7). Αν και μέχρι σήμερα δεν είναι σαφής ο ακριβής τρόπος με τον οποίο σκοτώνει καθώς και το εύρος των ειδών των εντόμων που δύναται να θανατώσει, έχει ελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ως νέο είδος και όλα δείχνουν ότι θα αποτελέσει αντικείμενο έρευνας. Πέρα από την μελέτη των μηχανισμών εντομοπαθογένειας και το εύρος των ξενιστών της θα πρέπει να μελετηθεί και ο βαθμός επικινδυνότητας όσον αφορά άλλους ζωικούς οργανισμούς καθώς και η αποτελεσματικότητα εφαρμογής της με την μορφή κάποιου σκευάσματος, σε καλλιέργειες πεδίου.

Η ανάγκη για απαλλαγή από τα παραδοσιακά χημικά προϊόντα καταπολέμησης παρασίτων γενικότερα, είναι εδώ και χρόνια επιτακτική, όπως επιτακτική πρέπει να θεωρείται και η εντατική έρευνα νέων ειδών οργανισμών όπως στην προκειμένη

περίπτωση της *Pseudomonas entomophila*. Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη, για πρώτη φορά, μιας μοριακής μεθόδου ανίχνευσης της *Pseudomonas entomophila*, βασιζόμενη στην PCR, η οποία θα διευκολύνει περαιτέρω έρευνες σχετικές με την βιολογία και οικολογία του βακτηρίου αυτού. Στις σελίδες που ακολουθούν αναλύεται η μέθοδος και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παρούσας προσπάθειας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

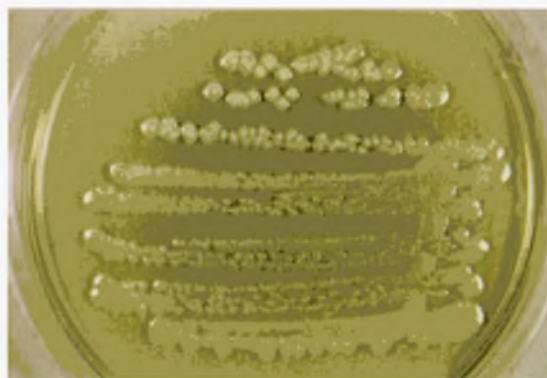
PSEUDOMONAS ENTOMOPHILA

1.1 Περιγραφή και σημασία.

Η *Pseudomonas entomophila* είναι ένα Gram⁻ βακτήριο που βρίσκεται στο νερό, στο έδαφος ή στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας.(εικ.2). Απομονώθηκε αρχικά από το έντομο *Drosophila melanogaster* (εικ.1). Όταν καταποθεί προκαλεί τον θάνατο τόσο σε λάρβες όσο και σε ενήλικα άτομα της *D. Melanogaster*, σε ένα επίπεδο της τάξης του 70% (7). Αν και δεν είναι γνωστός ο ακριβής τρόπος δράσης φαίνεται ότι το γονιδίωμα της *P. entomophila* κωδικοποιεί την παραγωγή παραγόντων όπως εντομοκτόνες τοξίνες, σιδηροφόρα, υδροκυάνιο, αιμολυσίνες, λιπάσες και εξωκυτταρικές πρωτεάσες με τελικό αποτέλεσμα την θνησιμότητα του ξενιστή. Παρ' όλα αυτά όμως, η απουσία γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα ικανά να λύσουν τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα χρήζουν την *P. entomophila* πιθανότατα ακίνδυνη για τα φυτά.(6).



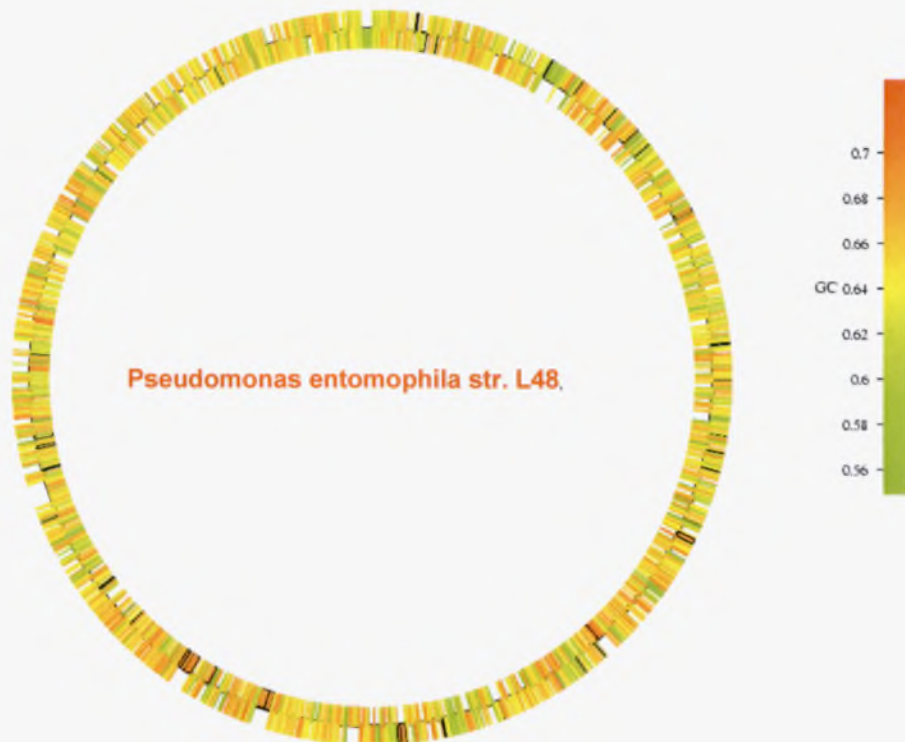
Εικόνα1. *Drosophila melanogaster*



Εικόνα 2. Καλλιέργεια βακτηρίου *Pseudomonas*

1.2 Δομή γονιδιώματος.

Το γονιδίωμα της *P. entomophila* αποτελείται από ένα κυκλικό χρωμόσωμα με μήκος 5.888.780 νουκλεοτίδια (εικ.3). Η πλήρης αλληλούχισή του έδειξε να περιέχει 5.169 ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια μαζί με 107 τμήματα DNA που κωδικοποιούν μικρά ρυθμιστικά RNA. Σε περίπου 3.466 γονίδια έχει αποδοθεί συγκεκριμένη λειτουργία.(6)



Εικόνα 3. Το κυκλικό χρωμόσωμα που αντιστοιχεί σε ολόκληρο το γονιδίωμα της *Pseudomonas entomophila* (5.888.780 bp)

1.3 Κυτταρική δομή και μεταβολισμός.

Πρόκειται για Gram⁻ βακτήριο που φέρει μαστίγια. Οι δομικές πρωτεΐνες αποτελούνται από τρεις πρωτεΐνες τις PSEEN0141, PSEEN2177 και PSEEN3946 που εμπλέκονται στην διαδικασία προσκόλλησης στην επιφάνεια του ξενιστή προωθώντας εν συνεχεία τον πολλαπλασιασμό και την αποίκηση του βακτηρίου. Ο μεταβολισμός του στηρίζεται στο μονοπάτι της φωσφορικής πεντόζης, το μονοπάτι Entner-Doudoroff, τον κύκλο τρικαρβοξυλικών οξέων και ένα μη ολοκληρωμένο (λόγω της απουσίας της 6-φωσφοφρουκτοκινάσης) Embden-Meyerhof-Parnas μονοπάτι. Το γονιδίωμα του κωδικοποιεί λιπάσες, πρωτεάσες και περίπου 19 μη χαρακτηρισμένες υδρολάσες που εμπλέκονται στην αποικοδόμηση πολυμερών που βρίσκονται εντός του εδάφους.(6)

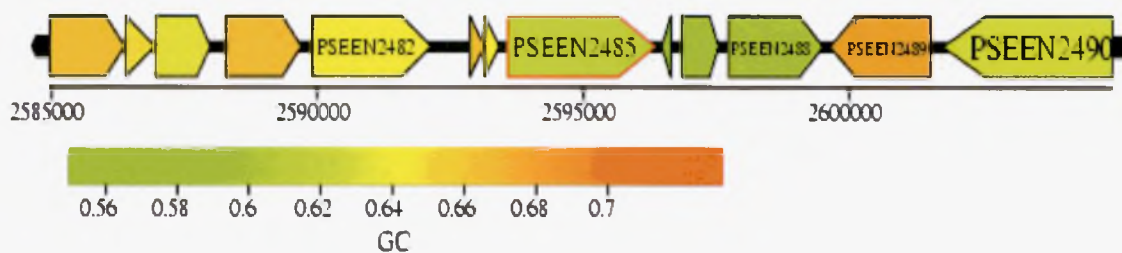
1.4 Οικολογία

Βρίσκεται σε διάφορα περιβάλλοντα όπως στο νερό, στο έδαφος και στην ριζόσφαιρα και εμφανίζει μια παθολόγο αλληλεπίδραση με το έντομο *D. Melanogaster* (6). Η *D. melanogaster* διατηρεί ένα εχθρικό περιβάλλον για μικρόβια εκκρίνοντας αντιμικροβιακούς παράγοντες όπως λυσοζύμη και αντιμικροβιακά πεπτίδια.(6).

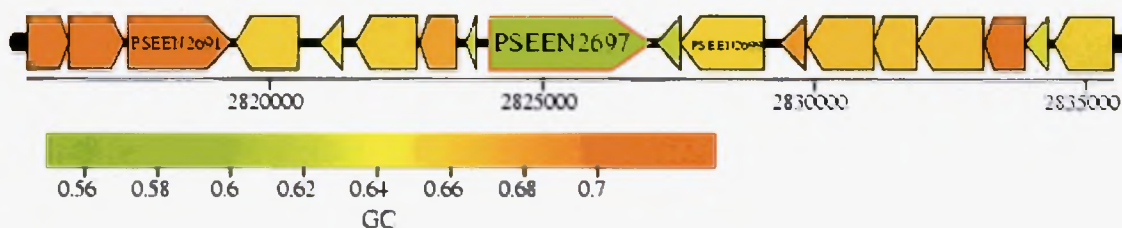
Το γονιδίωμα της *Pseudomonas entomophila* κωδικοποιεί 4 καταλάσες, 2 δισμουτάσες του υπεροξειδίου, 3 υδροπεροξειδικές ρεδουκτάσες και 11 γλουταθιόν-S-τρανσφεράσες που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα ενάντια στο οξειδωτικό στρές που επάγει η *D. melanogaster* με σκοπό να αναστείλει την ανάπτυξη των μικροβίων.(6)

1.5 Παθολογία

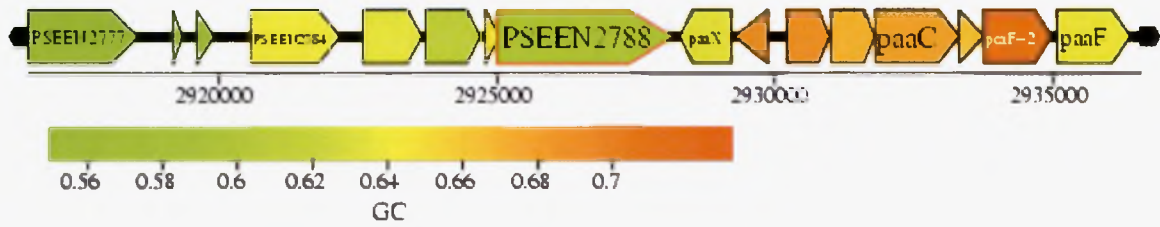
Το γονιδίωμα της *P. entomophila* στερείται γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα ικανά να λύσουν τα φυτικά κυτταρικά τοιχώματα οπότε το *P. entomophila* δεν αποτελεί μάλλον απειλή για τα φυτά (6). Αντιθέτως, η παραγωγή τριών πιθανών τοξινών (τύπου TccC), των PSEEN2485 (εικ.4), PSEEN2697 (εικ.5), και PSEEN2788 (εικ.6) είναι καθοριστική διότι όλες τους φαίνεται να είναι εντομοκτόνες.(6). Επίσης, η βακτηριακή αιμολυσίνη δρά ως εξωτοξίνη που προκαλεί λύση των κυττάρων. Καθοριστική για την εντομοπαθογένεια πιθανόν είναι και η έκκριση πρωτεασών, τριών σερινοπρωτεασών PSEEN3027, PSEEN3028, PSEEN4433 και μιας αλκαλικής εξοπρωτεάσης AprA.(6,11).



Εικόνα 4. Σχηματική παράσταση του γονιδιακού τύπου που αντιστοιχεί στο PSEEN2485 (μήκος 2766 bp, 921 αμινοξέα) που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή εντομοκτόνου ουσίας .



Εικόνα 5. Σχηματική παράσταση του γονιδιακού τύπου που αντιστοιχεί στο PSEEN2697 (μήκος 2973 bp, 990 αμινοξέα) που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή εντομοκτόνου ουσίας .



Εικόνα 6. Σχηματική παράσταση του γονιδιακού τόπου που αντιστοιχεί στο PSEEN2788 (μήκος 3162 bp, 1053 αμινοξέα) που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή εντομοκτόνου ουσίας .

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ****2.1 Καλλιέργεια μικροοργανισμών.**

Το πρωταρχικό βήμα ήταν η καλλιέργεια μικροοργανισμών, οι οποίοι και θα αποτελούσαν τα δείγματα για την ανάπτυξη της μεθόδου. Έτσι, χρησιμοποιήθηκαν περιβαλλοντικά και μη δείγματα παίρνοντας κύτταρα για την ανακαλλιέργειά τους από ήδη υπάρχουσες ανεπτυγμένες καλλιέργειες σε τρυβλία Petri ή από stock γλυκερόλης. Χρησιμοποιήσαμε 2 στερεά θρεπτικά υποστρώματα LB agar (Luria Bertani, εταιρεία SERVA) και TSA agar (Tryptone soy agar, εταιρεία SERVA). Όλα τα βακτηριακά στελέχη αναπτύχθηκαν επιτυχώς στα δύο παραπάνω υποστρώματα με επώαση στους 30°C για 24-48h, εκτός από την *P. aeruginosa* και *S. aureus* που αναπτύχθηκαν στους 37°C. Επιπλέον, η *Pseudomonas entomophila* αναπτύχθηκε και σε υγρές καλλιέργειες όταν κρίθηκε απαραίτητο, σε θρεπτικό υπόστρωμα LB broth. Η αποθήκευση όλων των ανεπτυγμένων καλλιεργειών έγινε σε τρυβλία Petri στους 4°C. Συγκεκριμένα οι μικροοργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι εξής :

A/A	ΟΝΟΜΑΣΙΑ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΥ
1	<i>Flexibacter canadiensis</i>
2	<i>Pseudomonas taetrolens</i>
3	<i>Pseudomonas veronii</i>
4	<i>Pseudomonas montelii</i>
5	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>
6	<i>Moraxella osloensis</i>
7	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
8	<i>Pseudomonas entomophila</i>
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	<i>Staphylococcus aureus</i>

2.2 Απομόνωση DNA από βακτηριακά στελέχη.

Σε eppendorfs, ένα για κάθε διαφορετικό βακτηριακό στέλεχος, τοποθετήθηκαν 20 μl του λυτικού διαλύματος (lysis buffer, 0,25% vol/vol SDS και 0,05N NaOH) και μια μικρή ποσότητα κυττάρων από την στερεή καλλιέργεια. Έπειτα έγινε επώαση σε υδατόλουτρο στους 95° C για 15'. Στην συνέχεια προστέθηκε αποστειρωμένο dH₂O ως τον τελικό όγκο των 200 μl και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min (13000xg) για την απομάκρυνση των όποιων υπολειμμάτων και ακολούθησε μεταφορά του υπερκείμενου σε νέα αποστειρωμένα eppendorfs και αποθήκευση στους -20°C.(8).

2.3 Απομόνωση DNA από έντομα.

Η απομόνωση DNA από τα έντομα ήταν ένα καθοριστικής σημασίας βήμα καθώς σε περίπτωση που η ποιότητα του DNA δεν ήταν ικανοποιητική λόγω παρουσίας στο τελικό προϊόν πολλών παραπροϊόντων τα οποία μπορούν να αποτελέσουν αναστολείς για την λειτουργία της PCR αλλά και να επηρεάσουν την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Η απομόνωση DNA από άτομα της *Drosophila melanogaster* έγινε όπως περιγράφηκε από τον Malloch et al. 2006.(9). Συγκεκριμένα, κάθε έντομο αρχικά ξεπλύθηκε με αιθανόλη για απομάκρυνση βακτηρίων που πιθανόν να υπήρχαν εξωτερικά και έπειτα έγινε σύνθλιψη του σε αποστειρωμένο eppendorf το οποίο περιείχε 40 μl αποστειρωμένο νερό και 5-10% Chelex 100 resin (Biorad). Το Chelex 100 είναι μια συνθετική ρητίνη και εξασφαλίζει την απομάκρυνση μεταλλικών ιόντων που δύνανται να δράσουν ως αναστολείς της PCR. Έπειτα έγινε σύντομο vortex (για 5-10 s) σε όλα τα δείγματά μας και ακολούθησε μια πρώτη επώαση σε υδατόλουτρο στους 56°C για 35 min και μια δεύτερη στους 95°C για 15 min. Τα δείγματα στην συνέχεια τοποθετήθηκαν στον πάγο για 2 min, ακολούθησε σύντομο vortex και

φυγοκέντρηση (1500xg) για 2 min. Τέλος, το υπερκείμενο από κάθε δείγμα μεταφέρθηκε σε νέο eppendorf και χρησιμοποιήθηκε απευθείας ή αποθηκεύτηκε εν συνεχεία στους -80°C.

Στην περίπτωση που απομονώσαμε DNA από έντομα Δάκου βασιστήκαμε στο ίδιο πρωτόκολλο αλλά αντί για 40μl αποστειρωμένου νερού προσθέσαμε 80μl, λόγω μεγαλύτερου μεγέθους του εντόμου.

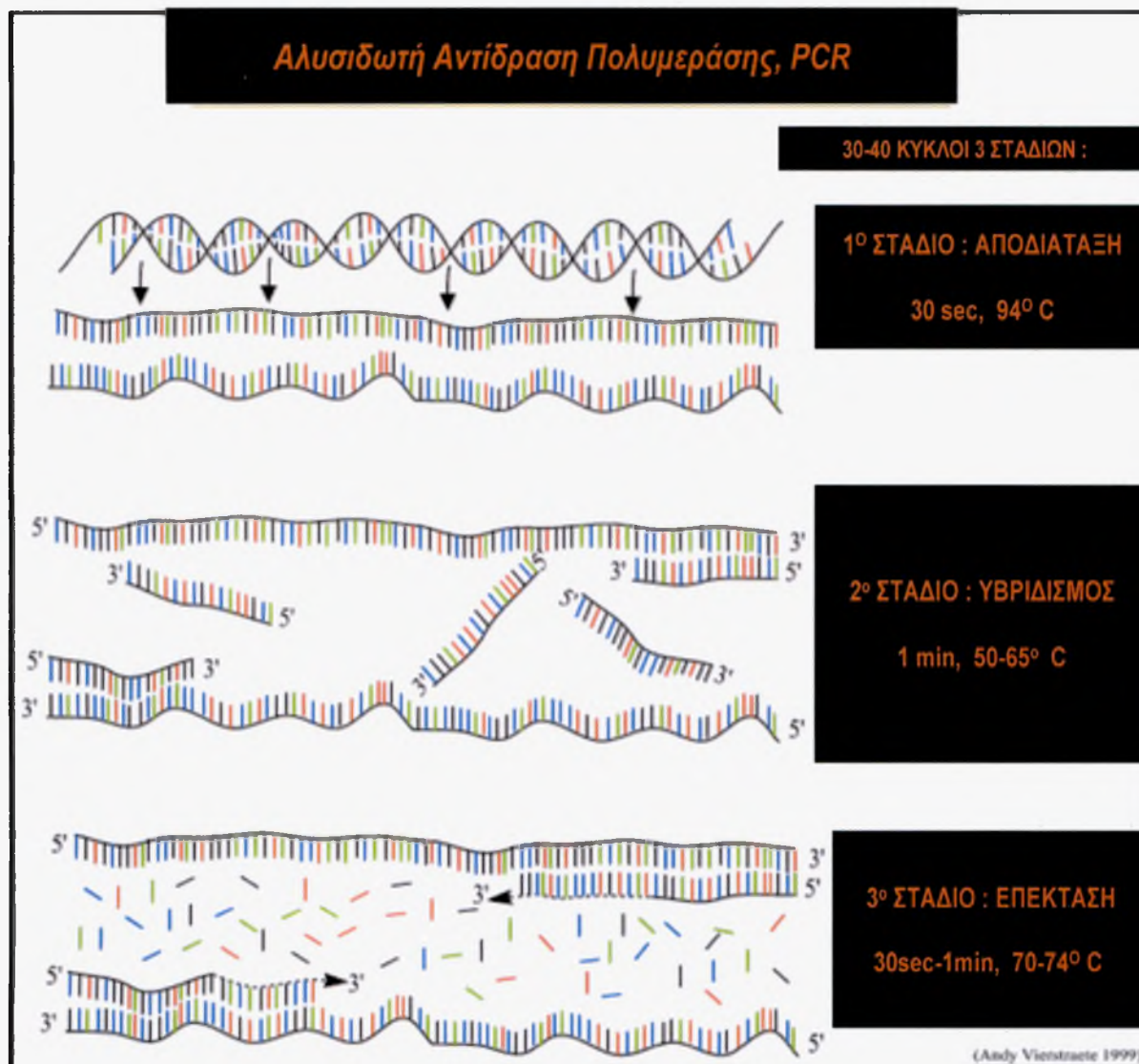
2.4 Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης , PCR

Η παρούσα εργασία στηρίζεται στην μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης , PCR (Polymerase Chain Reaction), η οποία εφαρμόστηκε πρώτη φορά το 1983 από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Fallona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί μέχρι σήμερα μία τεχνική με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών σε πολλούς τομείς της μοριακής βιολογίας. Με την PCR επιτυγχάνεται η σύνθεση ενός τμήματος DNA, ανεξαρτήτου προελεύσεως, “in vitro”. Η συγκεκριμένη περιοχή του DNA που επεκτείνεται (DNA εκμαγείο), πολλαπλασιάζεται σε ένα μεγάλο αριθμό αντιγράφων ενώ ο αριθμός των αντιγράφων εξαρτάται από τον αριθμό των κύκλων της αντίδρασης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην κινητική επανασύνδεσης των αποδιαταγμένων συμπληρωματικών αλυσίδων δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος. Στην PCR ως αφετηρίες χρησιμοποιούνται 2 συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια (18-22 βάσεων) που έχουν δομή συμπληρωματική προς τις πλευρικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου, το καθένα αντίστοιχα προς τον ένα κλώνο του στόχου και με αντίθετη κατεύθυνση, τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers).

Το πρώτο στάδιο της PCR αφορά την μετουσίωση του DNA εκμαγείου όπου έχουμε την μετατροπή του δίκλωνου DNA σε μονόκλωνο. Το δεύτερο στάδιο αφορά τον υβριδισμό των δύο εκκινητών (primers), στις δύο πλευρές του DNA στόχου, στους αντίστοιχους κλώνους DNA. Το τρίτο στάδιο στηρίζεται στην δράση μιας θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης όπως για παράδειγμα το ένζυμο *Taq DNA* πολυμεράση με την βοήθεια του οποίου προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις δεοξυριβονουκλεοτιδίων στο 3' άκρο κάθε εκκινητή (primer) και έτσι η αλυσίδα του DNA επεκτείνεται. Το αποτέλεσμα τελικά είναι ο σχηματισμός δύο νέων αλυσίδων DNA συμπληρωματικών ως προς τους δύο κλώνους του προτύπου DNA με

αποτέλεσμα το διπλασιασμό του DNA στόχου. Η σειρά των τριών σταδίων, μετουσίωση (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (primers annealing) και επέκτασης των εκκινητών με τη σύνθεση νέου κλώνου (extension), αποτελούν 1 κύκλο της αντίδρασης PCR.

Παρακάτω βλέπουμε σχηματικά τα βασικά στάδια της αντίδρασης.



Πρέπει βέβαια να τονισθεί εδώ ότι ο χρόνος κάθε κύκλου και η θερμοκρασία εξαρτώνται κυρίως από την σύνθεση των εκκινητών που έχουμε κάθε φορά οπότε κάθε πρωτόκολλο μπορεί να παρουσιάζει ελαφρές διακυμάνσεις όσον αφορά την εφαρμογή του.

2.4.1 Πρωτόκολλο PCR.

Το πρωτόκολλο πάνω στο οποίο στηρίχθηκε η παρούσα εργασία και χρησιμοποιήθηκε για την παραπάνω μέθοδο είναι το εξής : Όγκος αντίδρασης (reaction volume) 25 µl, αρχική αποδιάταξη (denaturation) για 2 min στους 95° C, στην συνέχεια ολοκλήρωση 25 κύκλων, όπου στον καθένα έχουμε την εξής εφαρμογή χρόνων και θερμοκρασιών :

2α) 20 sec στους 94° C

2β) 20 sec στους 54° C

2γ) 20 sec τους 72° C

και τελική επέκταση (final extension) για 1 min στους 72° C.

Οι τελικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR για τον προαναφερθέντα όγκο των 25 µl είναι τα εξής : 2 mM MgCl₂ , 250 µM δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), 0,4 µM για τον κάθε εκκινητή , 1 U Taq Πολυμεράση (Εταιρεία HT,UK), 2 µl DNA εκμαγείο (DNA template).(8)

Στην περίπτωση της duplex PCR αυξήσαμε τον χρόνο των 20 sec σε 40 sec για τα δύο πρώτα στάδια, σε κάθε κύκλο. Στην duplex PCR που πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση *P. entomophila* σε πειραματικά μολυσμένες Δροσόφιλες χρησιμοποιήθηκαν 8 µl DNA εντόμου ως DNA εκμαγείο ενώ για την ανίχνευση της *P. entomophila* σε άτομα Δάκου της ελιάς χρησιμοποιήθηκε 1 µl ως DNA εκμαγείο.

2.4.2 Ευαισθησία PCR.

Προκειμένου να διαπιστωθεί η ευαισθησία της PCR, αναπτύχθηκε υγρή καλλιέργεια *Pseudomonas entomophila* ($OD_{600}=1$), ακολούθησε φυγοκέντρηση (13000xg) για 2 min, έπειτα έγινε έκπλυση με φυσιολογικό ορό (0.9 % w/v NaCl) και ακολούθησαν διαδοχικές αραιώσεις από 10^2 έως 10^6 κύτταρα ανα ml. Μετά από κάθε αραιώση εξετάστηκε η δυνατότητα ανίχνευσης με το πρωτόκολλο PCR που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.1.

2.5 Σχεδιασμός εκκινητών (primers)

Ως εκκινητές (primers) χρησιμοποιήθηκαν τα εξής 4 ζεύγη :

1^ο ζεύγος :

PA-GS-F (5'-GAC GGG TGA GTA ATG CCT A-3'),

PA-GS-R (5'-CAC TGG TGT TCC TTC CTA TA-3').

Το παραπάνω ζεύγος έχει σχεδιασθεί κατάλληλα για την ανίχνευση μικροοργανισμών που ανήκουν μόνο στο γένος *Pseudomonas*, και δίνει τελικό προϊόν 618 βάσεων (bp).(8)

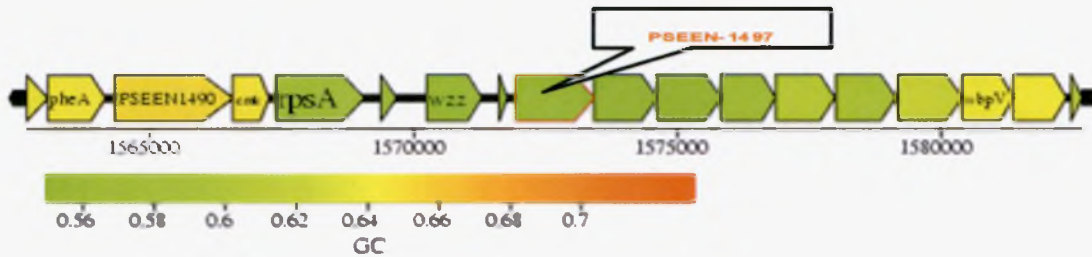
2^ο ζεύγος :

PSEEN-1497F (5'-TTG GTC GAG CAT TGA CTC AG-3'),

PSEEN-1497R (5'-GAA CAA AAC GAT CCG CAT AC-3')

Χρησιμοποιώντας εργαλεία βιοπληροφορικής διαθέσιμα στο JCVI (<http://cmr.jcvi.org/tigr-scripts/CMR/CmrHomePage.cgi>) έγινε σύγκριση του γονιδιώματος της *P. entomophila* με όλα τα αλληλουχημένα γονιδιώματα άλλων *Pseudomonas* και εντοπίστηκαν γονίδια με πολύ μικρή ομολογία και άρα μοναδικά για την *P. entomophila*. Με βάση αυτά τα γονίδια έγινε ο σχεδιασμός των εκκινητών. Έτσι, το παραπάνω ζεύγος έχει σχεδιασθεί κατάλληλα για την ανίχνευση του είδους *Pseudomonas entomophila* και μόνον. Συγκεκριμένα, οι εκκινητές αυτού του ζεύγους

σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να πετυχαίνουν την επέκταση τμήματος 570 βάσεων DNA (bp) ενός τμήματος γονιδίου για το οποίο δεν παρουσιάζεται ομολογία σε κανένα άλλο είδος του γένους *Pseudomonas* και πιθανότατα εμπλέκεται στην βιοσύνθεση λιποπολυσακχαριτών.



Εικόνα 1. Παραπάνω βλέπουμε το γονιδιακό τόπο που αντιστοιχεί στο PSEEN-1497, έχει μήκος 1500 bp (499 αμινοξέα) και ακριβή θέση μεταξύ 1571917..1573416.

3^ο ζεύγος :

PSEEN-5525F (GAT AAA GCG GTA GCA CAA TG-3')

PSEEN-5525R (5'-GCT GCT GAC TGC AAG AAT CA-3')

Το παραπάνω ζεύγος σχεδιάστηκε ώστε να πετυχαίνει την επέκταση ενός τμήματος γονιδίου 670 βάσεων DNA (bp), για το οποίο δεν παρουσιάζεται ομολογία σε κανένα άλλο είδος του γένους *Pseudomonas*. Προς το παρόν δεν αποδόθηκε καμία λειτουργία στο προϊόν του γονιδίου αυτού (υποθετική πρωτεΐνη). Στην παρούσα εργασία το παραπάνω ζεύγος δεν έδωσε κανένα αποτέλεσμα.

Πριν την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα εντόμων που συλλέχθηκαν από το περιβάλλον, χρησιμοποιήθηκε ακόμη ένα ζεύγος εκκινητών (universal primers), το εξής :

4^ο ζεύγος :

5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3'

5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'

Το ζεύγος αυτό έχει σχεδιασθεί για την ενίσχυση του 16S rDNA βακτηρίων με σκοπό την ανίχνευση οποιουδήποτε είδους βακτηρίου. Η χρήση τους (universal primers) έγινε ουσιαστικά με σκοπό να βεβαιωθούμε ότι η μέθοδός μας "δουλεύει" και σε έντομα που συλλέχθηκαν από το περιβάλλον και θα είχαμε έτσι ένα εσωτερικό έλεγχο ώστε να είμαστε βέβαιοι για τα αποτελέσματα που θα μας έδιναν οι δικοί μας εκκινητές.(10)

2.6 Πειραματική επιμόλυνση της *Drosophila melanogaster* από την *Pseudomonas entomophila*.

Η επιμόλυνση των εντόμων της *Drosophila* έγινε ως εξής : δύο ομάδες ενήλικων ατόμων (24-25) τοποθετήθηκαν σε δύο πλαστικά φιαλίδια όπου είχε τοποθετηθεί τροφή κατάλληλη για την *Drosophila*. Η μία ομάδα εντόμων επιμολύνθηκε μέσω της τροφής της που είχαμε τοποθετήσει και αναμίζει με 200 μl ιζήματος υγρής καλλιέργειας *Pseudomonas entomophila* ($OD_{600}=200$), ενώ η άλλη ομάδα χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας (negative control) καθώς διατράφηκε με την ίδια ακριβώς τροφή χωρίς όμως να προηγηθεί ανάμιξή της με κύτταρα καλλιέργειας *Pseudomonas entomophila*.(7) Έπειτα από 48 ώρες διαπιστώσαμε μια θνησιμότητα της τάξης του 60% στο φιαλίδιο όπου είχαμε επιμόλυνση και συλλέξαμε τα νεκρά άτομα από τα οποία και απομονώσαμε το DNA.

2.7 Ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης.

Στην παρούσα έρευνα χρησιμοποιήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις πηκτώματα (gel) αγαρόζης συγκέντρωσης 0,8 % με εξαίρεση την duplex PCR όπου προκειμένου να έχουμε καλύτερο διαχωρισμό των προϊόντων στο πήκτωμα χρησιμοποιήθηκε

συγκέντρωση 2%. Ως ρυθμιστικό διάλυμα (running buffer) χρησιμοποιήθηκε TBE 1X (Tris-Boric acid-EDTA). Η χρώση του πηκτώματος έγινε με βρωμιούχο αιθίδιο συγκέντρωσης 1μg/ml πηκτώματος. Σε κάθε ηλεκτροφόρηση εφαρμόστηκε τάση 100V. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί DNA markers, 100bp DNA ladder (New England Biolabs) και 100bp PCR Molecular Ruler (BioRad).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα της παρούσας προσπάθειας αφορούν σε 2 αλληλένδετα μεταξύ τους ερευνητικά κομμάτια. Το πρώτο εξ'αυτών αποτελεί την ανάπτυξη της μεθόδου με την χρήση συγκεκριμένων εκκινητών (primers) που σχεδιάσαμε έτσι ώστε να μην υπάρχει καμία αμφιβολία ότι μπορεί να ανιχνευθεί σε κάθε περίπτωση και υπο συγκεκριμένες συνθήκες μόνο το είδος *Pseudomonas entomophila*.

Το δεύτερο κομμάτι αφορά την εφαρμογή της μεθόδου για ανίχνευση της *P. entomophila* σε πειραματικά μολυσμένους πληθυσμούς *Drosophila* αλλά και φυσικούς πληθυσμούς Δάκου της ελιάς (*Bactocerae oleae*).

3.1 Ανάπτυξη της μεθόδου.

3.1.1 Ανίχνευση ειδών που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*.

Τα προϊόντα της PCR που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών PA-GS-F και PA-GS-R, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 0,8% όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 1. Ως DNA εκμαγείο (DNA template) χρησιμοποιήθηκε βακτηριακό DNA προερχόμενο από Ψευδομονάδες και άλλα βακτηριακά γένη τόσο Gram⁻ όσο και Gram⁺.



M=molecular marker , N=Negative control

Εικόνα 1. Ανίχνευση ειδών που ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*. Το βέλος υποδεικνύει την *P. entomophila*.

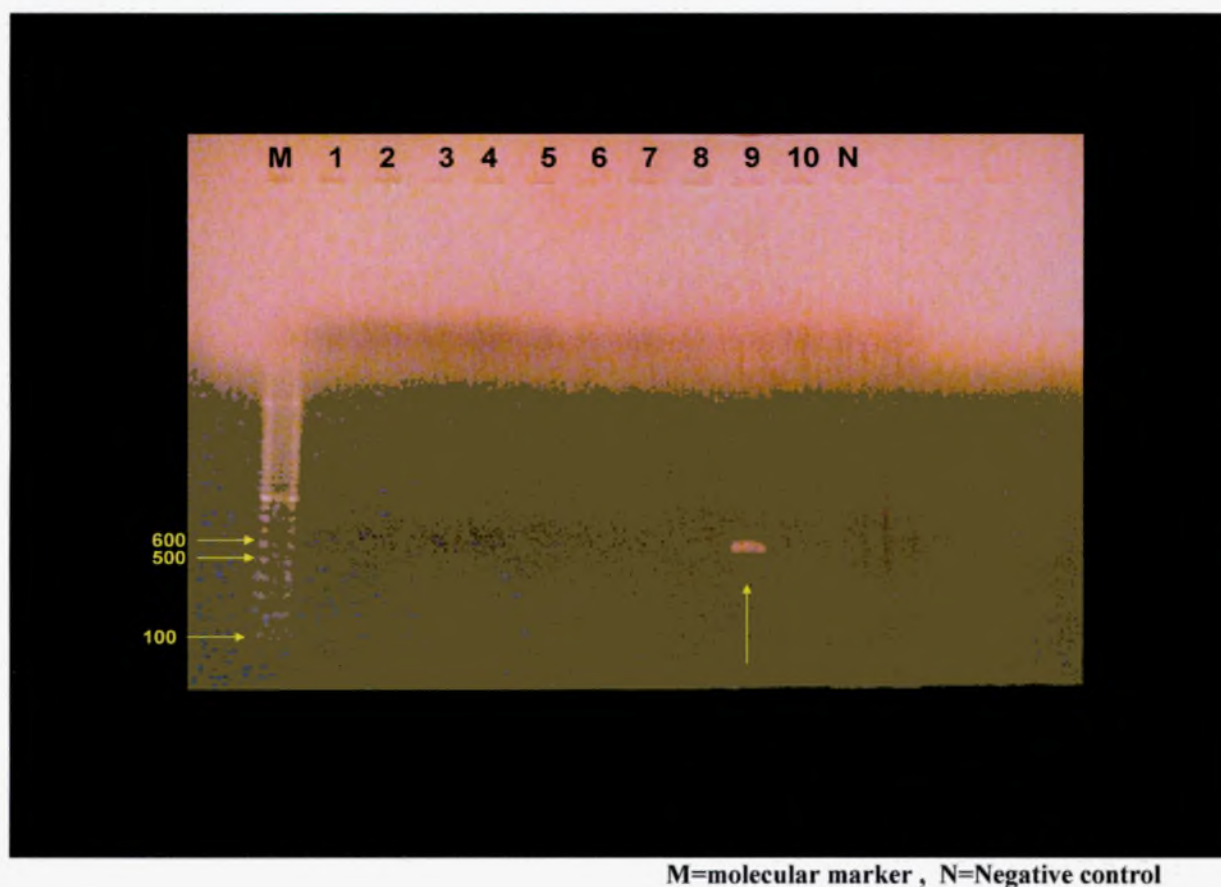
1	<i>Flexibacter canadiensis</i>
2	<i>Pseudomonas taetrolens</i>
3	<i>Pseudomonas veronii</i>
4	<i>Pseudomonas montelii</i>
5	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>
6	<i>Moraxella osloensis</i>
7	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
8	<i>Pseudomonas entomophila</i>
9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
10	<i>Staphylococcus aureus</i>

Πίνακας 1. Θέσεις στο πήκτωμα αгарόζης των προϊόντων της PCR, (εικόνα 1)

Παρατηρούμε στην εικόνα 1. ότι έγινε επιτυχώς ανίχνευση μόνο των διαφόρων ειδών *Pseudomonas* (θέσεις 2,3,4,8 και 9), κάτι αναμενόμενο αφού το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση της PCR έχει σχεδιασθεί για αυτόν ακριβώς τον σκοπό και συγκεκριμένα για την ενίσχυση του 16S rDNA σε είδη του γένους *Pseudomonas*. Τα προϊόντα της PCR που πήραμε αντιστοιχούν σε τμήματα DNA μεγέθους γύρω στα 618 bp, σε συμφωνία με το μέγεθος του προϊόντος που αναμενόταν.(8)

3.1.2. Ανίχνευση του είδους *Pseudomonas entomophila*.

Τα προϊόντα της PCR που έγινε με την χρήση του ζεύγους εκκινητών PSEEN-1497F και PSEEN-1497R, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 0,8%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 2. Χρησιμοποιήθηκε DNA προερχόμενο από τα ίδια βακτηριακά είδη όπως και στην PCR με το ζεύγος εκκινητών PA-GS-F και PA-GS-R.



Εικόνα 2. Ανίχνευση του είδους *Pseudomonas entomophila*

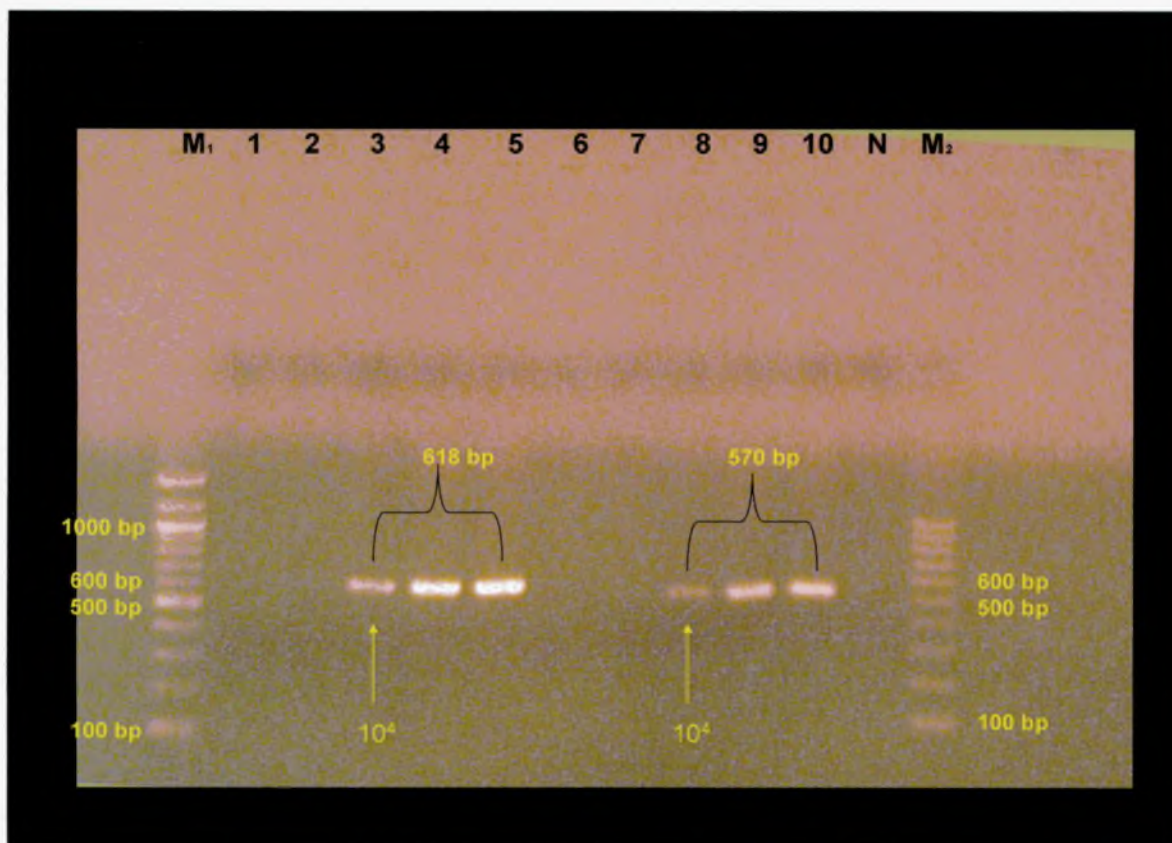
1	<i>Flexibacter canadiensis</i>
2	<i>Pseudomonas taetrolens</i>
3	<i>Pseudomonas veronii</i>
4	<i>Pseudomonas montelii</i>
5	<i>Flavobacterium saccharophilum</i>
6	<i>Moraxella osloensis</i>
7	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
9	<i>Pseudomonas entomophila</i>
10	<i>Staphylococcus aureus</i>

Πίνακας 2. Θέσεις στο πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR,(εικόνα 2)

Παρατηρούμε από στην εικόνα 2. ότι πήραμε μόνο ένα προϊόν στην θέση 9 που αντιστοιχεί στην *Pseudomonas entomophila*, κάτι που δείχνει ότι οι εκκινητές του δεύτερου ζεύγους οι οποίοι και σχεδιάστηκαν από εμάς για αυτόν ακριβώς τον σκοπό, είναι όντως ικανοί και εξειδικευμένοι να ανιχνεύσουν μόνο το *Pseudomonas entomophila*. Το προϊόν που πήραμε αντιστοιχεί σε τμήμα μεγέθους 570 bp.

3.2 Ευαισθησία της μεθόδου.

Ένα εξίσου σημαντικό σημείο που επικυρώνει και το "σταντάρισμα" μιας μεθόδου είναι η ευαισθησία της μεθόδου. Το ελάχιστο όριο (αριθμός κυττάρων) πάνω από το οποίο μπορεί να γίνει επιτυχώς ανίχνευση του *Pseudomonas entomophila* με την συγκεκριμένη μέθοδο και χρησιμοποιώντας και τα δύο προαναφερθέντα ζεύγη εκκινητών (σε διαφορετική αντίδραση PCR) βρέθηκε ότι είναι 10^4 κύτταρα. Στην εικόνα 4. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και στον πίνακα 1 που ακολουθεί ο αριθμός των κυττάρων (DNA template) ανα θέση και ζεύγος εκκινητών.



M₁,M₂=Molecular markers, N= Negative control

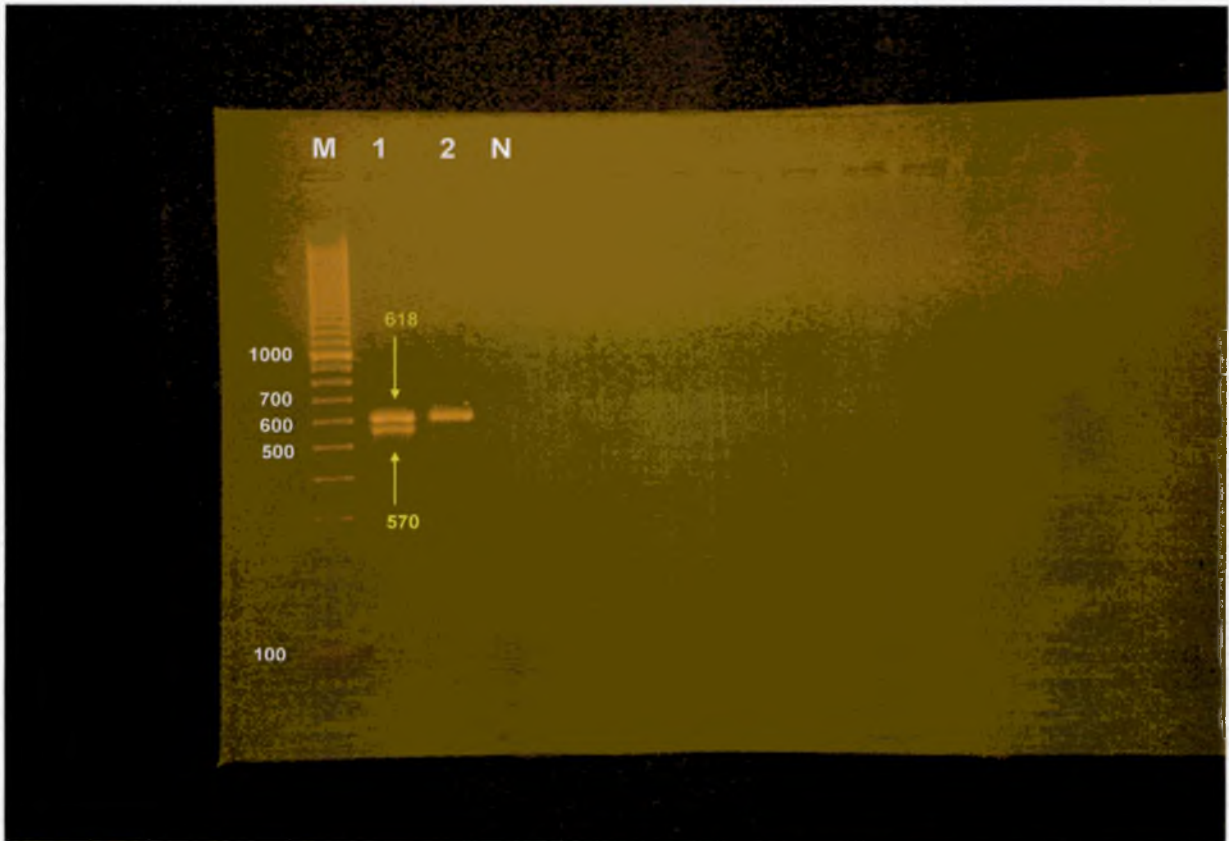
Εικόνα 3. Ευαισθησία της μεθόδου. Τα βέλη υποδεικνύουν το ελάχιστο όριο ανίχνευσης για τα δύο ζεύγη εκκινητών.

1	10 ² / PA-GS-F και PA-GS-R
2	10 ³ / "
3	10 ⁴ / "
4	10 ⁵ / "
5	10 ⁶ / "
6	10 ² / PSEEN-1497F και PSEEN-1497R
7	10 ³ / "
8	10 ⁴ / "
9	10 ⁵ / "
10	10 ⁶ / "

Πίνακας 3. Αριθμός κυττάρων (DNA template) ανα θέση και ζεύγος εκκινητών,(εικόνα 3)

3.3 Ανίχνευση *Pseudomonas entomophila* με την χρήση duplex PCR.

Χρησιμοποιώντας ως DNA εκμαγείο βακτηριακό DNA από *P. entomophila* και *P. aeruginosa* αναπτύξαμε duplex PCR για την ανίχνευση της *P. entomophila*. Τα ζεύγη των εκκινητών PA-GS-F, PA-GS-R και PSEEN-1497F, PSEEN-1497R χρησιμοποιήθηκαν στην PCR και τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 4.



M=molecular marker , N=Negative control

Εικόνα 4. Ανίχνευση *Pseudomonas entomophila* με την χρήση duplex PCR.

1	<i>Pseudomonas entomophila</i>
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

Πίνακας 4. Θέσεις στο πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR,(εικόνα 4)

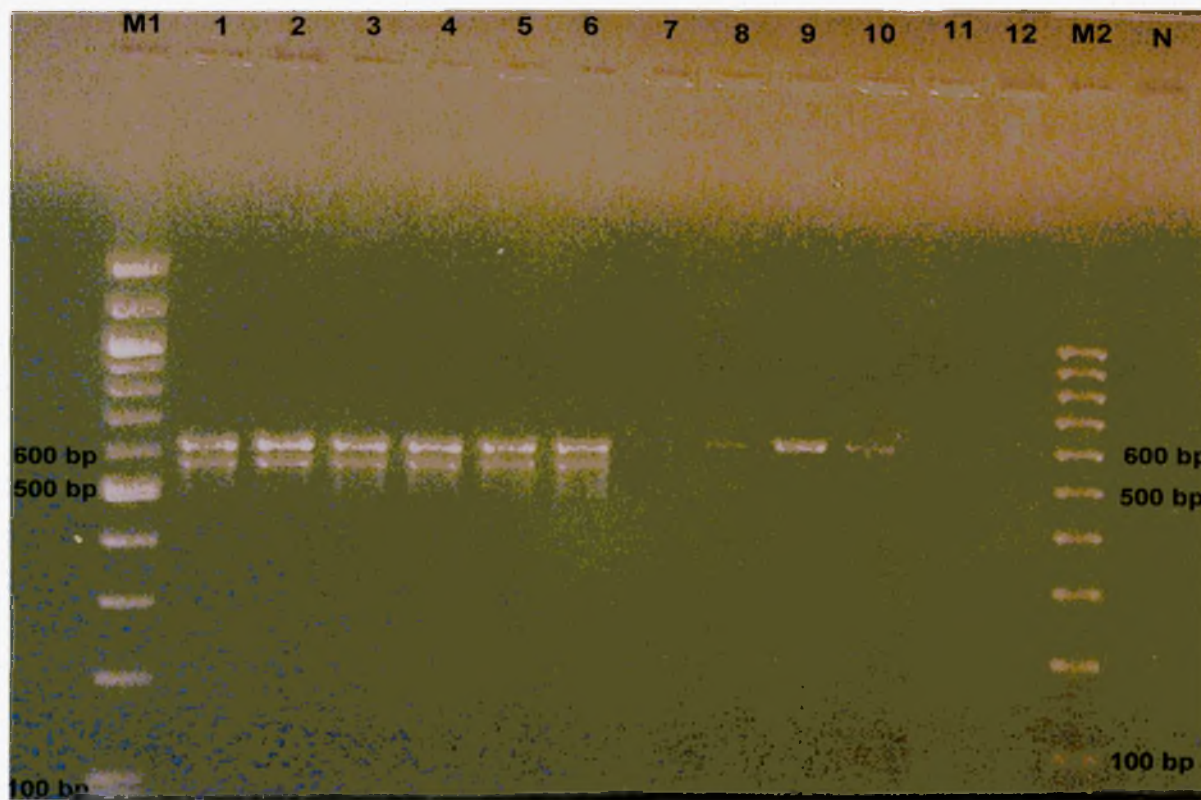
Παρατηρούμε στην εικόνα 4. από τα προϊόντα της PCR που πήραμε στην θέση 1 (570 bp και 618 bp) και στην θέση 2 (618 bp), ότι είναι δυνατή η ταυτόχρονη χρήση των δύο διαφορετικών ζευγών εκκινητών με επιτυχή ανίχνευση της *Pseudomonas entomophila*, δηλαδή διαπιστώθηκε τόσο ότι πρόκειται για είδος του γένους *Pseudomonas* όσο και ότι πρόκειται για το είδος *entomophila*. Άρα, κάνοντας μια και μοναδική PCR και με τα δύο ζεύγη εκκινητών μπορούμε απευθείας να συμπεράνουμε εάν το είδος που έχουμε προς ανίχνευση είναι *P. entomophila* και ταυτόχρονα να το διαφοροποιήσουμε από άλλες *Pseudomonas* σε ένα δείγμα.

3.4 Ανίχνευση του *Pseudomonas entomophila* σε δείγματα εντόμων.

3.4.1. Ανίχνευση του *Pseudomonas entomophila* σε εργαστηριακούς πληθυσμούς εντόμων του είδους *Drosophila melanogaster*.

Προκειμένου να έχουμε στην διάθεσή μας έντομα μολυσμένα με την *Pseudomonas entomophila*, από τα οποία θα απομονώναμε εν συνεχεία το DNA για να ελέγξουμε την παρουσία της *P. entomophila* μέσω της PCR, προχωρήσαμε στην τεχνητή επιμόλυνση ατόμων *Drosophila*. Ταυτόχρονα μια ομάδα ατόμων *D. Melanogaster* χρησιμοποιήθηκε ως αρνητικός μάρτυρας. Από κάθε ομάδα απομονώθηκε DNA έξι ατόμων.

Μετά την αντίδραση της duplex PCR και την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης συγκέντρωσης 2% πήραμε τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στην εικόνα 5.



M₁,M₂=Molecular markers, N= Negative control

Εικόνα 5. Ανίχνευση του *Pseudomonas entomophila* σε εργαστηριακά δείγματα εντόμων του είδους *Drosophila melanogaster*.

1	Δροσόφιλα μολυσμένη με <i>entomophila</i>	7	Δροσόφιλα χωρίς μόλυνση με <i>entomophila</i>
2	Δροσόφιλα μολυσμένη με <i>entomophila</i>	8	Δροσόφιλα χωρίς μόλυνση με <i>entomophila</i>
3	Δροσόφιλα μολυσμένη με <i>entomophila</i>	9	Δροσόφιλα χωρίς μόλυνση με <i>entomophila</i>
4	Δροσόφιλα μολυσμένη με <i>entomophila</i>	10	Δροσόφιλα χωρίς μόλυνση με <i>entomophila</i>
5	Δροσόφιλα μολυσμένη με <i>entomophila</i>	11	Δροσόφιλα χωρίς μόλυνση με <i>entomophila</i>
6	Δροσόφιλα μολυσμένη με <i>entomophila</i>	12	Δροσόφιλα χωρίς μόλυνση με <i>entomophila</i>

Πίνακας 5. Θέσεις στο πήκτωμα αγαρόζης των προϊόντων της PCR, (εικόνα 5)

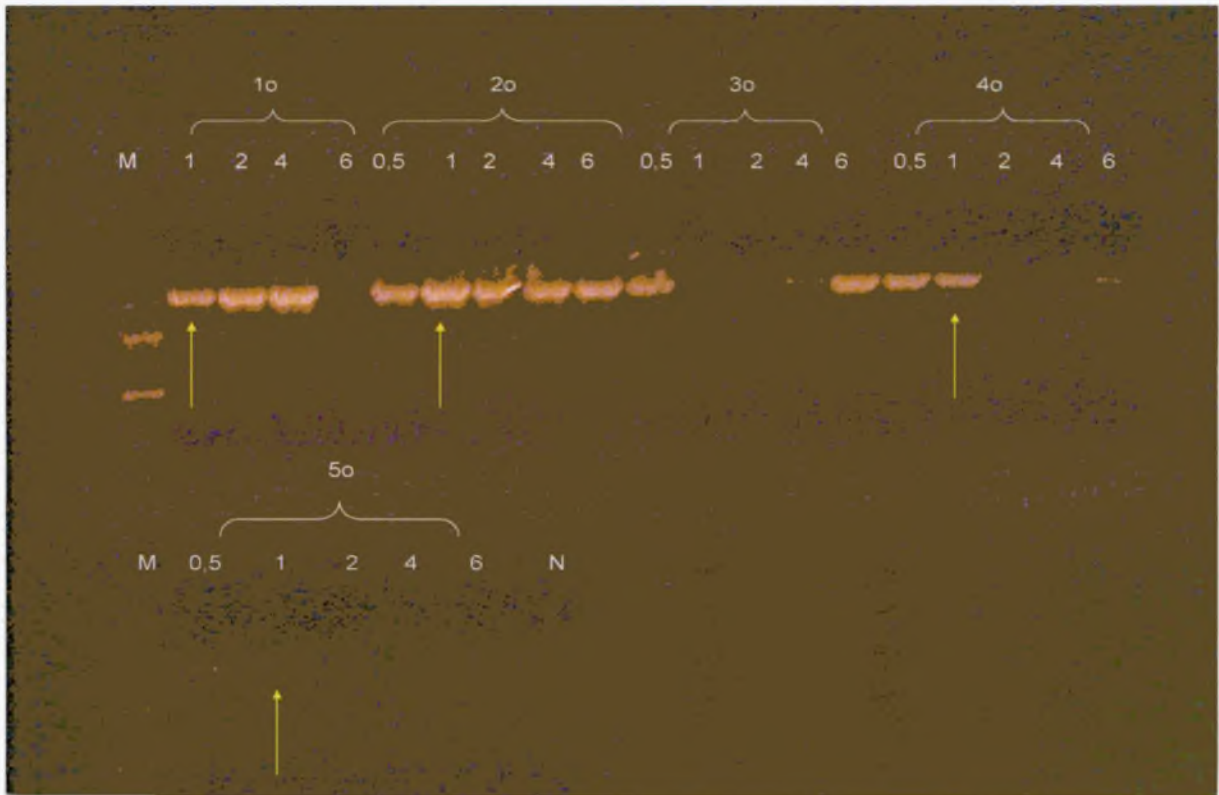
Παρατηρούμε στην εικόνα 5 και από προϊόντα της PCR που πήραμε ότι και στα έξι δείγματα που ήταν μολυσμένα με το *Pseudomonas entomophila* έγινε επιτυχής ανίχνευση του βακτηρίου με χρήση της μεθόδου duplex PCR. Αντιθέτως, σε καμία από τις έξι θέσεις που αντιστοιχούν σε μη μολυσμένα δείγματα εντόμων δεν πήραμε δύο προϊόντα και άρα δεν ανιχνεύθηκε *Pseudomonas entomophila*, γεγονός που επιβεβαιώνει την ακρίβεια και εγκυρότητα της μεθόδου. Τα προϊόντα που πήραμε στις θέσεις 8,9 και 10

απο μη μολυσμένα έντομα πιθανότατα αφορούν κάποια άλλα είδη του γένους *Pseudomonas* αφού από το μέγεθος των προϊόντων φαίνεται ότι "δούλεψε" το πρώτο ζεύγος εκκινητών το οποίο είναι σχεδιασμένο για αυτόν ακριβώς τον σκοπό.

3.4.2. Εφαρμογή της μεθόδου σε φυσικούς πληθυσμούς Δάκου της ελιάς.

Προκειμένου να δοκιμάσουμε την μεθόδου μας σε φυσικούς πληθυσμούς εντόμων, κάναμε PCR με ένα άλλο ζεύγος εκκινητών (universal primers) που έχει σχεδιασθεί για την ενίσχυση βακτηριακού 16S rDNA, χρησιμοποιώντας διάφορες ποσότητες DNA εκμαγείου του εντόμου, από 0,5μl έως 6μl, ώστε να διαπιστώσουμε σε ποια ποσότητα DNA του εντόμου είναι δυνατή η ανίχνευση βακτηρίων.

Το ζεύγος που χρησιμοποιήσαμε είναι το 5'-ACG GTT ACC TTG TTA CGA CTT-3' και 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'(10). Χρησιμοποιήσαμε πέντε άτομα *Bactrocera oleae* (Δάκος της ελιάς) από την Καλαμάτα, από τα οποία απομονώσαμε το DNA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 6, από όπου διαπιστώνουμε ότι στις θέσεις που αντιστοιχούν σε ποσότητα DNA εντόμου 1 μl πήραμε προϊόν στα τέσσερα από τα πέντε άτομα που δοκιμάσαμε. Κατά συνέπεια, προχωρήσαμε στο επόμενο βήμα που ήταν η ανίχνευση του *P. entomophila* με τους δικούς μας εκκινητές χρησιμοποιώντας πλέον ως ποσότητα DNA εκμαγείου του εντόμου το 1 μl.



M=molecular marker , N=Negative control

Εικόνα 6. PCR με τους universal primers για πέντε διαφορετικά άτομα Δάκου, με ποσότητες DNA εντόμου 0,5μl, 1μl, 2μl, 4μl, 6μl. Τα βέλη υποδεικνύουν τις θέσεις ανίχνευσης με ποσότητα DNA εκμαγείου 1 μl.

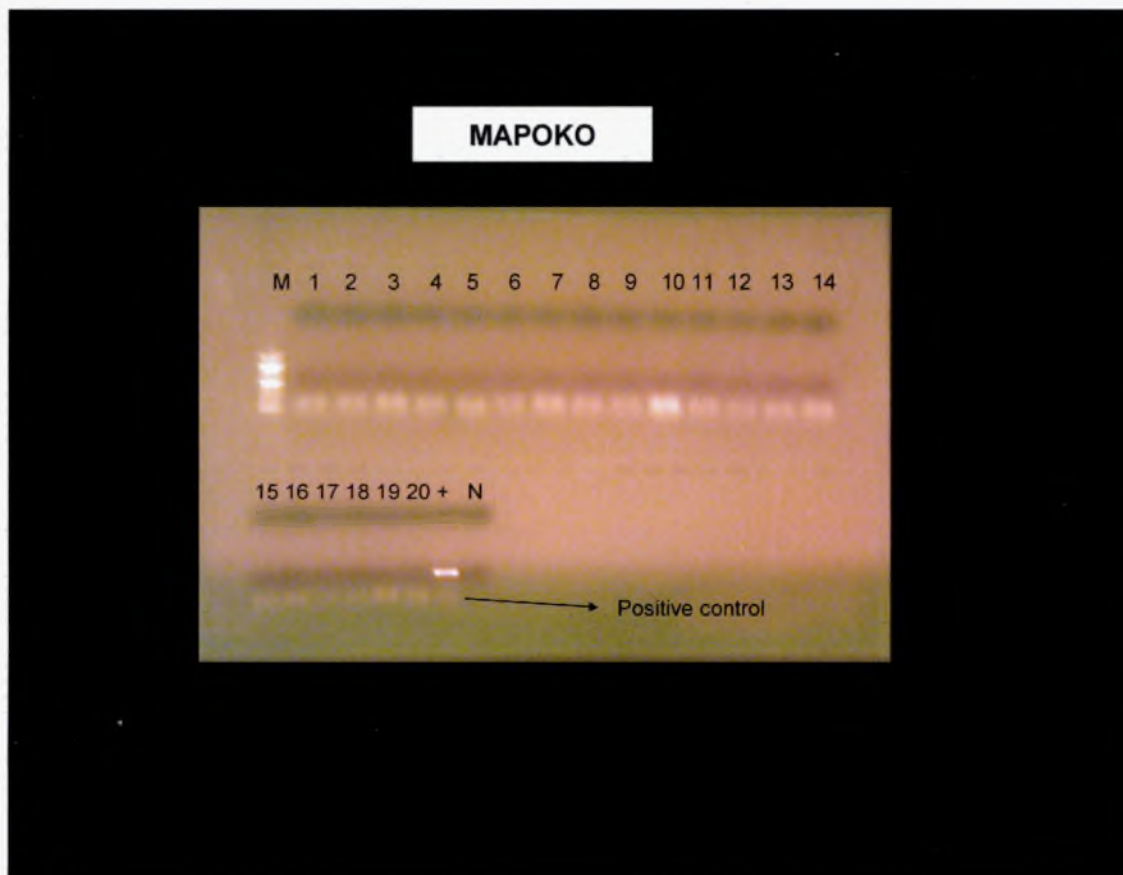
3.4.2.1. Εφαρμογή της μεθόδου σε έντομα του είδους *Bactrocera oleae*, Δάκος της ελιάς.

Έγινε χρήση της μεθόδου σε δείγματα εντόμων του Δάκου της ελιάς, τα οποία και συλλέχθηκαν από τις εξής περιοχές :

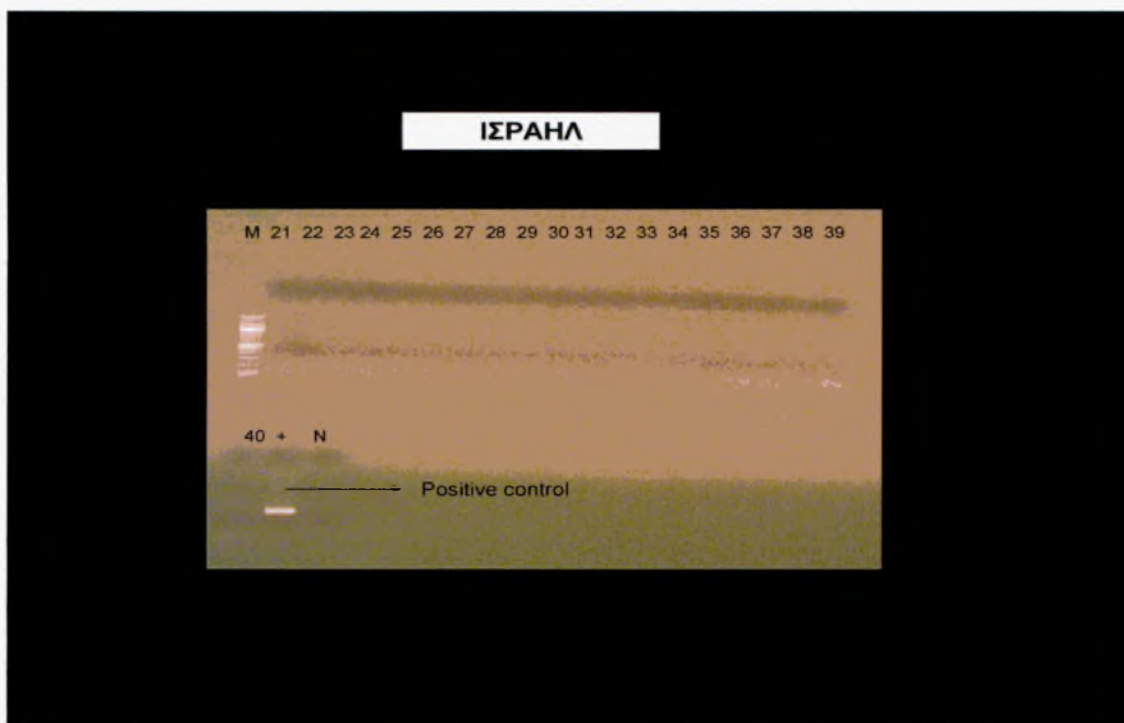
Δείγματα a/a	Χώρα προέλευσης	Έτος συλλογής
1-20	ΜΑΡΟΚΟ	2007
21-40	ΙΣΡΑΗΛ	2007
41-58	ΓΑΛΛΙΑ	2007
59-78	ΚΑΛΙΦΟΡΝΙΑ	2004
79-98	ΕΛΛΑΔΑ	2007
99-116	ΚΥΠΡΟΣ	-

Κάνοντας PCR, χρησιμοποιώντας το πρώτο ζεύγος εκκινητών που αναφέρθηκε στο κεφάλαιο 2 (το οποίο ενισχύει το 16S rDNA) και το οποίο παρουσιάζει εξειδίκευση ως προς τα είδη του γένους *Pseudomonas*, η μέθοδος φαίνεται ότι τεχνικά δεν παρουσιάζει πρόβλημα όπως φαίνεται στο θετικό κοντρόλ (positive control), χωρίς όμως να γίνει ανίχνευση κάποιου είδους *Pseudomonas*. Κατά συνέπεια δεν προχωρήσαμε στην ανίχνευση του είδους *Pseudomonas entomophila* με τους εκκινητές του δευτέρου ζεύγους.

Παρακάτω παρατίθενται όλες οι εικόνες που πήραμε ανα χώρα, όπου και απεικονίζεται το παραπάνω συμπέρασμα. Η προτελευταία θέση σε όλα τα πηκτώματα αγαρόζης, σε όλες τις εικόνες που ακολουθούν, αντιστοιχεί στο θετικό κοντρόλ (positive control) το οποίο και επιβεβαιώνει ότι "δούλεψε" η αντίδραση κανονικά, ενώ η τελευταία θέση αντιστοιχεί στο αρνητικό κοντρόλ (negative control) το οποίο και δείχνει ότι δεν υπάρχει επιμόλυνση της PCR.



Εικόνα 7. Εφαρμογή της μεθόδου σε άτομα Δάκου από Μαρόκο.



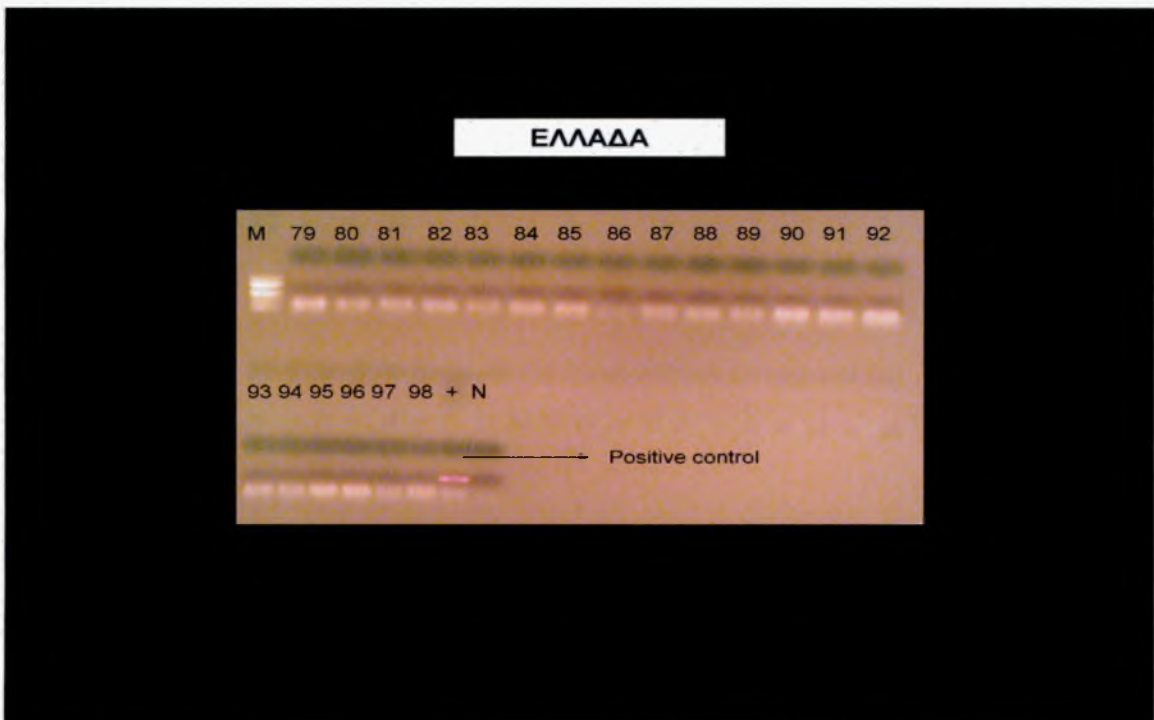
Εικόνα 8. Εφαρμογή της μεθόδου σε άτομα Δάκου από Ισραήλ.



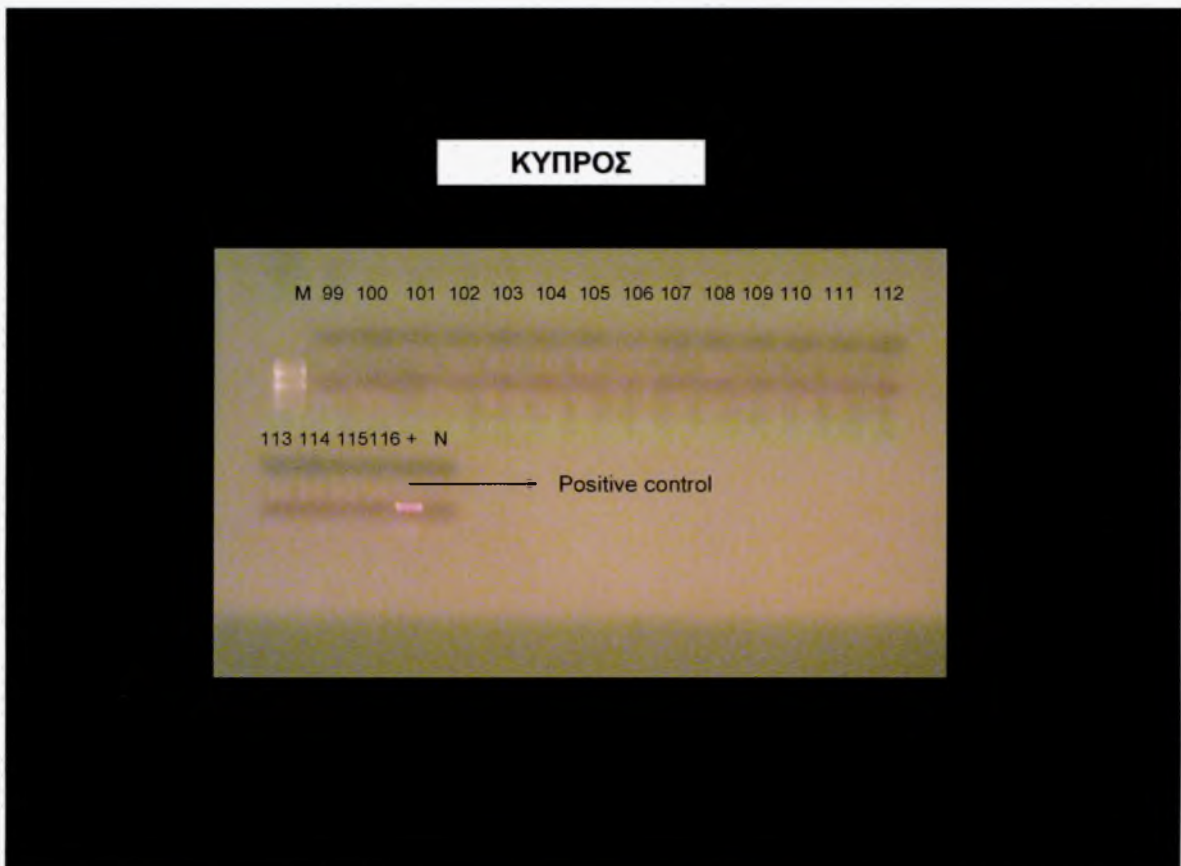
Εικόνα 9. Εφαρμογή της μεθόδου σε άτομα Δάκου από Γαλλία.



Εικόνα 10. Εφαρμογή της μεθόδου σε άτομα Δάκου από Καλιφόρνια.



Εικόνα 11. Εφαρμογή της μεθόδου σε άτομα Δάκου από Ελλάδα.



Εικόνα 12. Εφαρμογή της μεθόδου σε άτομα Δάκου από Κύπρο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4**ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

Το 2001 απομονώθηκε ένα νέο βακτηριακό στέλεχος, η *Pseudomonas entomophila*, η οποία και παρουσίαζε ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω της ικανότητάς της να θανατώνει έπειτα από κατάποσή της το έντομο *Drosophila melanogaster*. Πρόκειται για ένα Gram⁻ βακτήριο που βρίσκεται στο νερό, στο έδαφος ή στο περιβάλλον της ριζόσφαιρας. Η παρούσα εργασία έχει ως αντικείμενο μελέτης την ανίχνευση της *P. entomophila* με την χρήση PCR.

Το πρώτο βήμα ήταν η χρησιμοποίηση του ζεύγους εκκινητών PA-GS-F και PA-GS-R το οποίο ανιχνεύει μόνο είδη του γένους *Pseudomonas*. Έτσι, επιβεβαιώσαμε ότι το πρωτόκολλο της PCR που χρησιμοποιούμε ανιχνεύει με επιτυχία είδη του γένους *Pseudomonas*, κάτι το οποίο αναμενόταν από την βιβλιογραφία.(8) Στην συνέχεια, χρησιμοποιώντας DNA-εκμαγείο από τα αρχικά βακτηριακά είδη πραγματοποιήθηκε PCR με το ζεύγος εκκινητών PSEEN-1497F και PSEEN-1497R που σχεδιάστηκε από εμάς έτσι ώστε να ανιχνεύει μόνο το είδος *P. entomophila*. Βάσει των αποτελεσμάτων, είμαστε πλέον σίγουροι ότι η μέθοδός μας μπορεί να ανιχνεύσει επιτυχώς το συγκεκριμένο είδος ανάμεσα σε άλλα είδη του γένους *Pseudomonas* (τουλάχιστον αυτά που χρησιμοποιήθηκαν).

Στην συνέχεια μελετήθηκε η ευαισθησία της μεθόδου. Σκοπός μας ήταν να βρεθεί το ελάχιστο όριο (αριθμός κυττάρων) πάνω από το οποίο μπορεί να γίνει επιτυχώς ανίχνευση της *P. entomophila* με την συγκεκριμένη μέθοδο. Χρησιμοποιώντας και τα δύο προαναφερθέντα ζεύγη εκκινητών (σε διαφορετική αντίδραση PCR) η ευαισθησία της μεθόδου βρέθηκε ότι είναι 10^4 κύτταρα. Εκτίμησή μας είναι ότι η ευαισθησία της μεθόδου είναι αρκετά καλή δεδομένου ότι κατά την διάρκεια 24 ωρών μπορούν να αναπτυχθούν μέσα στο σώμα ενός εντόμου 10^8 κύτταρα ενός βακτηρίου, όπως γνωρίζουμε από την βιβλιογραφία.(12)

Το επόμενο βήμα στην όλη προσπάθεια ήταν η εφαρμογή μιας duplex PCR, δηλαδή η χρησιμοποίηση και των δύο προαναφερθέντων ζευγών εκκινητών σε μια αντίδραση. Με βάση τα αποτελέσματα που πήραμε είδαμε ότι είναι δυνατή η

εφαρμογή της duplex PCR στην ανίχνευση της *P. entomophila*. Έτσι, απλοποιείται η εφαρμογή της μεθόδου η οποία ολοκληρώνεται πλέον σε πιο στενά χρονικά πλαίσια και ταυτόχρονα μειώνεται το οικονομικό κόστος.

Δεδομένου ότι κατά την αρχική ανάπτυξη της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε DNA απομονωμένο από βακτηριακές αποικίες που αναπτύσσονται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα, το επόμενο βήμα ήταν η εφαρμογή της μεθόδου για την απευθείας ανίχνευση της σε έντομα εργαστηριακά επιμολυσμένα ή έντομα φυσικών πληθυσμών

Αρχικά εφαρμόστηκε Duplex PCR σε εργαστηριακούς πληθυσμούς εντόμων του είδους *Drosophila melanogaster* όπου είχαμε επιτυχή ανίχνευση της *P. entomophila* μόνο στα μολυσμένα άτομα της *D. Melanogaster*. Στην συνέχεια, εφαρμόστηκε η μέθοδος σε φυσικούς πληθυσμούς Δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*). Προκειμένου όμως να γνωρίζουμε σε ποια ποσότητα DNA του εντόμου είναι δυνατή η ανίχνευση βακτηρίων δεδομένου ότι ο Δάκος της ελιάς είναι αρκετά μεγαλύτερο έντομο από την Δροσόφιλα, δοκιμάσαμε ένα άλλο ζεύγος εκκινητών που ήδη γνωρίζαμε από την βιβλιογραφία(10) και το οποίο ήταν σχεδιασμένο για την ανίχνευση διαφόρων ειδών βακτηρίων (universal primers). Μετά την εφαρμογή της μεθόδου χρησιμοποιώντας διάφορες ποσότητες DNA-εκμαγείου από άτομα Δάκου της ελιάς διαπιστώθηκε ότι το 1 μl DNA εντόμου είναι ικανοποιητική ποσότητα για την ανίχνευση βακτηρίων που αποτελούν μέρος της φυσιολογική χλωρίδας . Κατά συνέπεια, προχωρήσαμε με μεγαλύτερη σιγουριά στην εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα εντόμων Δάκου της ελιάς που συλλέχθηκαν από διάφορες χώρες , χρησιμοποιώντας πλέον το ζεύγος εκκινητών PA-GS-F και PA-GS-R το οποίο ανιχνεύει μόνο είδη του γένους *Pseudomonas*. Βάσει των αποτελεσμάτων, δεν ανιχνεύθηκε κανένα είδος του γένους *Pseudomonas* και κατά συνέπεια δεν προχωρήσαμε στην εφαρμογή της μεθόδου με το ζεύγος εκκινητών που σχεδιάσαμε εμείς και το οποίο είναι εξειδικευμένο για την ανίχνευση *P. entomophila*. Συμπερασματικά, είτε δεν υπήρξε μόλυνση με βακτήριο του γένους *Pseudomonas* στα συγκεκριμένα δείγματα που ελέγχθηκαν, είτε δεν υπάρχουν συμβιωτικά βακτήρια του γένους *Pseudomonas* στο Δάκο της ελιάς.

Εν κατακλείδι, στην παρούσα προσπάθεια αναπτύχθηκε για πρώτη φορά, δεν έχει δημοσιευτεί καμία ανάλογη μελέτη στην βιβλιογραφία, μια μοριακή μέθοδος ανίχνευσης της *Pseudomonas entomophila* η οποία μπορεί να χαρακτηριστεί βάσει των αποτελεσμάτων απλή, γρήγορη, έγκυρη και άμεσα εφαρμόσιμη σε πληθυσμούς εντόμων. Δεδομένου ότι η *Pseudomonas entomophila* δείχνει να διαθέτει χαρακτηριστικά που ίσως επιτρέψουν την χρήση της στο μέλλον ως βιοεντομοκτόνο,

ευελπιστούμε ότι τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας θα αποτελέσουν ένα χρήσιμο εργαλείο στις επόμενες προσπάθειες έρευνας της οικολογίας και βιολογίας του εν λόγω βακτηρίου.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Davison KL, Shell JL: "DDT thin shells of eggs from mallard ducks maintained on ad libitum or controlled feeding regimes", Arch Environ Contam. Toxicol, v.2, 222-228, 1974
2. Rogan WJ, Chen A: "Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT)", Lancet v. 366, 763-773, 2005
3. Miranpuri G.S, Khachatourians G.G. "Role of bioinsecticides in integrated pest management and insect resistance management practices" Journal of Insect Science v. 6(2) p. 161-172, 1993
4. Losey J.E, Raynor, L.S. & Carter, M.E. "Transgenic pollen harms monarch larvae. Nature" v. 399: 214, 1999
5. Dively, G.P., Rose, R., Sears, M.K., Hellmich, R.L., Stanley-Horn, D.E., Calvin, D.D., Russo, J.M. and Anderson, P.L.. "Effects on monarch butterfly larvae (Lepidoptera: Danaidae) after continuous exposure to Cry1Ab expressing corn during anthesis." Environmental Entomology v. 33: 1116-1125, 2004
6. Vodovar N., Vallenet D., Cruveiller S., Rouy Z., Barbe V., Acosta C., Cattolico L., Jubin C., Lajus A., Segurens B., Vacherie B., Wincker P., Weissenbach J., Lemaitre B., Medigue C., Boccard F. "Complete genome sequence of the entomopathogenic and metabolically versatile soil bacterium *Pseudomonas entomophila*." Nat. Biotechnol. v. 24:673-679, 2006
7. Nicolas Vodovar, Marisa Vinals, Peter Liehl, Alan Basset, Jeril Degrouard, Paul Spellman, Frederic Boccard and Bruno Lemaitre. "Drosophila host defense after oral infection by an entomopathogenic *Pseudomonas* species" .Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS), v. 102 : 11414-11419 (2005)
8. Theodore Spilker, Tom Coenye, Peter Vandamme and John J. LiPuma. "PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients" Journal of Clinical Microbiology v. 42: 2074-2079, 2004
9. Malloch G, F. Highet, L. Kasproviczl, J. Pickup, R.Neilson and B.Fenton. Microsatellite marker analysis of peach-potato aphids (*Myzus persicae*, Homoptera:Aphididae) from Scottish suction traps. Bulletin of Entomological Research v.96, 1-10, 2006
10. Luca Mazzon, Alessia Piscedda, Mauro Simonato, Isabel Martinez-Sanudo, Andrea Squartini, Vincenzo Girolami. "Presence of specific symbiotic bacteria in flies of the subfamily Tephritinae (Diptera Tephritidae) and their phylogenetic relationships: proposal of

“Candidatus Stammerula tephritidis” International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v.58, 1277-1287, 2008

11. Peter Liehl, Mark Blight, Nicolas Vodovar, Frederic Boccard, Bruno Lemaitre. “Prevalence of Local Immune Response against Oral Infection in a Drosophila/Pseudomonas Infection Model”, PLoS Pathog 2(6): e56, 2006

12. Maria Pechy-Tarr, Denny J. Bruck, Monica Maurhofer, Esther Fischer, Christelle Vogne, Marcella D. Henkels, , Kelly M. Donahue, Jurg Grunder, Joyce E. Loper, Christoph Keel. “Molecular analysis of a novel gene cluster encoding an insect toxin in plant-associated strains of Pseudomonas fluorescens”. Environmental Microbiology, v. 10(9):2368-2386. 2008