



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ:**

**«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ- ΜΟΡΙΑΚΗ
ΓΕΝΕΤΙΚΗ, ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

-ΛΟΥΡΟΥ ΝΙΚΗ-

**«Μελέτη της εξάπλωσης ανθεκτικών σε εντομοκτόνα
αλληλομόρφων σε πληθυσμούς του δάκου της ελιάς»**



ΛΑΡΙΣΑ 2010



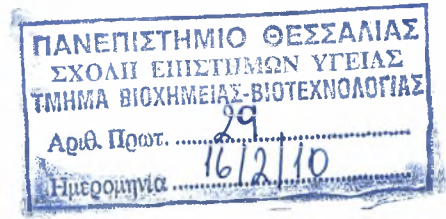
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 8123/1
Ημερ. Εισ.: 12-03-2010
Δωρεά: _____
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
634.639
ΛΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087127



**«Μελέτη της εξάπλωσης ανθεκτικών σε εντομοκτόνα
αλληλομόρφων σε πληθυσμούς του δάκου της ελιάς»**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

➤ **ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

Αναπληρωτής καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

➤ **ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ**

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

➤ **ΚΑΡΠΟΥΖΑΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ**

Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ABSTRACT	8
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ABBREVIATIONS	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
1. Η ΕΛΙΑ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ	11
1.1 ΕΧΘΡΟΙ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	13
1.1.1 Δάκος (Bactrocera oleae).....	14
1.2 ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ	16
1.2.1 Μη χημικός τρόπος.....	16
1.2.1.1 Καταπολέμηση με δακοπαγίδες.....	16
1.2.1.2 Βιολογική καταπολέμηση.....	17
1.2.1.3 Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εχθρών και ασθενειών της ελιάς.....	18
1.3 Χημικός τρόπος	18
1.3.1 Εντομοκτόνα.....	18
1.3.2 Spinosad.....	20
1.4 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ	23
1.5 ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΗ ΣΥΝΑΨΗ	25
1.5.1 Νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης.....	26
1.5.2 Ο νικοτινικός υποδοχέας του εντόμου <i>Drosophila melanogaster</i>	29
1.5.3 Ο νικοτινικός υποδοχέας των υπόλοιπων εντόμων.....	31
1.6 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ SPINOSAD	32
1.7 ΣΚΟΠΟΣ	34
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	35
2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	36
2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το έντομο <i>Bactrocera oleae</i>	36
2.2 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA.....	37
2.2.1 Εκχύλιση DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο.....	37
2.2.2 Κατακρήμνιση με αιθανόλη.....	38
2.2.3 ΠΕΨΗ DNA.....	39
2.2.4 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης με χρήση του Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega).....	40
2.3 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	41
2.3.1 Δημιουργία φορέα με άκρα Θυμίνης (T) σε πλασμίδιο pBluescriptII SK.....	41
2.3.2 Αντίδραση σύνδεσης DNA μορίων σε φορέα (ligation).....	42
2.3.3 Δεκτικά κύτταρα.....	42
2.3.3.1 Παρασκευή δεκτικών DH5α κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση.....	43
2.3.3.2 Μέτρηση της απόδοσης των δεκτικών κυττάρων.....	44
2.3.4 Διάκριση ανασυνδρασμένων και μη-ανασυνδρασμένων κλώνων.....	44
2.3.5 Ηλεκτροδιάτρηση.....	45
2.3.6 Επίστρωση τρυβλίων κάτω από ασυπτικές συνθήκες.....	45

2.3.7 Δημιουργία Stock γλυκερόλης.....	46
2.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΟΥ DNA (sequencing).....	46
2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR: Polymerase chain Reaction).....	46
2.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών.....	48
2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ.....	49
2.7 ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ.....	50
2.7.1 Δημιουργία Ανιχνευτή.....	51
2.7.2 Δοκιμασία του ανιχνευτή.....	52
2.7.3 Μέθοδος SOUTHERN.....	52
2.7.4 Προϋβριδοποίηση.....	54
2.7.5 Υβριδοποίηση.....	54
2.7.6 Ανίχνευση σήματος Υβριδοποίησης.....	54
2.8 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ.....	55
2.8.1 Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε φορέα βακτηριοφάγο λ (screening).....	56
2.8.2 Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.....	57
2.8.3 Μεταφορά των φαγικών πλακών σε μεμβράνη, υβριδοποίηση, εμφάνιση και διαλογή.....	57
2.8.4 Απομόνωση φαγικού DNA.....	58
2.9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	59
ΥΛΙΚΑ.....	61
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
3. Ενίσχυση εξονίων των γονιδίων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης.....	64
3.1 Διαλογή της φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.....	66
3.2 Ανάλυση των απομονωμένων φαγικών κλώνων.....	68
ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	75
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	76
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	80

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο για την ανάθεση της διπλωματικής αυτής εργασίας, καθώς και για την διαρκή επίβλεψη κατά την εκπόνηση της.

Επίσης, τα μέλη της τριμελούς επιτροπής τον Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Μαμούρη Ζήση, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο και το Λέκτορα Βιοτεχνολογίας Αποικοδομητικών Οργανισμών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Καρούζα Δημήτριο για τη διαρκή επίβλεψη και τις συμβουλές τους.

Τη Λέκτορα Π.Δ. 407 Μοριακής Βιολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Κακάνη Εύη για την πολύτιμη βοήθεια της στο πρακτικό μέρος και στη συγγραφή της παρούσης μελέτης.

Τη βιοχημικό και βιοτεχνολόγο και υποψήφια διδάκτορα κ. Τσουμάνη Κωνσταντίνα και τον τεχνολόγο-γεωπόνο και υποψήφιο διδάκτορα κ. Ζυγουρίδη Νίκο για την πολύτιμη βοήθεια τους στο πρακτικό μέρος της εργασίας αυτής.

Την προπτυχιακή φοιτήτρια του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας κ. Γρηγορίου Μαριλένα για τη συναδελφική αλληλεγγύη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η καλλιέργεια της ελιάς έχει μεγάλη κοινωνικοπολιτιστική και οικονομική σημασία. Η ελιά απειλείται από διάφορους εντομολογικούς εχθρούς με κυριότερο το δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Η καταπολέμηση του δάκου πραγματοποιείται με τη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται το εντομοκτόνο της τάξης των νατουραλυτών, spinosad. Το Spinosad είναι μία νευροτοξίνη με καινοτόμο τρόπο δράσης με τη συμμετοχή του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Η παρατεταμένη εφαρμογή του, θα οδηγήσει αναπόφευκτα σε ανθεκτικότητα του εντόμου-στόχου απέναντι στο εντομοκτόνο. Παρόλο που δεν έχει παρατηρηθεί ακόμη ανθεκτικότητα στο δάκο της ελιάς στον αγρό, γίνεται μία προσπάθεια κατανόησης του μοριακού μηχανισμού που προκαλεί την ανθεκτικότητα ώστε να καταστεί δυνατή η πρόβλεψη της εξέλιξης της, στη φύση. Σκοπός της παρούσης μελέτης είναι η κλωνοποίηση των πιθανολογούμενων στόχων του εντομοκτόνου με σκοπό τη διερεύνηση της ανθεκτικότητας.

Στη συγκεκριμένη εργασία, η κλωνοποίηση έγινε με βάση την ομολογία των γονιδιακών τόπων του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου με αυτόν της *Drosophila melanogaster*. Δημιουργήθηκαν ανιχνευτές από ενισχυμένες αλληλουχίες του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster* οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για τη διαλογή μίας γονιδιωματικής φαγικής βιβλιοθήκης του δάκου.

Η γνώση αλληλουχιών του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου θα επιτρέψει τη σύγκριση μεταξύ ανθεκτικών και ευαίσθητων στελεχών στο spinosad με στόχο την αποκάλυψη ποικιλομορφίας ή μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα. Ο εντοπισμός των μεταλλάξεων αυτών πιθανόν να οδηγήσει στη μετέπειτα δημιουργία ενός μοριακού τεστ για την παρακολούθηση στους φυσικούς πληθυσμούς. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσε να προβλεφθεί εγκαίρως η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας, γεγονός το οποίο θα επέτρεπε την έγκαιρη λήψη μέτρων από τους υπεύθυνους φορείς και τους καλλιεργητές.

ABSTRACT

Olive tree cultivation is of great social, cultural and financial importance. The olive tree is threatened by many entomological enemies placing the olive fly, *Bactrocera oleae* as the most damaging insect pest. Olive fly control occurs with the use of chemical insecticides. The last years, the naturalyte insecticide spinosad has been used against the olive fly. Spinosad is a neurotoxin with a novel mode of action involving the nicotinic acetylcholine receptor. Prolonged application is expected to lead to resistance. Even though there has not been observed field resistance in *Bactrocera oleae*, an effort is made in order to understand the molecular mechanism of resistance development and predict the spread of resistance in the field. The aim of the present study was to clone possible insecticide targets in order to explore the development of resistance.

In this study, the $\alpha 1$ subunit of the acetylcholine nicotinic receptor of *Bactrocera oleae* was cloned based on its homology with its counterpart in *Drosophila melanogaster*. Multiplied sequences of *Drosophila melanogaster* were used as probes in order to screen a *Bactrocera oleae* genomic phage library.

The knowledge of the nAChR sequences of *Bactrocera oleae* will allow the comparison between resistant and susceptible strains to spinosad in order to reveal resistance-associated mutations. Identification of such mutations can possibly lead to the generation of a molecular test for monitoring wild olive fly populations. This way, the resistance spread could be predicted so that precautions could be taken by the authorities and the cultivators.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ABBREVIATIONS

Ach: acetylholine
ADARs: Adenosine deaminases that act on RNA
ALS: a-like subunits
ARD: acetylcholine receptor Drosophila
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid
IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LGICs: ligand-gated ion channels
nAchRs: nicotinic Achetylcholine Receptors
OPs: Organophosphates
PBO: Piperonyl butoxide
PEG: Polyethylene glycol
SAD: second alpha-like subunit
SBD: second beta-like subunit Drosophila
SDS: sodium lauryl sulfate
SIT: Sterile Insect Technique
Ta: annealing temperature
Tm: melting temperature
VSSCs: voltage-sensitive sodium channels

Κ.Ν.Σ : Κεντρικό Νευρικό Σύστημα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. Η ΕΛΙΑ ΚΑΙ Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ

Η ελιά σηματοδοτεί την πορεία σ' ένα ανώτερο στάδιο πολιτισμού. Η ελιά φαίνεται πως ως αυτοφυές δέντρο ήταν γνωστή στη λεκάνη της Μεσογείου πριν από πολλές χιλιάδες χρόνια. Απολιθωμένα φύλλα ελιάς, ευρήματα 50.000 έως 60.000 ετών βρίσκονται στο Μουσείο Ελιάς της Σπάρτης. Στα προϊστορικά ακόμη χρόνια οι κάτοικοι των Μεσογειακών χωρών άρχισαν να καλλιεργούν συστηματικά την ελιά, βελτιώνοντας το αυτοφυές ως τότε ελαιόδεντρο. Η συστηματική καλλιέργεια της ελιάς που μπορεί να ξεκίνησε από τους κατοίκους της νεολιθικής Κρήτης, συνέβαλε στην ανάπτυξη του μινωικού πολιτισμού. Πινακίδες που αναφέρονται στην παραγωγή και διακίνηση ελαιολάδου στα ανάκτορα της Κνωσού (14^{ος} αιώνας π.Χ.) αποτελούν τις πρώτες γραπτές μαρτυρίες για την ελιά.

Πολλοί υποστηρίζουν ότι πατρίδα της ελιάς είναι η Μ. Ασία και άλλοι η Αβησσυνία ή η Αίγυπτος. Σύμφωνα με τον Θεόφραστο υπήρχαν πολλά ελαιόδεντρα στην Ν. Ιταλία, στις Ινδίες, τη Συρία και την Αίγυπτο. Οι Έλληνες είναι ο πρώτος λαός που επιδόθηκε στην καλλιέργεια της ελιάς, που θεωρείται το ιερό δέντρο τους και το συναντά κανείς στη θρησκεία, τον αθλητισμό, τη διατροφή, τη διακόσμηση, την ιατρική κλπ (εικόνα 1). Η ελιά, ακόμη, είχε πρωτεύουσα θέση στους Ολυμπιακούς Αγώνες αφού ως έπαθλο οι νικητές των Ολυμπιακών Αγώνων έπαιρναν ένα κλαδί αγριελιάς (κότινο). Η παράδοση αυτή ξεκίνησε από τους πρώτους Ολυμπιακούς Αγώνες το 776 π.Χ. μέχρι και το τέλος των αρχαίων Ολυμπιακών Αγώνων. Ο κότινος ήταν το επίσημο έμβλημα της Ολυμπιάδας της Αθήνας το 2004 και οι Ολυμπιονίκες τιμήθηκαν και στεφανώθηκαν με αυτό όπως οι αρχαίοι Έλληνες αθλητές (Θέριος, 2005).



Εικόνα 1: Το μάζεμα της ελιάς, απεικόνιση.

Οι Ρωμαίοι απέκτησαν την ελιά λίγο αργότερα από τους Έλληνες. Από την Ελλάδα μεταφέρθηκε στα παράλια της Ιταλίας και Γαλλίας και από την Αίγυπτο στα

ΝΔ της Μεσογείου μέχρι την Ισπανία. Από την Ευρώπη η ελιά μεταφέρθηκε στην Καλιφόρνια, νότια Αμερική και Αυστραλία (Θέριος, 2005).

Ο καρπός της ελιάς για τον άνθρωπο έχει σημαντική θρεπτική αξία και θεωρείται από τα πλέον ωφέλιμα τρόφιμα για τον ανθρώπινο οργανισμό. Η ελιά με τη βιταμίνη Α βοηθά τον οργανισμό στην ανάπτυξη, αναπαραγωγή, όραση, δέρμα και έχει αντικαρκινική δράση. Στην ελιά και το ελαιόλαδο βασίζεται η περίφημη Μεσογειακή διατροφή η οποία θεωρείται ως η πλέον ενδεδειγμένη (Θέριος, 2005).

Η Ευρώπη με 500 εκ. περίπου δέντρα έχει περισσότερο από τα $\frac{3}{4}$ της παγκόσμιας παραγωγής και ακολουθείται με 13% από την Ασία, με 8% από την Αφρική και 3% από την Αμερική (πίνακας 1). Η ελαιοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει το 87,21% των δενδρωδών καλλιεργειών στη χώρα μας. Η Ελλάδα είναι η τρίτη ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο με καλλιεργημένη έκταση 6.700.000 στρ. και συμμετέχει με 15% στην παγκόσμια ελαιοπαραγωγή. Ο συνολικός αριθμός εκμεταλλεύσεων της χώρας μας με ελαιώνες ανέρχεται σε 489.120 και αντιπροσωπεύει το 13% της ακαθάριστης αξίας φυτικής παραγωγής της χώρας (Θέριος, 2005).

Ήπειρος	Χώρες καλλιέργειας	Έκταση στρεμ.	Αριθμός ελαιοδέντρων
Ευρώπη	Ισπανία, Πορτογαλία, Ιταλία, Γαλλία, Γιουγκοσλαβία, Αλβανία, Ελλάδα, Ρωσία, Κύπρος	45.100.000	455.000.000
Ασία	Τουρκία, Συρία, Λίβανος, Ιορδανία, Παλαιστίνη, Ιράν, Ισραήλ, Ιαπωνία	13.370.000	73.100.000
Αφρική	Τυνησία, Αλγερία, Μαρόκο, Αίγυπτος, Ν. Αφρικανική Ένωση	10.210.000	57.000.000
Αμερική	Ην. Πολιτείες, Μεξικό, Περού, Χιλή, Αργεντινή, Ουρουγουάη	1.200.000	12.800.000
Ωκεανία	Αυστραλία	---	---
Σύνολο		69.000.000	598.700.000

Πίνακας 1: Οι χώρες όπου καλλιεργείται η ελιά, ο αριθμός ελαιοδέντρων και η έκταση των ελαιώνων σε στρέμματα σ'όλο τον κόσμο.

Συμπερασματικά θα μπορούσε να πει κανείς ότι η προσφορά της ελιάς είναι πολύπλευρη. Ο ρόλος της εκτός από τη μεγάλη σημασία στη διατροφή του ανθρώπου είναι σημαντικός στο κοινωνικό, πολιτιστικό και οικονομικό επίπεδο.

1.1 ΕΧΘΡΟΙ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η ελιά είναι ένα ευπαθές δέντρο απέναντι τόσο σε παρασιτικά έντομα όσο και σε ασθένειες προκαλούμενες από μύκητες. Ασθένειες που προκαλούνται από μύκητες είναι το Κυκλοκόνιο (*Spilocaea oleagina* ή *Cycloconium oleaginum*), Γλοιοσπόριο ή Παστέλλα (*Gleosporium olivarum*-*Melanconiaceae*), Καμαροσπόριο (*Camarosporium dalmatica*), Αδρομυκώσεις (*Verticillium spp.*) κ.α.. Ακόμη, το δέντρο της ελιάς βλάπτουν ιοί όπως ίκτερος των καρπών της ελιάς, μερική παράλυση της ελιάς, δρεπανοειδές φύλλο της ελιάς, ευλογία των καρπών της ελιάς κ.α

Τα έντομα που προσβάλλουν την ελιά ποικίλουν σε τάξεις. Τα πιο σημαντικά έντομα που βλάπτουν την ελιά είναι τα κολεόπτερα Ρυγχίτης (*Coenorrhinus cribripennis*, *Curculionidae*), Φλοιοτρίβης της ελιάς (*Phloeotribus scarabaeoides*), Φλοιοφάγος της ελιάς (*Hylesinus oleiperda*). Τα λεπιδόπτερα Μαργαρόνια (*Palpita unionallis*, *Pyralidae*) και Πυρηνοτρήτης (*Prays oleaella*) (εικόνα 2), το θυσανόπτερο Θρίπες (*Liothrips oleae*, *Phleothripidae*), το ημίπτερο Βαμβακάδα της ελιάς (*Euphyllura olivina*). Τα κοκκοειδή Λεκάνιο (*Saessetia oleae*), Πολλίνια (*Pollinia pollini*-*Asterolecaniidae*), Παρλατόρια (*Parlatoria oleae*-*Diaspididae*) και Φιλίππια (*Philippia oleae*, *Lecaniidae*). Άλλα κοκκοειδή που μπορούν να βρεθούν στους ελαιώνες είναι τα *Aspidiotus hederiae* και *Mytilapsis oleae*. Ωστόσο, τη μεγαλύτερη ζημία στο δέντρο της ελιάς, τον καρπό και την ελαιοπαραγωγή αποτελεί το δίπτερο έντομο *Bactrocera oleae* (Θέρσιος, 2005).



Εικόνα 2: α) Φλοιοφάγος της ελιάς, β) Μαργαρόνια, γ) Πυρηνοτρήτης.

1.1.1 Δάκος (*Bactrocera oleae*)

Μορφολογικά χαρακτηριστικά

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Rossi), αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παράσιτα της ελιάς. Ανήκει στην τάξη των εντόμων Diptera, οικογένεια Tephritidae.

Το ενήλικο έχει μήκος περίπου 5 mm ενώ ο γενικός χρωματισμός του είναι καστανός (Collier, 2003). Ο θώρακας είναι στα νώτα σκοτεινότερος και έχει, συνήθως, 3 κατά μήκος σκοτεινές γραμμές, υπόλευκο ή υποκίτρινο το τελευταίο από τα τρία μέρη του θώρακος και υπόλευκες ή υποκίτρινες κηλίδες στα πλάγια. Οι πτέρυγες είναι διαφανείς, ιριδίζουσες, με ένα σκοτεινό στίγμα στην άκρη και χωρίς λωρίδες εξυπηρετώντας τη διάκριση από άλλα είδη μύγας της οικογένειας των Tephritidae, όπως η μεσογειακή μύγα. Τα θηλυκά διακρίνονται από τα αρσενικά από τον ωothήτη, μία δομή στο άκρο του υπογαστρίου του θηλυκού (εικόνα 3) (Tzanakakis, 1989).

Το αυγό είναι στενόμακρο (περίπου 0,8 x 0,2 mm), κάπως οξύ στον έναν πόλο, και λευκό. Η προνύμφη είναι υπόλευκη ή ανοιχτοκίτρινη, τελικού μήκους 7-8 mm, με το πρόσθιο μέρος του σώματος στενότερο από το οπίσθιο. Δεν έχει κεφαλική κάψα και στο πρόσθιο μέρος του σώματος είναι σκοτεινόχρωμα μόνο τα στοματικά άγκιστρα και ο λοιπός κεφαλοφαρυγγικός σκελετός. Η νύμφη είναι ελλειψοειδής (περίπου 4,5 x 2,5 mm), ανοιχτοκαστανή, με περίβλημα το σκληρυμένο δερμάτιο της αναπτυγμένης προνύμφης (Τζανακάκης, 1995; Μπρούμας και Κατσόγιαννος, 2001).



Εικόνα 3: α) *Bactrocera oleae*, τέλειο θηλυκό έντομο, β) Εναπόθεση του αυγού στο καρπό της ελιάς με τον ωothήτη.

Αναπαραγωγή-βιολογικός κύκλος

Το έντομο *Bactrocera oleae* έχει 3-4 γενιές ανά έτος στις περισσότερες περιοχές της χώρας μας. Η δραστηριότητα του εντόμου σχετίζεται άμεσα με τις κλιματικές συνθήκες. Σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C αναστέλλονται οι ωοτοκίες, ενώ πάνω από 35 °C διακόπτεται κάθε δραστηριότητα του εντόμου. Οι ωοτοκίες αναστέλλονται επίσης όταν η σχετική υγρασία είναι χαμηλή (50-60%).

Από τις νύμφες του εδάφους βγαίνουν τα πρώτα ενήλικα άτομα του δάκου την άνοιξη τα οποία πετούν σε μεγάλες αποστάσεις και τρέφονται από μελιτώδεις εκκρίσεις του λεκανίου (και άλλων κοκκοειδών), καθώς και από ζαχαρούχους χυμούς φρούτων (Μπρούμας και Κατσόγιαννος, 2001).

Η ωοτοκία αρχίζει συνήθως τον Ιούλιο. Τότε οι καρποί της ελιάς είναι στο κατάλληλο μέγεθος και έχουν τον κατάλληλο βαθμό ωρίμανσης, είναι δηλαδή αρκετά μαλακοί για να τρυπηθούν από τον ωοθέτη και έχει αρχίσει να πήζει ο πυρήνας. Το θηλυκό αφού ανοίξει με τον ωοθέτη του την οπή ωοτοκίας, εισάγει στο μεσοκάρπιο ένα αυγό (κατά κανόνα). Όμως σε περιπτώσεις πολύ πυκνού πληθυσμού του εντόμου ή λίγων καρπών παρατηρούνται και περισσότερες από μία οπές ωοτοκίας ανά καρπό. Κάθε θηλυκό μπορεί να τοποθετήσει μέχρι 12 αυγά την ημέρα και συνολικά 150 έως 400 αυγά. Μετά από 3 έως 7 ημέρες εκκολάπτονται οι νεαρές προνύμφες οι οποίες ορύσσουν στοές στο μεσοκάρπιο και τρέφονται από τη σάρκα του καρπού, αφήνοντας άθικτη την επιδερμίδα. Η προνύμφη συμπληρώνει την ανάπτυξή της σε 12 με 14 ημέρες. Η νύμφωση πραγματοποιείται το μεν θέρος συνήθως μέσα στον καρπό, το δε φθινόπωρο και το χειμώνα στο έδαφος σε μικρό βάθος. Η νύμφωση στο έδαφος ή στους καρπούς φαίνεται να σχετίζεται με την κατάσταση ωριμότητας του καρπού. Συνήθως νυμφώνεται στο έδαφος όταν ο καρπός έχει προχωρήσει στην ωρίμανσή του. Η νύμφη ολοκληρώνει την ανάπτυξή της σε 7-10 ημέρες.

Ο δάκος της ελιάς διαχειμάζει ως ενήλικο σε προφυλαγμένες θέσεις ή ως νύμφη στο έδαφος σε βάθος 1-6 cm. Σε περιοχές με ήπιο χειμώνα και εφόσον υπάρχει στα δέντρα καρπός, είναι δυνατόν να συνυπάρχουν στον ελαιώνα όλα τα στάδια του εντόμου. Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου συμπληρώνεται σε περίπου ένα μήνα (Τζανακάκης, 1995).

1.2 ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Η μεγάλη σημασία της ελαιοπαραγωγής οδήγησε στην ανάπτυξη πολλών διαφόρων μεθόδων για τη διαχείριση και τη μείωση των πληθυσμών του δάκου. Οι κύριοι τρόποι είναι ο χημικός και ο μη χημικός. Στο μη χημικό ανήκουν οι ποικίλες μορφές των δακοπαγίδων, η βιολογική καταπολέμηση και η μέθοδος SIT, η ολοκληρωμένη διαχείριση ενώ στο χημικό τρόπο ανήκουν τα εντομοκτόνα όπως είναι το εντομοκτόνο της τάξης των νατουραλυτών, spinosad.

1.2.1 Μη χημικός τρόπος

1.2.1.1 Καταπολέμηση με δακοπαγίδες

Οι δακοπαγίδες μπορούν να έχουν πολλές μορφές. Υπάρχουν δακοπαγίδες οι οποίες στηρίζονται στην προσέλκυση των εντόμων λόγω του έντονου κίτρινου χρώματος και την παγίδευση τους από κόλλα (εικόνα 4). Αυτές οι παγίδες είναι μη τοξικές άλλα παγιδεύουν και ωφέλιμα έντομα. Μερικές από αυτές τις παγίδες μπορεί να έχουν και μικρή ποσότητα φερομόνης για την προσέλκυση των εντόμων (Neuenschwander, 1982).

Ακόμη, υπάρχουν οι παγίδες McPhail οι οποίες είναι γυάλινες ή πλαστικές με μία δεξαμενή για την τοποθέτηση υγρού δολώματος και μία τρύπα στο κάτω μέρος που επιτρέπει την είσοδο του εντόμου (εικόνα 4). Τα έντομα πνίγονται στο δόλωμα. Οι πρωτεϊνικές υδρολάσες είναι αποτελεσματικά δολώματα αλλά δυσκολεύουν την αναγνώριση των εντόμων. Η παγίδα McPhail προσελκύει μεγαλύτερο ποσοστό θηλυκών. Είναι αποτελεσματικές σε ελαφριάς μορφής εισβολές και είναι μη τοξικές. Ωστόσο, έχουν ακριβό χρηματικό κόστος.

Επίσης, υπάρχουν και οι παγίδες lure and kill οι οποίες προσελκύουν τα έντομα είτε λόγω του έντονου χρώματος τους είτε λόγω προσελκυστικών και περιέχουν εντομοκτόνο. Σ'αυτές τις παγίδες τα έντομα έρχονται σε επαφή με το εντομοκτόνο αλλά πεθαίνουν μετά την απομάκρυνση τους από την παγίδα εντόμων. (Neuenschwander, 1982; Broumas et al. 2002). Διαθέσιμη ακόμη είναι η παγίδα GF-120 Naturalyte Fruit Fly Bait, η οποία περιέχει το εντομοκτόνο spinosad, το οποίο αναλύεται παρακάτω και είναι εγκεκριμένο για οργανικές καλλιέργειες. Το δόλωμα αποτελείται από υδρολυμένες πρωτεΐνες. Οι θηλυκές μύγες χρειάζονται πρωτεΐνες για

την παραγωγή αυγών και έλκονται από την αμμωνία, ένα πτητικό συστατικό που σχετίζεται με την αποσύνθεση της πρωτεΐνης (Collier, 2003).



Εικόνα 4: Κολλώδης δακοπαγίδα κίτρινου χρώματος (αριστερά), Γυάλινη παγίδα McPhail ανηρητημένη σε δέντρο (δεξιά).

1.2.1.2 Βιολογική καταπολέμηση

Για την πραγματοποίηση της βιολογικής καταπολέμησης του δάκου έγιναν προσπάθειες με τη χρήση εντομοφάγων παρασίτων που βρίσκονται στον Ελλαδικό χώρο και με εισαγωγή εξωτικών παρασίτων (Θέριος, 2005) καθώς και με τη μέθοδο στείρωσης των εντόμων (SIT: Sterile Insect Technique).

Στη Μεσόγειο και στην Υποσαχάρια Αφρική ο δάκος της ελιάς δέχεται επίθεση από ένα πλήθος παρασιτικών ειδών. Το πιο γνωστό είδος αποτελεί το παρασιτοειδές *Psytalia concolor Szepilgeti*, το οποίο εισήλθε από την Αφρική στην Ιταλία και αργότερα στη Γαλλία και την Ελλάδα. Αυτό το είδος παρασιτοειδούς όμως δεν δίνει τα επιθυμητά αποτελέσματα αφού δεν συγχρονίζεται ο κύκλος ζωής του με αυτόν του δάκου (Clausen, 1978). Ωστόσο, υπάρχουν άλλα είδη παρασιτοειδών που παρασιτούν στο δάκο στην Αφρική αλλά δεν έχουν μεταναστεύσει ακόμη στην Ευρώπη ή στην Καλιφόρνια (Wharton, 1983).

Όσον αφορά στην SIT, η μέθοδος περιλαμβάνει εκτροφή μεγάλου αριθμού των εντόμων-στόχων, τα οποία εκτίθενται σε ακτινοβολία γ για την πρόκληση στειρότητας, και τη μετέπειτα επαναλαμβανόμενη απελευθέρωση τους στο περιβάλλον του αγρίου πληθυσμού. Τα απελευθερωμένα στείρα αρσενικά ζευγαρώνουν με τα αγρίου τύπου θηλυκά χωρίς να αφήνουν απογόνους (Sterile Insect Technique, Springer editions, 2005). Ωστόσο, μέχρι στιγμής αυτή η μέθοδος δεν

έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα στην καταπολέμηση του δάκου διότι τα στείρα αρσενικά έντομα είχαν διαφορετική ώρα ζευγαρώματος από τα έντομα αγρίου τύπου.

1.2.1.3 Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των εχθρών και ασθενειών της ελιάς

Η ολοκληρωμένη φυτοπροστασία, γνωστή και ως ολοκληρωμένη διαχείριση των εχθρών, ασθενειών και ζιζανίων βρίσκει μεγάλη εφαρμογή ως ξεχωριστός τομέας της ολοκληρωμένης διαχείρισης στην ελαιοκαλλιέργεια. Πρόκειται για ένα σύστημα κατά το οποίο αξιολογούνται όλες οι διαθέσιμες τεχνικές για την αντιμετώπιση των ασθενειών, εχθρών και ζιζανίων, ώστε να αποφευχθεί η οικονομική ζημιά και να ελαχιστοποιηθούν οι δυσμενείς επιπτώσεις στο περιβάλλον. Προτεραιότητα δίνεται στις φυσικές, στις καλλιεργητικές, στις βιολογικές και στις βιοτεχνολογικές μεθόδους. Οι χημικές μέθοδοι ιδιαίτερα όταν περιλαμβάνουν συνθετικά χημικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ελαχιστοποιούνται και χρησιμοποιούνται εφόσον πληρούν ορισμένες προϋποθέσεις. Χρειάζεται να είναι γνωστό το οικονομικό όριο, πέρα από το οποίο καθίσταται επιτρεπτή η χημική μέθοδος. Η εφαρμογή της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης εχθρών έχει ως βασική αρχή την επιδίωξη στο μέτρο του δυνατού της δημιουργίας στον αγρό ενός κατάλληλου φυσικού περιβάλλοντος και τη διατήρηση της φυσικής βιοποικιλότητας.

Η στρατηγική της ολοκληρωμένης αντιμετώπισης των εχθρών της ελιάς προτάθηκε προ πολλών ετών, δεν έχει όμως μέχρι σήμερα την ανάπτυξη και την αποδοχή που αναμενόταν (Θέριος, 2005).

1.3 Χημικός τρόπος

1.3.1 Εντομοκτόνα

Στην Ελλάδα, για το χημικό έλεγχο του δάκου της ελιάς, χρησιμοποιούνται διάφορα οργανοφωσφορικά σκευάσματα δραστικών ουσιών. Το Ελληνικό Υπουργείο Γεωργίας έχει ξεκινήσει πειράματα αξιολόγησης άλλων εντομοκτόνων ουσιών όπως είναι οι συνθετικές πυρεθρίνες, με στόχο τη μελλοντική αντικατάσταση των οργανοφωσφορικών. Τελευταία, έγκριση χρήσης έλαβε και το spinosad της κατηγορίας των νατουραλτών.

Οργανοφωσφορικά

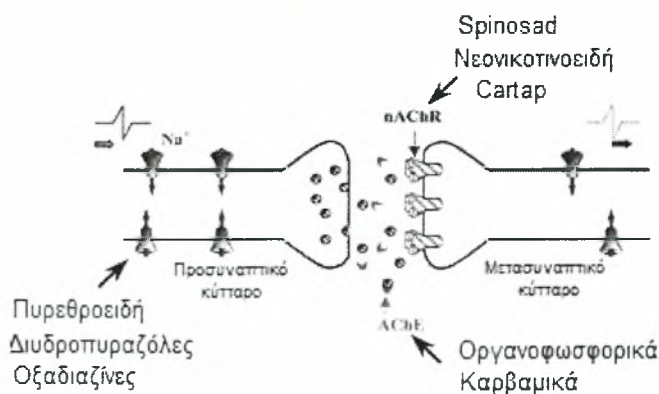
Η τοξικότητα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων βασίζεται στην αναστολή της δράσης του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης στο νευρικό σύστημα (Reigart, 1999).

Η αναστολή της δράσης των χολινεστερασών οδηγεί στη συσσώρευση της ακετυλοχολίνης στις συνάψεις, προκαλώντας υπερδιέγερση και διακοπή της νευροδιαβίβασης στο νευρικό σύστημα με αποτέλεσμα το θάνατο (Namba, 1971). Κυριότεροι εκπρόσωποι της τάξης των οργανοφωσφορικών είναι τα σκευάσματα dimethoate και fenthion. Στον υποδοχέα της ακετυλοχολίνης δρουν και άλλα εντομοκτόνα όπως το Cartap και ο νατουραλτής spinosad (εικόνα 5) (Raymond-Delpech, 2005).

Πυρεθροειδή

Η τοξικότητα των πυρεθροειδών και στα έντομα αλλά και στα θηλαστικά οφείλεται στη διακοπή της λειτουργίας των τασοελεγχόμενων καναλιών νατρίου (voltage-sensitive sodium channels, VSSCs) (Lund, 1982).

Τα πυρεθροειδή καθυστερούν την ενεργοποίηση ή το άνοιγμα των VSSCs αλλά και το ρυθμό απενεργοποίησης ή κλεισίματος και μετακινούν το δυναμικό ενεργοποίησης της μεμβράνης σε πιο υπερπολωμένα (hyperpolarized) δυναμικά (Narahashi, 1996). Η παρεμπόδιση της λειτουργίας των καναλιών νατρίου από τα πυρεθροειδή προκαλεί μόνιμη ανάσχεση της αγωγιμότητας των νευρικών ιών και τέλος το θάνατο του εντόμου. Κυριότερος εκπρόσωπος της τάξης των πυρεθροειδών είναι το *α-cypermethrin*. Στα τασοελεγχόμενα κανάλια νατρίου δρουν επίσης τα εντομοκτόνα των τάξεων των διυδροπυραζολών και οξαδιαζινών (Raymond-Delpech, 2005) και του DDT (Soderlund, 1989).



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση της χολινεργικής σύναψης με απεικόνιση των κύριων σημείων-στόχων αρκετών τάξεων εντομοκτόνων (Raymond-Delpech, 2005).

Παρόλα αυτά, παρατηρείται μία στροφή από την αντιμετώπιση με συμβατικά εντομοκτόνα η οποία αν και ήταν η επικρατούσα μέθοδος ελέγχου των εντόμων τα τελευταία 40 χρόνια, η παρατεταμένη και εκτεταμένη χρήση αυτών των προϊόντων αμφισβητείται πλέον εδώ και καιρό ιδίως από τους περιβαλλοντολόγους (Montiel Bueno, 2002). Η κατάσταση αυτή σε συνδυασμό με την αποτυχία της SIT αλλά και της ανεπάρκειας του ελέγχου μόνο με δακοπαγίδες οδήγησε στην τάση χρήσης ενός καινούργιου εντομοκτόνου που ανήκει στην τάξη των νατουραλυτών, το spinosad.

1.3.2 Spinosad

Το Spinosad είναι το πρώτο συστατικό των προϊόντων ελέγχου στην τάξη των νατουραλυτών και παρουσιάστηκε από την εταιρία Dow Agrosiences για τον έλεγχο των λεπιδοπτέρων στο βαμβάκι το 1997 με την επωνομασία Tracer (Thompson, 1997).

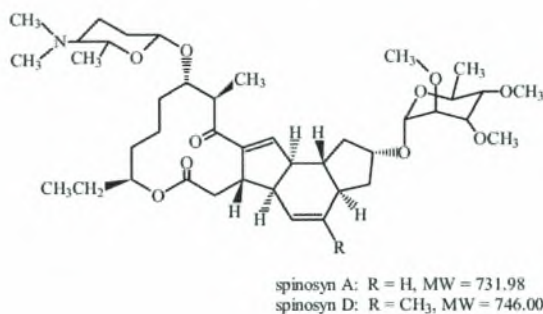
Το Spinosad είναι ένα φυσικό μείγμα των δύο ενεργών συστατικών, τις σπινোসίνες A και D. Οι σπινোসίνες παράγονται από τον ακτινομύκητα του χώματος, *Saccharopolyspora spinosa* (εικόνα 6) (Kirst, 1992), ένα αερόβιο, gram θετικό βακτήριο, ινώδους υφής (Thompson, 1997). Το όνομα Spinosad αποτελεί συγκερασμό των spinosyn A και spinosyn D.



Εικόνα 6: Ηλεκτρονικές μικρογραφίες του ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa* που δείχνουν την ακανθώδη επιφάνεια του ακτινομύκητα (αριστερά) και απεικόνιση σε εγκάρσια τομή βλαστικής φάσης του κυτταρικού κύκλου (δεξιά) (Thompson, 1997).

Δομικά, οι σπινোসίνες είναι μακρολίδες που περιέχουν ένα μοναδικό τετρακυκλικό δακτύλιο στον οποίο είναι προσδεδεμένα δύο σάκχαρα (εικόνα 7). Μετά τη ζύμωση, το spinosad εκχυλίζεται και επεξεργάζεται για να καταλήξει στη

μορφή υδάτινου αιωρήματος υψηλής συγκέντρωσης έτσι ώστε να είναι εύχρηστο και να διανέμεται εύκολα.



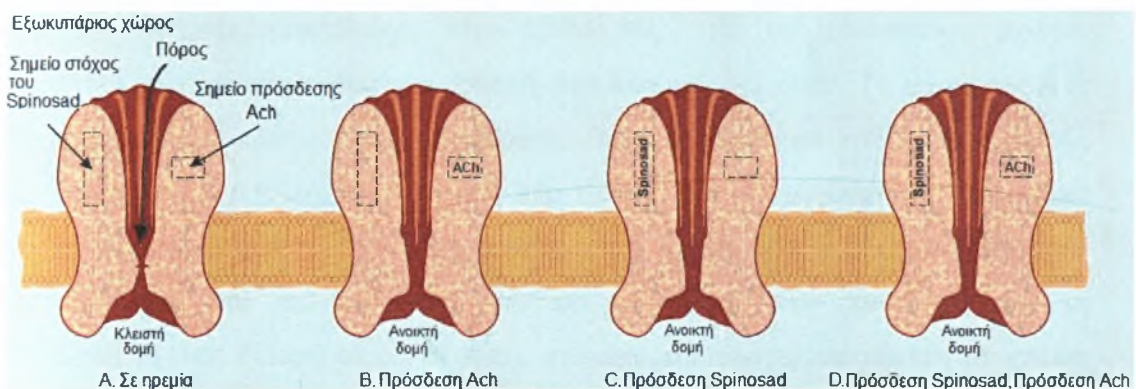
Εικόνα 7: Μοριακή δομή του εντομοκτόνου spinosad, του πρώτου ενεργού συστατικού της τάξης των νατουραλτών (Thompson, 1997).

Το spinosad είναι ένα γκριζόλευκο στερεό με μυρωδιά χρώματος ελαφρώς όμοια με στάσιμο νερό. Στο περιβάλλον η διάσπαση του spinosad επέρχεται με το συνδυασμό της φωτοδιάσπασης και της μικροβιακής διάσπασης στα φυσικά του συστατικά δηλαδή άνθρακα, οξυγόνο και άζωτο. Η ημιζωή του spinosad διαρκεί από μία ημέρα έως και δέκα επτά ανάλογα με το που θα λάβει χώρα η διάσπαση: στο χώμα, στα φυτά με φωτόλυση ή στο χώμα απουσία φωτός (Hale, 1996).

Το Spinosad είναι κατά βάση δηλητήριο του στομάχου με μικρότερη δραστηριότητα μέσω επαφής και είναι ιδιαίτερα δραστικό εναντίον των διπτέρων και των λεπιδοπτερών. Είναι επίσης αποτελεσματικό απέναντι σε ορισμένα είδη κολεοπτέρων και ορθοπτέρων που καταναλώνουν μεγάλη ποσότητα φυλλώματος. Αντίθετα, δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες ιδιότητες απέναντι σε απομυζητικά έντομα και ακάρεα (Sparks, 1999). Το spinosad εμφανίζει σχετικά χαμηλή τοξικότητα σε θηλαστικά και πουλιά και μία μέτρια σχετικά τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς. Ακόμη, χρόνιες τοξικολογικές δοκιμές σε θηλαστικά έδειξαν ότι το spinosad δεν είναι καρκινογόνο, τερατογενετικό, μεταλλαξιγόνο ή νευροτοξικό (Schoonover, 1995).

Η δηλητηρίαση με spinosad εμφανίζει συμπτώματα όπως η παράλυση. Τα έντομα ατονούν και δεν μπορούν να μετακινηθούν, και σε αντίθεση με άλλα συνθετικά εντομοκτόνα δεν συσπώνται. Το σύρσιμο και το περπάτημα αλλά και η κατανάλωση τροφής σταματά. Τα έντομα μπορεί να μην έχουν ακόμη αποβιώσει αλλά σταματούν να προκαλούν ζημία στις καλλιέργειες. Τέλος, άπαξ και τα συμπτώματα λάβουν χώρα τα έντομα δεν μπορούν να ανανήψουν με τελικό αποτέλεσμα το θάνατο του εντόμου (Bret, 1997).

Το Spinosad είναι μία νευροτοξίνη με καινοτόμο τρόπο δράσης με τη συμμετοχή του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης και του GABA υποδοχέα (Salgado, 1997; Salgado, 1998). Η σπινοςίνη Α αντί να περιορίσει την απόκριση της ακετυλοχολίνης (Ach), όπως συμβαίνει με άλλα γνωστά προϊόντα που δρουν στο νικοτινικό υποδοχέα, επιμηκύνει σε μεγάλο βαθμό τη διάρκεια της απόκρισης. Η ικανότητα της σπινοςίνης Α να επιμηκύνει τη δράση της Ach υποδεικνύει ότι η σπινοςίνη Α και η Ach μπορούν να δράσουν ταυτόχρονα και επομένως ότι πρέπει να δρουν σε διαφορετικές και διακριτές θέσεις όπως απεικονίζεται στο μοντέλο της εικόνας 8 (Salgado, 1997).



Εικόνα 8 : Το διάγραμμα αναπαριστά την πιθανή δράση του spinosad στον nAChR. Οι τοποθεσίες των θέσεων δέσμευσης του spinosad και της ακετυλοχολίνης είναι καθαρά υποθετικές. Η δέσμευση της ακετυλοχολίνης είναι αρκετή για τη διάνοιξη του καναλιού (B) και έχει προταθεί ότι το spinosad δρα μέσω ενός μηχανισμού ο οποίος ανοίγει το κανάλι ανεξαρτήτως αν υπάρχει δέσμευση (D) ή όχι (C) της ακετυλοχολίνης (Salgado, 1997).

Παρόλα αυτά δεν υπάρχουν μέχρι σήμερα, αποδείξεις ότι το spinosad προσδένεται άμεσα σε κάποια θέση του υποδοχέα, και εξακολουθεί να υπάρχει η πιθανότητα το spinosad να τροποποιεί το νικοτινικό υποδοχέα με έμμεσο τρόπο. Το spinosad εκπολώνει τους νευρώνες των εντόμων με την ενεργοποίηση των νικοτινικών υποδοχέων, προκαλώντας εκτεταμένη υπερδραστηριότητα στο νευρικό σύστημα, που οδηγεί σε ακούσιες συσπάσεις των μυών και τρόμο και τέλος το θάνατο του εντόμου (Salgado, 1997).

1.4 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΕΝΤΟΜΩΝ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, η ικανότητα δηλαδή ενός πληθυσμού να αντέχει σε δόσεις δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες, οφείλεται στην επιλογή ανθεκτικών γονιδίων που με την πάροδο των γενεών μετατρέπει αρχικά ευπαθείς πληθυσμούς σε ανθεκτικούς. Έστω κι αν ελάχιστος αριθμός ατόμων φέρει τα ανθεκτικά γονίδια, ο ρυθμός αναπαραγωγής τους, σε συνδυασμό με την ένταση της επιλεκτικής πίεσης επιτρέπει πολύ γρήγορα τη δημιουργία ανθεκτικών πληθυσμών. Η κακή χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών αφενός όχι μόνο μειώνει την αποτελεσματικότητά τους και επιβαρύνει το περιβάλλον αλλά και αφετέρου οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας.

Βιολογικοί, γενετικοί και οικολογικοί παράγοντες, (αριθμός γενεών και απογόνων, τρόπος αναπαραγωγής, προσαρμοστικότητα γονιδίων ανθεκτικότητας, μονοφαγία, μετανάστευση, καταφύγια), οι οποίοι είναι χαρακτηριστικοί για κάθε έντομο, επηρεάζουν την ταχύτητα εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στον αγρό (Navajas, 2001).

Σε γενικές γραμμές η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα αναπτύσσεται από δύο βασικούς μηχανισμούς:

A. Βιοχημική ανθεκτικότητα

Η εμφάνιση αυτής της μορφής ανθεκτικότητας είναι επακόλουθο της αποδόμησης των εντομοκτόνων σε κάποια παράγωγα τους, τα οποία δεν είναι επιβλαβή για τον οργανισμό του εντόμου. Αυτό οφείλεται στην ποσοτική αύξηση ή την αλλαγή δραστηριότητας των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την αποδόμηση τοξικών ουσιών. Τα έντομα λοιπόν που εμφανίζουν αυτή την μορφή ανθεκτικότητας θα πρέπει να διαθέτουν μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμων που αποδομούν εντομοκτόνα ή ένζυμα με μεγαλύτερη δραστηριότητα για την αποδόμηση αυτή (Salgado, 1997). Παράδειγμα αυτού του είδους ανθεκτικότητας είναι το ένζυμο εστεράση το οποίο καταβολίζει ένα μεγάλο εύρος εντομοκτόνων. Η ανθεκτικότητα που βασίζεται στο μεταβολισμό της εστεράσης οφείλεται είτε σε αλλαγές στη γονιδιακή ρύθμιση είτε σε πολλαπλασιασμό του γονιδίου (Hemingway, 2000). Ακόμη, έχει εντοπιστεί μία σημειακή μετάλλαξη σε δομικό γονίδιο η οποία μετατρέπει την ειδικότητα μίας εστεράσης ως προς μία υδρολάση ενός εντομοκτόνου: τα ανθεκτικά μεταλλάγματα παρουσίασαν αυξημένη ικανότητα υδρόλυσης οργανοφωσφορικών υποστρωμάτων

(Newcomb, 1997). Τα έντομα που εμφανίζουν αυτού του είδους την ανθεκτικότητα θα εμφανίζουν διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με άλλα εντομοκτόνα τα οποία καταβολίζονται από το ίδιο ένζυμο (Salgado, 1997).

B. Ανθεκτικότητα μειωμένης ευαισθησίας του στόχου

Πρόκειται για μειωμένη ευαισθησία, ουσιαστικά για αδράνεια του στόχου στο εντομοκτόνο. Η μειωμένη αυτή ευαισθησία οφείλεται στην ποιοτική μεταβολή του στόχου κατά τρόπο τέτοιο, που το εντομοκτόνο δεν το επηρεάζει ή έχει πολύ μικρή επίδραση. Η δομή του σημείου-στόχου του εντομοκτόνου τροποποιείται από αλλαγές στα αμινοξέα που το συγκροτούν. Αυτού του είδους η ανθεκτικότητα συνήθως εμφανίζει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με όλα τα εντομοκτόνα της ίδιας χημικής κλάσης όπως και με άλλα εντομοκτόνα που δρουν στο ίδιο σημείο. Παράδειγμα αυτού αποτελεί η διασταυρούμενη ανθεκτικότητα εντόμων στο DDT και τα πυρεθροειδή (Salgado, 1997; Raymond-Delpech, 2005). Όσον αφορά στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, έχει καταγραφεί ανθεκτικότητα στη *Musca domestica*. Τα ανθεκτικά στελέχη της *Musca domestica* εμφάνισαν παρερμηνεύσιμες μεταλλάξεις οι οποίες επηρέαζαν τα κανάλια ιόντων Na^+ . Αποτέλεσμα αυτών των μεταλλάξεων ήταν η μειωμένη ευαισθησία απέναντι στα πυρεθροειδή (Miyazaki, 1996).

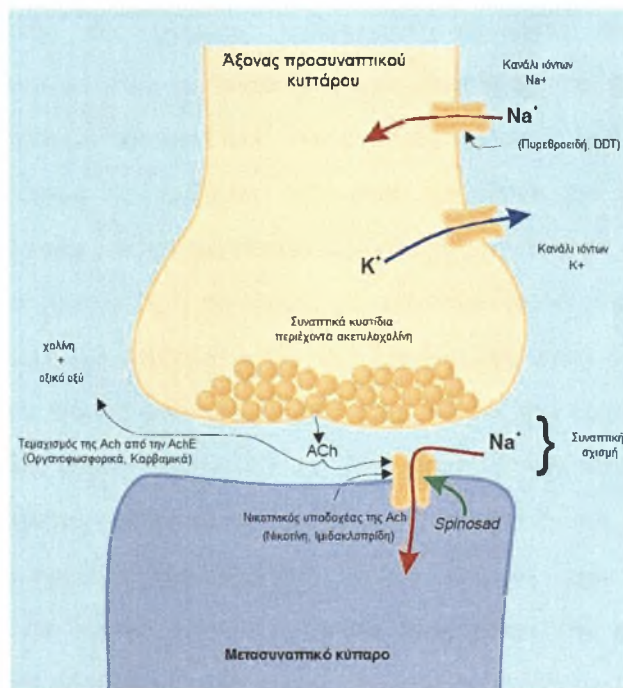
Σ' αυτό το είδος ανθεκτικότητας μπορεί να ενταχθεί και η μειωμένη διείσδυση, δηλαδή η ανθεκτικότητα που έχει να κάνει με την ποσότητα της δραστικής ουσίας που έρχεται σε επαφή με το στόχο σε συγκεκριμένο χρόνο. Οι παράμετροι που συντελούν στην εμφάνιση της είναι η ταχύτητα διείσδυσης, η ταχύτητα απέκκρισης καθώς επίσης και η ταχύτητα αποδόμησης. Όσο πιο μικρή είναι η ταχύτητα διείσδυσης σε σχέση με την ταχύτητα απέκκρισης και την ταχύτητα αποδόμησης τόσο μεγαλύτερα είναι τα ποσοστά ανθεκτικότητας που αναπτύσσει ένα έντομο. Η ανθεκτικότητα εμφανίζεται όταν ο ρυθμός διείσδυσης στο έντομο μειώνεται. Στα ανθεκτικά έντομα, η επιδερμίδα είναι τροποποιημένη δομικά ή έχει αλλάξει η σύσταση της με αποτέλεσμα τη μειωμένη απορρόφηση του εντομοκτόνου (Kakani and Mathiopoulos, 2008). Παρόλο που σπανίως είναι από μόνη της αποτελεσματική, η μειωμένη διείσδυση σε συνδυασμό με τη βιοχημική ανθεκτικότητα μπορεί να οδηγήσει σε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (Salgado, 1997).

Ειδικότερα, όσον αφορά στην ανθεκτικότητα των εντόμων στο spinosad εξετάζεται η πιθανότητα να οφείλεται σε μεταλλαγές του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης, ο οποίος συμμετέχει στη χολινεργική μεταβίβαση.

1.5 ΧΟΛΙΝΕΡΓΙΚΗ ΣΥΝΑΨΗ

Η ακετυλοχολίνη (ACh) περιέχεται μέσα σε μικρά, διαυγή, συναπτικά κυστίδια και λειτουργεί ως διαβιβαστική ουσία στις διάφορες συνάψεις του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος (Κ.Ν.Σ). Με βάση τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες οι υποδοχείς της ACh διαιρούνται σε δύο κατηγορίες, στους μουσκαρινικούς και τους νικοτινικούς.

Η ακετυλοχολίνη στις συνάψεις δρα συνήθως ερεθιστικά με μικρές μόνο εξαιρέσεις. Ένα δυναμικό δράσης στο προσυναπτικό άκρο πυροδοτεί τη σύντηξη των συναπτικών κυστιδίων, που περιέχουν ACh με την κυτταρική μεμβράνη. Αυτή η σύντηξη έχει ως αποτέλεσμα την έξοδο της ACh στη συναπτική σχισμή. Απελευθερούμενη στη συναπτική σχισμή, δρα περίπου 1-2 msec. Τα μόρια της ACh διαχέονται στην προσυναπτική μεμβράνη, όπου δεσμεύονται στους νικοτινικούς υποδοχείς της ακετυλοχολίνης. Όταν δύο μόρια ACh δεσμεύονται σε ένα μόριο νικοτινικού υποδοχέα, ανοίγουν ένα κανάλι μέσω του οποίου τα ιόντα Na^+ μπορούν να εισέλθουν στο μετασυναπτικό κύτταρο οδηγώντας στην εκπόλωση και τη διέγερση. Η ACh διασπάται υδρολυτικά, από την ακετυλοχολινεστεράση σε χολίνη και οξικό οξύ τα οποία μεταφέρονται πίσω στο προσυναπτικό κύτταρο και ανακυκλώνονται (εικόνα 9) (Salgado, 1997).



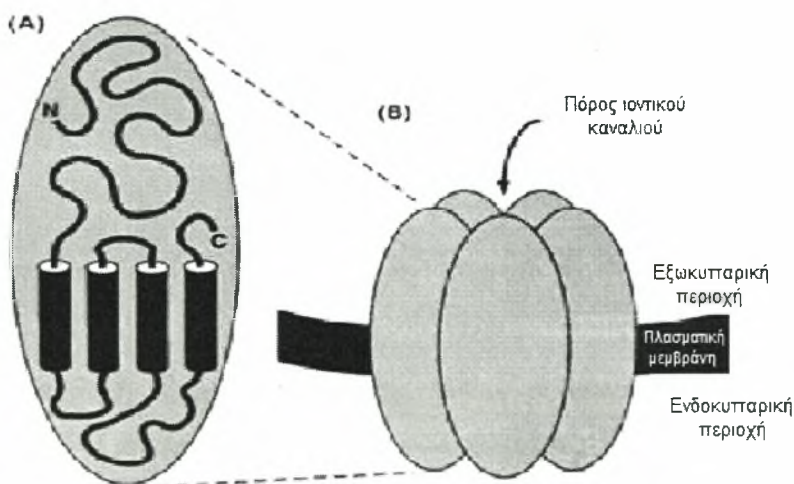
Εικόνα 9: Απεικόνιση λειτουργίας της χολινεργικής σύναψης (Salgado, 1997).

1.5.1 Νικοτινικός υποδοχέας ακετυλοχολίνης

Οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης (nAChRs) είναι προσδετοεξαρτώμενοι υποδοχείς που μεσολαβούν στη γρήγορη χολινεργική συναπτική μετάδοση στο νευρικό σύστημα των εντόμων και των σπονδυλωτών (Matsuda, 2001). Ανήκουν σε μία υπεροικογένεια cys-loop υποδοχέων που περιλαμβάνουν τους γ -αμινοβουτυρικούς υποδοχείς (GABA), τους υποδοχείς γλυκίνης, τους υποδοχείς γλουταμικού εξαρτώμενους από Cl^- και του υποδοχέα της υδροξυτριπταμίνης τύπου 3 (5-HT₃ υποδοχείς) (Lester, 2004).

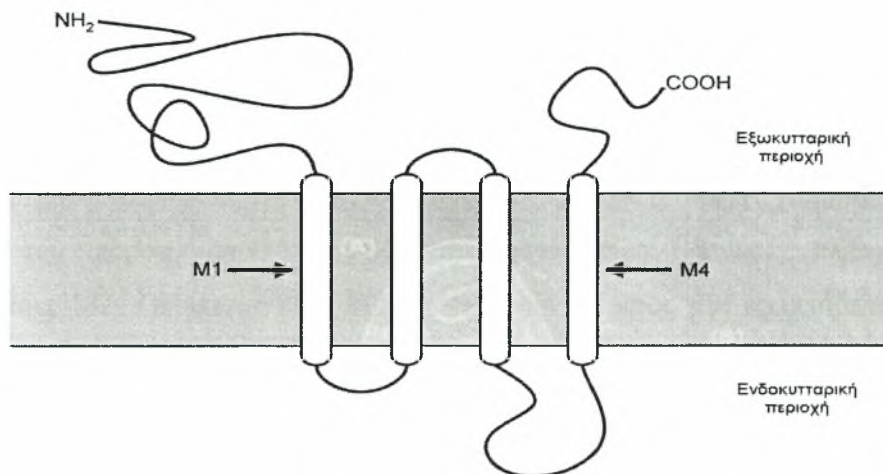
Οι νικοτινικοί υποδοχείς έχουν ένα σημαντικό ρόλο στις νευρικές και νευρομυϊκές λειτουργίες, γεγονός που αντικατοπτρίζεται από ανθρώπινες εκ γενετής μυασθένειες και συγκεκριμένα είδη επιληψίας που οφείλονται σε μεταλλάξεις σε συγκεκριμένες υπομονάδες (Engel, 2002).

Οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης αποτελούν πενταμερικές μεμβρανικές πρωτεΐνες οι οποίες σχηματίζουν ένα ολοκληρωμένο κανάλι ιόντων όπως απεικονίζεται στην εικόνα 10 (Unwin, 1996; Miyazawa 1999). Τυπικά, οι νικοτινικοί υποδοχείς γίνονται παροδικά διαπερατοί σε ιόντα (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) μετά τη δέσμευση του φυσικού προσδέτη τους, του νευροδιαβιβαστή της ακετυλοχολίνης (Karlin, 1995; 2002).



Εικόνα 10: α) Υποτιθέμενη τοπολογία των υπομονάδων του nAChR στην κυτταρική μεμβράνη, βασισμένη στις μελέτες του *Torpedo*. β) Ο συναμορλογημένος nAChR αποτελείται από 5 υπομονάδες που συγκροτούνται γύρω από ένα κεντρικό ιοντικό κανάλι (Millar 2003).

Κάθε υπομονάδα του υποδοχέα μεταφράζεται από ένα ξεχωριστό γονίδιο και αποτελείται από μία μεγάλη αμινοτελική εξωκυτταρική περιοχή, τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (TM1-TM4) που θεωρείται ότι σχηματίζουν μία α -έλικα, και μία μικρή εξωκυτταρική καρβοξυτελική ουρά (εικόνα 11) (Lester, 2004; Sine, 2006; Swore, 1999). Το αμινοτελικό άκρο της διαμεμβρανικής περιοχής TM1 συνεισφέρει στο σχηματισμό του καναλιού και υπόκειται σε δομικές αλλαγές κατά τη διαφοροποίηση των λειτουργιών του καναλιού. Η TM2 διαμεμβρανική περιοχή μαζί με το τμήμα που συνδέει τις περιοχές TM2 και TM3 είναι πιθανόν να σχηματίζουν το τοίχωμα του πόρου. Η ύπαρξη τριών δακτυλίων αρνητικού φορτίου που βρίσκονται στις πλευρές της περιοχής TM2 θεωρείται ότι προκαλεί την επιλεκτικότητα του διαύλου προς τα κατιόντα. Κάθε δακτύλιος αποτελείται από τρία ή τέσσερα αρνητικά φορτία, τα οποία φέρονται από αρνητικώς φορτισμένα αμινοξέα των διαφόρων υπομονάδων (Imoto, 1988). Οι TM3 και TM4 διαμεμβρανικές περιοχές ενώνονται μεταξύ τους με μία μεγάλη ενδοκυτταρική θηλιά, ελάχιστα συντηρημένη η οποία περιέχει πολλαπλές ρυθμιστικές θέσεις φωσφορύλιωσης (Swore, 1999).



Εικόνα 11: Δομή της υπομονάδας Mda5 του νικοτινικού υποδοχέα της *Musca domestica*. (Scott, 2008).

Στην αμινοτελική εξωκυτταρική περιοχή των υπομονάδων εντοπίζεται το σημείο πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης που σχηματίζεται από διάφορες διακριτές περιοχές (θηλίες A-F) στις εξωτερικές όψεις των υπομονάδων (Corry, 2000). Η αμινοτελική περιοχή περιέχει τη θηλιά κυστεΐνης, ένα μοτίβο που βρίσκεται σε όλους τους LGICs (ligand-gated ion channels) υποδοχείς και αποτελείται από δύο κυστεΐνες διαχωριζόμενες από 13 αμινοξικά κατάλοιπα (Karlin, 2002). Οι υπομονάδες οι οποίες έχουν δύο παρακείμενα κυστεϊνικά κατάλοιπα στη θηλιά C, τα οποία είναι

απαραίτητα για την πρόσδεση της Ach (Kao, 1986), αναφέρονται ως α υπομονάδες ενώ οι υπομονάδες που στερούνται αυτή τη δυάδα κυστεϊνών αναφέρονται ως μη-α (ή β-υπομονάδες). Για τη λειτουργία του υποδοχέα είναι απαραίτητες τουλάχιστον δύο α υπομονάδες και η παρουσία των μη-α υπομονάδων ή άλλων α υπομονάδων μπορεί να προσδώσει την ποικιλία των φυσιολογικών και φαρμακολογικών ιδιοτήτων του υποδοχέα (Sattelle, 2005).

Οι νικοτινικοί υποδοχείς έχουν τρεις λειτουργικές δομές: την κλειστή, την ανοιχτή και την κλειστή απευαισθητοποιημένη. Η έκθεση του υποδοχέα στο νευροδιαβιβαστή της ακετυλοχολίνης προκαλεί άνοιγμα του πόρου που ακολουθεί από το κλείσιμο σε μία μη επαγωγίμη μορφή. Η παρατεταμένη έκθεση του υποδοχέα σε χαμηλές συγκεντρώσεις νικοτίνης προκαλεί απευαισθητοποίηση, σταθεροποιώντας τον υποδοχέα σε κλειστή δομή (Scott, 2008).

Ο υποδοχέας έχει μία μακριά δομή όμοια με χωνί στην εξωκυτταρική περιοχή, η οποία στενεύει στο κέντρο του πόρου. Μία μικρότερη δομή σαν χωνί παρατηρείται στην κυτταροπλασματική περιοχή του υποδοχέα. Στην κλειστή κατάσταση, οι M2 υπομονάδες είναι αναδιπλωμένες με μία κάμψη προσανατολισμένη προς το κέντρο του πόρου. Αμινοξικά κατάλοιπα κλείνουν το εσωτερικό του πόρου και εμποδίζουν την μεταφορά ιόντων. Με τη δέσμευση της ακετυλοχολίνης, ο υποδοχέας μεταβαίνει στην ανοικτή κατάσταση. Η στερεοδιαμόρφωση του αμινοτελικού άκρου αλλάζει και η αλλαγή μεταδίδεται στο κέντρο του πόρου, όπου προκαλούνται μεγαλύτερες δομικές αλλαγές στις υπομονάδες M2. Οι υπομονάδες M2 περιστρέφονται προς μία εφραπτόμενη και τα ογκώδη κατάλοιπα μετακινούνται από το κέντρο του πόρου επιτρέποντας τη διόδo των ιόντων (Unwin, 1995).

Στα σπονδυλωτά (McGehee, 1996) και στο νηματοειδή *Caenorhabditis elegans* (Fleming et al., 1997; Richmond, 1999) οι νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης είναι παρόντες και στις νευρομυϊκές συνάψεις και στο νευρικό σύστημα ενώ στα έντομα η μετάδοση της χολινεργικής σύναψης περιορίζεται στο νευρικό σύστημα (Breer, 1987; Gundelfinger and Hess, 1992; Lee and O'Dowd, 1999). Οι υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα των εντόμων παρομοιάζουν σε αλληλουχία πιο πολύ στις νευρικές παρά στις μυϊκές α υπομονάδες των σπονδυλωτών. Ωστόσο, οι νευρικοί νικοτινικοί υποδοχείς της ακετυλοχολίνης των εντόμων και των σπονδυλωτών επιδεικνύουν αισθητές φαρμακολογικές ιδιότητες π.χ.

το εντομοκτόνο Ιμιδακλοπρίδη φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικό στους nAChRs των εντόμων (Liu and Casida, 1993; Matsuda et al., 1998).

Στα έντομα, η ύπαρξη συγκεκριμένων υποδοχέων για την ακετυλοχολίνη φάνηκε πρώτα από την υψηλή ευαισθησία συγκεκριμένων νευρώνων σε τοπικές εφαρμογές ή εμβαπτισμό ακετυλοχολίνης μετά την αναστολή της ενδογενούς ακετυλοχολινεστεράσης (Kerkut, 1969; Callec, 1974). Στα επόμενα χρόνια συγκεντρώθηκαν νέα δεδομένα για τις ιδιότητες και τις λειτουργίες των nAChRs με τη χρήση βιοχημικών και ηλεκτροφυσιολογικών προσεγγίσεων. Ο κύριος όγκος αυτών των πειραμάτων διεξήχθησαν στα ακόλουθα είδη εντόμων: στην κατσαρίδα *Periplaneta Americana*, στις ακρίδες *Locusta migratoria* και *Schistocerca gregaria*, στις μύγες *Drosophila melanogaster* και *Musca domestica*, στην πεταλούδα *Manduca sexta* (Breer and Sattelle, 1987).

1.5.2 Ο νικοτινικός υποδοχέας του εντόμου *Drosophila melanogaster*

Στο έντομο *Drosophila melanogaster*, το οποίο αποτελεί και έναν από τους οργανισμούς-μοντέλα, έχει περιγραφεί ολόκληρη η γονιδιακή οικογένεια του νικοτινικού υποδοχέα (πίνακας 2). Η οικογένεια αυτή αποτελείται από 10 γονίδια που εκφράζουν τις υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα. Οι επτά υπομονάδες, Da1 (ALS: a-like subunits), Da2 (SAD: second alpha-like subunit), και Da3 έως Da7 είναι α υπομονάδες ενώ οι 3 υπομονάδες Db1 (ARD: acetylcholine receptor *Drosophila*), Db2 (SBD: second beta-like subunit *Drosophila*) και Db3 είναι μη-α.

Subunit	Alternative nomenclature	Chromosomal location	Expression
Dα1	ALS, nAcRalpha-96Aa	3R	neuropiles of the optic lobes; protocerebrum; deutocerebrum and thoracic ganglion; lateral neurons
Dα2	SAD, nAcRalpha-96Ab	3R	synaptic neuropil; lateral neurons; ventral cord; subesophageal and supraesophageal ganglia; medulla; lobula and lobula plate; optic tubercle; protocerebrum
Dα3	nAcRalpha-7E	X	similar to Dα1, Dα2 and Dβ1; distal lamina of brain
Dα4	nAcRalpha-80B	3L	brain; ventral nerve cord
Dα5	nAcRalpha-34E	2L	No data
Dα6	nAcRalpha-30D	2L	No data
Dα7	nAcRalpha-18C	X	No data
Dβ1	ARD, nAcRbeta-54B	3L	neuropiles of the optic lobes; protocerebrum; deutocerebrum and thoracic ganglion; distal lamina of the optic lobe; cortical cell body layers; medulla; lateral neurons
Dβ2	SBD, nAcRbeta-96A	3R	synaptic neuropil regions of the optic lobe; medulla neuropil layers 1-6 and 8-10; lobula and lobula plate
Dβ3	nAcRbeta-21C	2L	No data

Πίνακας 2: Αναφορά, ονομασία, χρωμοσωμική θέση και έκφραση των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster* (Sattelle, 2005).

Οι υπομονάδες Da1, Da2, Da3, Da4, Dβ1 και Dβ2 είναι συγγενικές μεταξύ τους με 30-50% ταυτοποίηση και ταυτίζονται κατά 25-40% με τις υπομονάδες των σπονδυλωτών. Οι υπομονάδες Da5, Da6 και Da7 έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με την υπομονάδα α7 των σπονδυλωτών αφού ταυτίζεται κατά 45% η πεπτιδική αλληλουχία τους. Αντίθετα, η υπομονάδα Dβ3 έχει τη μικρότερη συγγένεια αφού εμφανίζει μόνο 20% ταυτοποίηση αλληλουχίας με άλλες υπομονάδες του νικοτινικού υποδοχέα ασπόνδυλων και σπονδυλωτών. Η σύσταση των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila* είναι ασαφής, κυρίως επειδή η έκφραση λειτουργικών υποδοχέων σε ετερόλογα συστήματα μέχρι στιγμής υπήρξε ανεπιτυχής (Sattelle, 2005).

Παρόλο που η *Drosophila* έχει ένα μικρό αριθμό γονιδίων για την έκφραση των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα, το εναλλακτικό μάτισμα (Stetefeld, 2005) και το pre-mRNA A-to-I editing (Seeburg, 2002) αυξάνει σε μεγάλο βαθμό το πρωτέωμα του υποδοχέα.

Στην Da4 υπομονάδα έχουν βρεθεί δύο παραλλάγματα του εξονίου 4 ενώ στην υπομονάδα Da6 έχουν βρεθεί δύο παραλλάγματα του εξονίου 3 και τρία παραλλάγματα του εξονίου 8. Καθώς στη *Drosophila* το εξόνιο 4 της Da4 και το εξόνιο 3 της Da6 περιέχουν τις θηλιές πρόσδεσης E, B, και D και το εξόνιο 8 της Da6 την περιοχή TM2, είναι πιθανό το εναλλακτικό μάτισμα αυτών των εξονίων να διαφοροποιεί τις ιδιότητες πρόσδεσης του υποδοχέα και τα χαρακτηριστικά του ιοντικού καναλιού. Στους νικοτινικούς υποδοχείς της *Drosophila* έχει παρατηρηθεί και αποκλεισμός εξονίων όπως η έλλειψη του εξονίου 2 του μετάγραφου Da4. Στην περίπτωση των υπομονάδων Da4 και Da5 η έλλειψη των εξονίων 4 και 5 αντίστοιχα οδηγεί σε αλλαγή του πλαισίου ανάγνωσης και σε ελλειμματικά μετάγραφα που δεν έχουν καμία από τις τέσσερις διαμεμβρανικές περιοχές (Lansdell, 2000; Grauso, 2002).

Το mRNA editing αφορά τη μετατροπή των καταλοίπων αδενοσίνης (A) σε ινোসίνη (I) σε μετάγραφα από τις απαμινάσες των αδενοσινών (ADARs). Η ινোসίνη στο κύτταρο μεταφράζεται ως γουανοσίνη (Seeburg, 2002). Πέντε υπομονάδες της *Drosophila* είναι γνωστό ότι υπόκεινται μετατροπή της αδενοσίνης σε ινোসίνη, η οποία τροποποιεί τα αμινοξικά κατάλοιπα σε σημαντικές για τη λειτουργία του υποδοχέα περιοχές (Hoopengardner, 2003). Συγκεκριμένα στην Da6 υπομονάδα, 7 αδενοσίνες τροποποιούνται στο αμινοτελικό άκρο και η τροποποίηση στο σημείο 3

οδηγεί σε μία μετατροπή από H σε R στη θηλιά E της θέσης πρόσδεσης της ακετυλοχολίνης.

1.5.3 Ο νικοτινικός υποδοχέας των υπόλοιπων εντόμων

Εκτός από αυτή της φρουτόμυγας *Drosophila melanogaster* έχουν περιγραφεί άλλες δύο ολοκληρωμένες γονιδιακές οικογένειες νικοτινικού υποδοχέα, του κουνουπιού *Anopheles gambiae* (Jones, 2005b) και της μέλισσας *Apis mellifera* που αποτελούνται από 10 γονίδια (Jones, 2006). Οι γονιδιακές οικογένειες του νικοτινικού υποδοχέα αυτών των εντόμων έχουν υψηλά συντηρημένες ομάδες υπομονάδων μεταξύ διαφορετικών ειδών. Έτσι, ανάλογα υπομονάδων των Da1-7 και Dβ1 και Dβ2 της *Drosophila* υπάρχουν στα είδη *Anopheles* και *Apis*. Οι υπομονάδες που κλωνοποιήθηκαν από άλλα είδη εντόμων όπως η ακρίδα και ο ψύλλος επίσης ανήκαν σε αυτές τις υψηλά συντηρημένες ομάδες (Jones, 2005c; Bass, 2006) με εξαίρεση τριών υπομονάδων (N1α2, N1α3, N1α4) από την καφέ ακρίδα *Nilaparvata lugens*, που φαίνονται να σχηματίζουν μία ξεχωριστή ομάδα υποδοχέων (Jones, 2005c; Liu, 2005).

Σε γενικές γραμμές, ανάλογες υπομονάδες νικοτινικού υποδοχέα από διαφορετικά είδη εντόμων εμφανίζουν πάνω από 60% ταυτοποίηση στην αμινοξική τους αλληλουχία και τα μέλη της Dβ1 ομάδας είναι τα πιο διατηρημένα με πάνω από 80% ταυτοποίηση. Επιπροσθέτως, τα έντομα *Anopheles* και *Apis* το κάθε ένα έχει τουλάχιστον μία διαφοροποιημένη υπομονάδα που έχει πολύ μικρή ομολογία, μικρότερη από 20% με οποιαδήποτε από τις γνωστές υπομονάδες, αντιπροσωπεύοντας ειδο-ειδικούς υποτύπους υποδοχέων (Lansdell, 2002). Το *Anopheles* έχει μία α διαφοροποιημένη υπομονάδα (Agama9) (Jones, 2005b) ενώ στην *Apis* υπάρχουν δύο διαφοροποιημένες υπομονάδες μία α και μία μη-α (Amela9, Amelβ2) (Jones, 2006). Ενδιαφέρον είναι ότι όλα τα ορθόλογα γονίδια της Dβ2 στα έντομα χαρακτηρίζονται ως α υπομονάδες, υποδεικνύοντας μία αλλαγή στη λειτουργία της υπομονάδας αυτής στη γενεαλογία της *Drosophila* (Jones, 2005c; Bass, 2006). Ακόμη, συγκρίσεις αλληλουχιών και φυλογενετικές αναλύσεις αναγνωρίζουν ορθόλογες υπομονάδες μεταξύ της *Drosophila*, του *Anopheles* και του ψύλλου της γάτας. Ωστόσο στον ψύλλο δεν αναγνωρίστηκαν υπομονάδες των υποτύπων Da6/Agama6, Da5/Agama5 Dβ3/Agama9 (Bass, 2006).

Στο *Anopheles* και στην *Apis* τα ορθόλογα γονίδια των υπομονάδων Da4 και Da6 της *Drosophila* έχουν εξόνια τα οποία ματίζονται εναλλακτικά, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση αμινοξέων σε περιοχές σημαντικές για τη λειτουργία και τη συναρμολόγηση του υποδοχέα (Lansdell, 2000; Grauso, 2002; Jones, 2005b; 2006; Sattelle, 2005). Σε πολλές υπομονάδες εντόμων, (Sattelle, 2005; Grauso, 2002) παραδείγματος χάριν του *Anopheles*, (Jones, 2005b) της *Apis*, όπως συμβαίνει και στη *Drosophila* (Jones, 2006) έχουν ανιχνευθεί ελλειμματικά μετάγραφα όπου λείπει ένα εξόνιο ή έχει εισαχθεί ένα πρώιμο κωδικόνιο λήξης, είτε με έλλειψη ενός εξονίου με αποτέλεσμα τη μετατόπιση του πλαισίου ανάγνωσης, είτε μη ματίζοντας ένα ιντρόνιο.

Όσον αφορά το mRNA editing είναι ενδιαφέρον ότι είναι διατηρημένο ανάμεσα στη *Drosophila*, στην *Apis* και στο σκουλήκι του καπνού *Heliothis virescens* ώστε να αφαιρεί μία θέση N-γλυκοζυλίωσης, η οποία μπορεί να επηρεάζει την ωρίμανση, την απευαισθητοποίηση και την αγωγιμότητα του υποδοχέα (Gehle, 1997; Nishizaki, 2003).

Ωστόσο, το μεγαλύτερο μέρος του editing στο Amela6, δεν είναι διατηρημένο στη *Drosophila* και καθόλου RNA editing δεν έχει καταγραφεί στην θηλιά E του ορθόλογου γονιδίου του *A. gambiae* (Agama6) (Jones, 2005b).

1.6 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΤΟ SPINOSAD

Παρόλο που το spinosad αποτελεί ένα σχετικά νέο εντομοκτόνο έχουν παρατηρηθεί ανθεκτικά στελέχη που έχουν συλλεχθεί από τον αγρό αλλά και ανθεκτικά στελέχη που έχουν δημιουργηθεί στο εργαστήριο. Από τις πρώτες καταγεγραμμένες περιπτώσεις ανθεκτικότητας στο spinosad αποτελεί ο πληθυσμός του διπτέρου *Plutella xylostella* (>20,600 fold) στην Αμερική (Zhao, 2002), και στη Μαλαισία που συλλέχθηκε από τον αγρό (Sayyed, 2004). Όπως και ο πληθυσμός του σκουληκιού *Spodoptera exigua* που επίσης συλλέχθηκε από τον αγρό στη Σαγκάη (>345 fold) (Wang, 2006). Ακόμη, παρατηρήθηκε ανθεκτικότητα σε δύο πληθυσμούς της κάμπιας *Liriomyza trifolii* (>188 fold) (Ferguson, 2004) οι οποίοι συλλέχθηκαν από θερμοκήπιο των Η.Π.Α. Επιπλέον, κατόπιν εργαστηριακής επιλογής, παρατηρήθηκαν υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας στο spinosad σε συλλεγμένες από τον αγρό οικιακές μύγες *Musca domestica* (>150 fold) και στο σκουλήκι του καπνού *Heliothis virescens* (Shono, 2003; Young, 2003), όπως και στο

εργαστηριακό στέλεχος της φρουτόμυγας *Bactrocera dorsalis* (>408 fold) (Hsu, 2006).

Ακόμη, η εργαστηριακή επιλογή ενός στελέχους *Drosophila melanogaster* το οποίο φέρει μία ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη με αποτέλεσμα απώλεια λειτουργίας στην υπομονάδα Da6 του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης οδήγησε σε μία αύξηση της ανθεκτικότητας απέναντι στο εντομοκτόνο spinosad της τάξης των 1181 φορών.

Εφόσον, Knockout της Da6 υπομονάδας οδηγεί σε υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας, η υπομονάδα Da6 μπορεί να είναι και η μοναδική υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα η οποία να εμπλέκεται στη πρόσδεση του spinosad ή να αποτελεί ένα απαραίτητο στοιχείο του υποδοχέα για τη δράση αυτού του εντομοκτόνου. Η περιττή φύση της υπομονάδας δίνει τη δυνατότητα στην ανθεκτικότητα να αναπτυχθεί. Δηλαδή, μπορούν να σχηματιστούν λειτουργικοί υποδοχείς απουσία της Da6, όμως, οι υποδοχείς μίας τέτοιας διαμόρφωσης εμφανίζουν ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο spinosad (Trent, 2007). Ωστόσο, επειδή η ανθεκτικότητα που παρατηρήθηκε δεν ήταν απόλυτη υπάρχει η πιθανότητα να εμπλέκονται και νικοτινικοί υποδοχείς άλλης διαμόρφωσης οι οποίοι επηρεάζονται σε λιγότερο βαθμό από το spinosad ή απαιτούν μεγαλύτερη συγκέντρωση του εντομοκτόνου.

Στην οικιακή μύγα *Musca domestica*, ωστόσο, σύμφωνα με πειράματα που διεξήγαγαν οι Shono και Scott το 2003, φάνηκε ότι η ανθεκτικότητα στο spinosad οφείλεται σε μία μεταλλαγμένη θέση-στόχο του νικοτινικού υποδοχέα και όχι σε ανερμηνεύσιμη μετάλλαξη. Επίσης, εντοπίστηκε ένας παράγοντας που επηρεάζει την ανθεκτικότητα στο αυτόσωμα 1. Το μοναδικό άλλο γνωστό γονίδιο που επηρεάζει την ανθεκτικότητα στο αυτόσωμα 1 είναι το CYP6D1. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα στο spinosad δεν φαίνεται να οφείλεται στο CYP6D1 γιατί η CYP6D1-οφειλόμενη ανθεκτικότητα μπορεί να μειωθεί δραστικά με Piperonyl Butoxide (PBO) και κληρονομείται ως επικρατές χαρακτηριστικό (Liu, 1997), δεδομένα που δεν συνάδουν με την ανθεκτικότητα σε αυτά τα στελέχη μύγας (Shono, 2003). Η ανθεκτικότητα στο spinosad στη *Musca domestica* δεν εμφανίζει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα με άλλα εντομοκτόνα ακόμη και με αυτά που δρουν στον νικοτινικό υποδοχέα (νικοτίνη) ή τον GABA υποδοχέα (κυκλοδιένες, αμπαμεκτίνη, φιπρονίλη).

1.7 ΣΚΟΠΟΣ

Η ελαιοκαλλιέργεια είναι σημαντικός παράγοντας για την Μεσογειακή διατροφή του ατόμου καθώς και ισχυρός οικονομικός παράγοντας της χώρας μας. Γι' αυτό το λόγο, πρέπει να προστατευθεί από κάθε είδους απειλή.

Ο δάκος της ελιάς είναι ο σημαντικότερος εχθρός της ελαιοπαραγωγής. Ο έλεγχος του γίνεται κατά βάση με τη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Η υπερβολική και μη ορθολογική χρήση των εντομοκτόνων προκαλεί την επιλογή ανθεκτικών ατόμων, οδηγώντας σε μείωση της βιοποικιλότητας αλλά και σε οικονομική δυσπραγία για τους παραγωγούς και την αχρηστία των υπάρχοντων εντομοκτόνων.

Γενικός σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η διερεύνηση της ανθεκτικότητας στο εντομοκτόνο spinosad. Το εντομοκτόνο spinosad ανήκει στην οικογένεια των νατουραλτών. Η περιορισμένη, μέχρι στιγμής, χρήση του δεν αναμένεται να έχει προκαλέσει ανάπτυξη ανθεκτικότητας στη φύση. Ωστόσο, η πρόσφατη εισαγωγή του στο χώρο και η αποτελεσματικότητα του συμβάλλουν στην παρατεταμένη παραμονή του στην αγορά. Η παρατεταμένη μελλοντική χρήση του προβλέπεται να δημιουργήσει σημαντικά προβλήματα ανθεκτικότητας στο εγγύς μέλλον. Επιπλέον, η υψηλή τοξικότητα του στα έντομα-στόχο ενέχει τον κίνδυνο τα λίγα έντομα που θα επιβιώσουν να εμφανίσουν μεγάλα επίπεδα ανθεκτικότητας.

Ο μηχανισμός δράσης του spinosad φαίνεται ότι είναι μοναδικός, με πρώτο στόχο τον νικοτινικό υποδοχέα της ακετυλοχολίνης. Στον οργανισμό-μοντέλο *Drosophila melanogaster* έχει εντοπιστεί μία μετάλλαξη στην υπομονάδα Da6 του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης η οποία προκαλεί την ανθεκτικότητα στο spinosad.

Ο ειδικός σκοπός στην εργασία αυτή είναι η πραγματοποίηση κλωνοποίησης των πιθανολογούμενων στόχων του εντομοκτόνου με τη χρήση εκκινητών από τα αντίστοιχα γονίδια του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης της *Drosophila melanogaster*.

Απώτερος σκοπός της εργασίας μπορεί να είναι η απομόνωση των μεταλλάξεων αυτών που οδηγούν στην ανθεκτικότητα, στη φύση, και η μετέπειτα δημιουργία ενός μοριακού τεστ για την παρακολούθηση στους φυσικούς πληθυσμούς. Έτσι, οι υπεύθυνοι θα μπορούν να κάνουν επιλογές τέτοιας φύσης ώστε ο έλεγχος των πληθυσμών του δάκου αλλά και η ανάπτυξη της ανθεκτικότητας να αντιμετωπίζονται με τον ορθολογικότερο και φιλικότερο προς το περιβάλλον τρόπο.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από το έντομο *Bactrocera oleae*

Το DNA είναι η απαραίτητη πρώτη ύλη των περισσότερων πειραματικών διεργασιών της Μοριακής Βιολογίας. Η απομόνωσή του σε καθαρή μορφή είναι προϋπόθεση για κάθε περαιτέρω διαδικασία. Φυσικά, για κάθε διαφορετικό τύπο DNA (χρωμοσωμικό, πλασμιδιακό, μιτοχονδριακό κλπ), υπάρχουν διαφορετικές μέθοδοι απομόνωσης. Όλες, όμως, έχουν ως κοινά στοιχεία την ελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή μετά από ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών και των μεμβρανών υποκυτταρικών οργανιδίων όπως οι πυρήνες και το διαχωρισμό του DNA από άλλα μακρομόρια. Η απομόνωση του χρωμοσωμικού DNA ξεκινάει με την ομογενοποίηση των ιστών του εντόμου σε διάλυμα ομογενοποίησης και ακολουθεί απομάκρυνση των πρωτεϊνών με εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και συμπύκνωση του DNA με κατακρήμνιση. Το διάλυμα ομογενοποίησης έχει τέσσερις βασικές ιδιότητες: διατηρεί την οσμωτικότητα του διαλύματος ώστε να μη γίνει απότομη ρήξη των μεμβρανών κατά τη διάρκεια της λύσης των κυττάρων, διασπά τα μεμβρανικά τοιχώματα (παρουσία SDS), διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή (~7.3) (παρουσία του ρυθμιστικού Tris) και παρεμποδίζει τη δράση νουκλεασών με την παρουσία χηλικού παράγοντα (EDTA) ο οποίος παρεμποδίζει αποτελεσματικά τη δράση των νουκλεασών γιατί δεσμεύει Ca^{+2} και Mg^{+2} που είναι απαραίτητα για τη δράση τους.

1. Τοποθέτηση του εντόμου στη ψύξη ώστε να ακινητοποιηθεί και ύστερα τοποθέτηση σε ένα σωληνάκι τύπου erpendorf.
2. Εισαγωγή 50 μl διαλύματος ομογενοποίησης στο σωληνάκι erpendorf και πραγματοποίηση της ομογενοποίησης με τη χρήση εμβόλου.
3. Προσθήκη 50 μl διαλύματος ομογενοποίησης και quick spin στις 14.000 rpm.
4. Επάωση του δείγματος στον πάγο για 30 min και φυγοκέντρηση για 15 min στις 14.000 rpm.
5. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωληνάκι erpendorf, εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση.
6. Όταν το κατακρημνισμένο DNA στεγνώσει γίνεται αναδιάλυση σε 50 μl TE-RNAάση με τη βοήθεια vortex.

7. Αποθήκευση στους 4 °C ή στους -20 °C. Το DNA με αυτό τον τρόπο μπορεί να διατηρηθεί για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.2 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ DNA

2.2.1 Εκχύλιση DNA με φαινόλη-χλωροφόρμιο

(Πρωτόκολλο από Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL, J. Sambrook, E.F.Fritsch, T. Maniatis, 1989)

Η φαινόλη, ένας οργανικός διαλύτης, έχει την ικανότητα να διαχωρίζει το DNA από τα άλλα συστατικά του μείγματος. Για να εκχυλιστεί όσο το δυνατόν περισσότερο DNA από το δείγμα, γίνεται ισχυρή ανάδευση του δείγματος ώστε να αναμειχθεί πλήρως το περιεχόμενο του. Ακολουθεί φυγοκέντρηση, η οποία έχει ως σκοπό το διαχωρισμό της υδατικής και οργανικής φάσης του δείγματος. Υπό κανονικές συνθήκες ο διαχωρισμός θα συνέβαινε από μόνος του εάν το δείγμα παρέμενε για ώρες στον πάγκο, αλλά η φυγοκέντρηση επιταχύνει τη διαδικασία. Η άνω φάση αποτελεί την υδατική φάση που περιέχει το DNA και πιθανώς μερικά θραύσματα πρωτεϊνών. Η κάτω φάση αντιστοιχεί στην οργανική φάση που περιέχει τη φαινόλη και όλα τα υπόλοιπα υλικά.

Η διαδικασία αυτή εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η αποπρωτεϊνοποίηση είναι πιο αποτελεσματική όταν χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικοί διαλύτες αντί για έναν. Επιπλέον, παρόλο που η φαινόλη μετουσιώνει αποτελεσματικά τις πρωτεΐνες, δεν αναστέλλει τελείως τη δραστηριότητα RNAσών, και αποτελεί διαλυτικό μέσο για RNA μόρια που περιέχουν μεγάλες περιοχές πολύ(A) (Brawerman, 1972).

1. Προσθήκη ίσης ποσότητας φαινόλης-χλωροφορμίου στο δείγμα του νουκλεϊκού οξέος σε ένα σωληνάκι τύπου eppendorf.
2. Ανάμειξη του μείγματος ώσπου να πάρει γαλακτώδη μορφή
3. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Εάν η οργανική και η υδατική φάση δεν διαχωριστούν καλά, πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρηση σε μεγαλύτερες στροφές ή για περισσότερη ώρα.

4. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε ένα νέο σωληνάκι erppendorf.
5. Επανάληψη των βημάτων 1-4 έως ότου να μην είναι ορατή καθόλου οι πρωτεΐνες στην επιφάνεια της οργανικής και της υδατικής φάσης.
6. Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και επανάληψη των βημάτων 2-4.
7. Ανάκτηση του νουκλεϊκού οξέος με κατακρήμνιση.

2.2.2 Κατακρήμνιση με αιθανόλη

(Πρωτόκολλο τροποποιημένο από Molecular Cloning: A LABORATORY MANUAL, J. Sambrook, E.F.Fritsch, T. Maniatis, 1989).

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων είναι η κατακρήμνιση με αιθανόλη. Το ίζημα του νουκλεϊκού οξέος, που μπορεί να σχηματιστεί κατά την παρουσία μέτριων συγκεντρώσεων μονοσθενών ιόντων, ανακτάται με φυγοκέντρηση και επαναδιάλυση στο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα στην επιθυμητή συγκέντρωση.

1. Προσθήκη 2,5 V αιθανόλη 100%, CH₃COONa με τελική συγκέντρωση 0,3 M και 0,5 μl γλυκογόνο (20 mg/ml) στο προς συμπύκνωση δείγμα .
2. Αποθήκευση στους -20 °C για τουλάχιστον 20 min και ακολούθως φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 20 min.
3. Απόρριψη του υπερκειμένου και προσθήκη 0.5 V αιθανόλης 70%, ώστε να εκπλυθεί το δείγμα από τα άλατα
4. Φυγοκέντρηση στις 14000 rpm για 5 min και απόρριψη του υπερκειμένου.
5. Όταν εξατμιστεί η αιθανόλη γίνεται επαναδιάλυση του DNA ιζήματος στην επιθυμητή ποσότητα του ρυθμιστικού διαλύματος.
6. Αποθήκευση στους 4 °C ή στους -20 °C.

2.2.3 ΠΕΨΗ DNA

Τα περιοριστικά ένζυμα, που λέγονται και περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες βάσεων σε διπλή έλικα DNA και διασπούν και τις δύο αλυσίδες της διπλής έλικας σε συγκεκριμένες θέσεις. Τα περιοριστικά ένζυμα (restriction enzymes) είναι ένζυμα που απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια. Ο βιολογικός τους ρόλος είναι να προστατεύουν τους μικροοργανισμούς αυτούς από την εισβολή ξένου DNA. Η προστασία του πυρηνικού DNA του ξενιστή (host) από τα περιοριστικά ένζυμα χαρακτηρίζεται από τροποποιήσεις που επιφέρουν στις θέσεις στόχους αυτών (Stryer, 2005).

Τα ένζυμα αυτά αναγνωρίζουν ειδικές αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ ζευγών βάσεων και υδρολύουν έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα αυτής της περιοχής. Η αλληλουχία που αναγνωρίζεται είναι παλίνδρομη και οι θέσεις διάσπασης είναι τοποθετημένες συμμετρικά. Ορισμένα περιοριστικά ένζυμα κόβουν στο κέντρο της θέσης αναγνώρισης, παράγοντας τμήματα με τυφλά άκρα. Άλλα περιοριστικά ένζυμα κόβουν ασύμμετρα τους δύο κλώνους του DNA, δημιουργώντας συμπληρωματικές μονόκλωνες άκρες μικρού μήκους στα άκρα του κάθε τμήματος (κολλώδη άκρα).

1. Τοποθέτηση σε σωληνάκι τύπου erpendorf η επιθυμητή συγκέντρωση του δείγματος DNA.
2. Προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος ενζύμου σε τελική συγκέντρωση 1X.
3. Προσθήκη ddH₂O, όσο χρειάζεται για τη συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης που πραγματοποιείται.
4. Προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας του ενζύμου. 1 unit ενζύμου πέπτει 1 μg DNA φάγου λ στη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου σε 1 h.
5. Επώαση για 1 h σε θερμοκρασία κατάλληλη για τη δράση του ενζύμου. Τα περισσότερα ένζυμα δρουν καλύτερα σε θερμοκρασία 37 °C.

2.2.4 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης με χρήση του

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega)

1. Μετά την ηλεκτροφόρηση, το επιθυμητό τμήμα DNA απομονώνεται από το πήκτωμα αγαρόζης, τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf του 1,5 ml και ζυγίζεται.
2. Προσθήκη 10 µl Membrane Binding Solution ανά 10 mg πηκτώματος. Vortex και επώαση στους 50-65 °C έως ότου το πήκτωμα διαλυθεί τελείως.
3. Εισαγωγή στήλης (SV Minicolumn) σε σωλήνα συλλογής (collection tube).
4. Μεταφορά του διαλυμένου μείγματος στη στήλη και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
5. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 min και απόρριψη του εκλούσματος και επανεισαγωγή της στήλης σε σωλήνα συλλογής.
6. Προσθήκη 700 µl Membrane Wash Solution και φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 min.
7. Απόρριψη του εκλούσματος και επανεισαγωγή της στήλης σε σωλήνα συλλογής.
8. Επανάληψη του βήματος 4 με 500 µl Membrane Wash Solution. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 5 min.
9. Απόρριψη του εκλούσματος από το σωλήνα συλλογής και επαναφυγοκέντρηση της στήλης για 1 min με το καπάκι της φυγόκεντρον ανοιχτό για την εξάτμιση υπολειμμάτων αιθανόλης.
10. Προσεκτική μεταφορά της στήλης σε ένα καθαρό eppendorf του 1,5 ml.
11. Προσθήκη 25 µl Nuclease-Free Water στη στήλη. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min. Φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για 1 min.
12. Επανάληψη του βήματος 8.
13. Απόρριψη της στήλης και αποθήκευση του DNA στους 4 °C ή στους -20 °C.

2.3 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

2.3.1 Δημιουργία φορέα με άκρα Θυμίνης (T) σε πλασμίδιο pBluescriptII SK

Η δημιουργία φορέα pBluescriptII με άκρα θυμίνης γίνεται με τη χρήση της Taq DNA πολυμεράσης. Η Taq πολυμεράση χαρακτηρίζεται από την τάση ενσωμάτωσης ενός δεοξυνουκλεοτιδίου στο 3' άκρο μίας νεοσχηματιζόμενης αλυσίδας μετά το τέλος της μήτρας. Συνήθως η Taq πολυμεράση δείχνει προτίμηση στην πρόσθεση δεοξυαδενυλικών καταλοίπων. Ως αποτέλεσμα αυτής της δραστηριότητας τα προϊόντα της αντίδρασης δεν έχουν τυφλά άκρα, αλλά μονόκλωνα κολλώδη άκρα. Αν στην αντίδραση προστεθούν μόνο δεοξυθυμιδικά κατάλοιπα τότε η πολυμεράση θα προσθέσει τα κατάλοιπα θυμίνης στο φορέα και θα σχηματιστούν τα επιθυμητά μονόκλωνα άκρα θυμίνης (Reece, 2004).

1. Πέψη της επιθυμητής συγκέντρωσης φορέα (~3 μg) με το ένζυμο EcoRV, το οποίο πέπτει μία φορά το πολυσυνδέτη και δημιουργεί τυφλά άκρα.
2. Επάση στους 37 °C για 1 h.
3. Καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο.
4. Κατακρήμνιση και επαναδιάλυση σε 20 μl H₂O.
5. Αντίδραση προσθήκης T-άκρων.
6. Προσθήκη του φορέα pBluescript, του buffer, του MgCl₂, των dTTPs, της Taq πολυμεράσης, του ddH₂O.

Αντιδραστήρια	Συγκέντρωση
Φορέας	~3 μg
Buffer 10X	1X
MgCl ₂	1,5 mM
dTTPs,	2 Mm
Taq	2-3 U
DdH ₂ O	Έως Vτελ
Τελικός V	50 μl

7. Επάση στους 72 °C για 2,5 h.
8. Καθαρισμός με φαινόλη-χλωροφόρμιο.
9. Κατακρήμνιση και επαναδιάλυση σε 50 μl H₂O.

2.3.2 Αντίδραση σύνδεσης DNA μορίων σε φορέα (ligation)

Το τελευταίο στάδιο κατασκευής ενός ανασυνδυασμένου μορίου DNA είναι η σύνδεση του φορέα και του DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης σύνδεσης χρησιμοποιούνται ένζυμα που ενώνουν τμήματα DNA μεταξύ τους, οι DNA λιγάσες, που παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιδιόρθωση και στην αντιγραφή του DNA (Watson, 2007).

Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης σύνδεσης μεταξύ ενός φορέα με κολλώδη άκρα και ενός μορίου DNA, πρέπει και το μόριο DNA να έχει τα αντίστοιχα συμπληρωματικά άκρα ως προς αυτά του φορέα. Όσον αφορά σε προϊόντα PCR, η κλωνοποίηση αυτών πραγματοποιείται σε φορέα που φέρει άκρα θυμίνης, διότι η Taq πολυμεράση στο τέλος της ενίσχυσης ενός μορίου DNA προσθέτει αδενίνες, σχηματίζοντας συμπληρωματικές με τον φορέα πολυαδενικές ουρές.

1. Προσθήκη φορέα T-vector.
2. Συμπύκνωση του DNA με κατακρήμνιση και επαναδιάλυση σε μικρότερο όγκο ώστε να επιτευχθεί καλύτερη απόδοση.
3. Προσθήκη buffer και λιγάσης.
4. Προσθήκη ddH₂O εάν είναι απαραίτητο.
5. Επώαση για 2,5 h στους 22 °C.

Αντιδραστήρια	Συγκεντρώσεις
DNA:φορέα	1:1-3:1
Buffer T4	1X
T4 λιγάση	1U
DdH ₂ O	-
Τελικός V	10 μl

2.3.3 Δεκτικά κύτταρα

Τα περισσότερα είδη βακτηρίων, συμπεριλαμβανόμενων και των *E.coli*, δέχονται περιορισμένη ποσότητα DNA κάτω από φυσιολογικές συνθήκες. Για να γίνει ο μετασχηματισμός αυτών των ειδών αποτελεσματικά, τα βακτήρια υπόκεινται κάποιες φυσικές ή και χημικές επεξεργασίες οι οποίες αυξάνουν την

ικανότητα τους να δέχονται το DNA και ονομάζονται δεκτικά (competent). (Brown, 2001).

2.3.3.1 Παρασκευή δεκτικών DH5α κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

1. Παρασκευή 250 ml υγρού θρεπτικού υλικού και αποστείρωση.
2. Προσθήκη 1 ml θρεπτικού υλικού σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα κάτω από αποστειρωμένες συνθήκες. Με μικροβιολογικό κρίκο ενοφθαλμίζεται μέρος του stock γλυκερόλης των *E.coli* DH5α κυττάρων και τοποθετείται στο σωλήνα. Επώαση στους 37 °C , στις 220 στροφές για 12-16 h.
3. Παρακράτηση 2 ml ως τυφλό, από το αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό, για τη διεξαγωγή φωτομέτρησης και διατηρούνται στους 4 °C .
4. Ενοφθαλμισμός του υπόλοιπου θρεπτικού υλικού με την καλλιέργεια του 1 ml. Επώαση στους 37 °C , στις 210 στροφές για 2 h.
5. Φωτομέτρηση η οποία επαναλαμβάνεται κάθε μία ώρα ώσπου το OD₆₀₀ να βρίσκεται μεταξύ 0,450-0,550.
6. Μεταφορά της καλλιέργειας σε τέσσερα παγωμένα falcon των 50 ml, τα οποία παραμένουν στον πάγο για 20 min, εφόσον η συγκέντρωση των βακτηρίων δώσει το επιθυμητό OD₆₀₀
7. Φυγοκέντρηση σε 4000 g, στους 4 °C για 15 min.
8. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 ml ddH₂O.
9. Επανάληψη των βημάτων 7 και 8.
10. Επανάληψη του βήματος 7.
11. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 10% γλυκερόλη ίση με το 0,08 του αρχικού όγκου.
12. Φυγοκέντρηση σε 4200 g, στους 2 °C για 10 min.
13. Απόρριψη του υπερκειμένου και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 250 μl 10% γλυκερόλη ανά falcon.
14. Δημιουργία κλασμάτων των 40 μl σε παγωμένα σωληνάκια eppendorfs.
15. Αποθήκευση στους -80 °C.

2.3.3.2 Μέτρηση της απόδοσης των δεκτικών κυττάρων

1. Μετασχηματισμός των δεκτικών κυττάρων με την εισαγωγή 10 pg πλασμιδίου pUC19 το οποίο δεν περιέχει ένθεμα.
2. Προσθήκη 700 μl SOC.
3. Επιλογή 2 μl, 4 μl, 8 μl από τα μετασχηματισμένα βακτήρια και προσθήκη dH₂O έως τελικό όγκο 200 μl.
4. Επίστρωση τρυβλίων.
5. Επώαση στους 37 °C για 12-16 h.
6. Καταμέτρηση των αποικιών σε κάθε τρυβλίο και αναγωγή σε μονάδες rfu. Στην ηλεκτροδιάτρηση η απόδοση σε rfu είναι επιθυμητό να κυμαίνεται ανάμεσα σε 10⁹-10¹¹ rfu.

2.3.4 Διάκριση ανασυνδυασμένων και μη-ανασυνδυασμένων κλώνων

Για τη διάκριση μεταξύ ανασυνδυασμένων και μη ανασυνδυασμένων κλώνων χρησιμοποιείται μία μεθοδολογία η οποία βασίζεται στο γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης του οπερονίου lac ανάλογα με το χρώμα που έχουν οι αποικίες (αν πρόκειται για βιβλιοθήκη πλασμιδίων) ή οι πλάκες (αν πρόκειται για βιβλιοθήκη φάγων). Το ένζυμο β-γαλακτοζιδάση υδρολύει τη χημική ουσία X-gal παράγοντας μία αδιάλυτη μπλε χρωστική. Σε πολλούς φορείς η θέση κλωνοποίησης βρίσκεται μέσα σε ένα γονίδιο που κωδικοποιεί το αμινοτελικό άκρο της β-γαλακτοζιδάσης και ονομάζεται lacZ'. Ένας τέτοιος φορέας μπορεί να μεταφερθεί σε κατάλληλο βακτηριακό στέλεχος, στο χρωμόσωμα του οποίου κωδικοποιείται ένα μεταλλαγμένο γονίδιο της β-γαλακτοζιδάσης, από το οποίο απουσιάζουν ορισμένες αλληλουχίες που κωδικοποιούν το αμινοτελικό της άκρο. Στην περίπτωση αυτή, οι πολυπεπτιδικές αλυσίδες που παράγονται από το μεταλλαγμένο γονίδιο και το lacZ' συνδυάζονται και προκύπτει το ενεργό ένζυμο. Έτσι οι αποικίες ή οι πλάκες που περιέχουν φορείς στους οποίους δεν έχει γίνει ένθεση DNA, αποκτούν μπλε χρώμα, αν στο μέσο της καλλιέργειας προστεθεί X-gal. Αντιθέτως, οι βακτηριακές αποικίες ή οι πλάκες των φάγων που φέρουν ανασυνδυασμένους φορείς παραμένουν άχρωμες («λευκές»), καθώς η ένθεση ενός τμήματος DNA στο lacZ' προκαλεί την αδρανοποίηση του. (Watson, 2007).

2.3.5 Ηλεκτροδιάτρηση

Τα κύτταρα αναμειγνύονται με το εξωγενές DNA μέσα σε μία κατάλληλη κυψελίδα, η οποία βρίσκεται σε επαφή με δύο ηλεκτρόδια συνδεδεμένα με ένα ειδικό τροφοδοτικό. Από τη συσκευή αυτή διοχετεύεται ένας σύντομος ηλεκτρικός παλμός, ο οποίος προκαλεί το παροδικό άνοιγμα οπών στις κυτταρικές μεμβράνες. Μέσω των πόρων αυτών το DNA εισέρχεται στα κύτταρα, τα οποία κατόπιν μεταφέρονται σε φρέσκο θρεπτικό μέσο. Το εξωγενές DNA υφίσταται σε ένα μεγάλο ποσοστό των κυττάρων ως εξωχρωμοσωμικό γενετικό υλικό, ενώ σε ένα μικρό μόνο ποσοστό ενσωματώνεται στο γονιδίωμα τους, ώστε να μεταβιβάζεται στη συνέχεια από γενιά σε γενιά (Watson, 2007).

1. Αραίωση της αντίδρασης σύνδεσης 1 προς 10 με τελικό όγκο 10 μl.
2. Μεταφορά 2 μl της αραίωσης της αντίδρασης σύνδεσης σε κλάσμα δεκτικών κυττάρων, το οποίο έχει προηγουμένως τηχθεί σε πάγο.
3. Επώαση 1 min σε πάγο.
4. Ηλεκτροδιάτρηση σε συσκευή.
5. Προσθήκη 700 μl διάλυμα SOC και μεταφορά σε αποστειρωμένο σωλήνα.
6. Επώαση του υλικού σε αναδευτήρα στους 37 °C, στις 180 στροφές για 45 min.
7. Επίστρωση των καλλιεργειών της ηλεκτροδιάτρησης στα τρυβλία υπό ασυπτικές συνθήκες.

2.3.6 Επίστρωση τρυβλίων κάτω από ασυπτικές συνθήκες

1. Παρασκευή της επιθυμητής ποσότητας στερεού θρεπτικού υλικού.
2. Αποστείρωση.
3. Προσθήκη αμπικιλίνης σε τελική συγκέντρωση 100 μg/ml, αφού επέλθει μείωση της θερμοκρασίας του στερεού θρεπτικού υλικού σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Τοποθέτηση του στερεού θρεπτικού μέσου με Amp στα τρυβλία υπό ασυπτικές συνθήκες και αυτά αφήνονται να στερεοποιηθούν.
5. Λήψη 150 μl από την καλλιέργεια, προσθήκη 30 μl X-gal και 3 μl IPTG.
6. Επίστρωση του τρυβλίου και επώαση στους 37 °C για 12-16 h.

2.3.7 Δημιουργία Stock γλυκερόλης

1. Τοποθέτηση σε σωληνάκι τύπου erpendorf 850 μl από την πολλαπλασιασμένη υγρή βακτηριακή καλλιέργεια και προσθήκη 150 μl γλυκερόλης.
2. Ανάδευση και αποθήκευση στους -80 °C.

2.4 ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΤΟΥ DNA (sequencing)

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Sanger από την εταιρία Macrogen που εδρεύει στην Κορέα. Η αποστολή των δειγμάτων για αλληλούχιση γίνεται σε σωληνάρια τύπου erpendorf. Τα δείγματα πρέπει να περιέχουν 1,5 μg DNA σε τελική συγκέντρωση 100 ng/μl. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι T3 και T7 του φορέα pBluescriptII. Στην περίπτωση που το ένθεμα είναι μεγαλύτερο μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ένας εσωτερικός, ειδικός για το αναμενόμενο ένθεμα εκκινητής ο οποίος θα δείξει εάν το επιθυμητό ένθεμα έχει όντως κλωνοποιηθεί.

2.5 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

(PCR: Polymerase chain Reaction)

Η τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης επινοήθηκε από τον Kary Mullis στα μέσα της δεκαετίας του 1980 και έφερε επανάσταση στη μοριακή γενετική. Η PCR έχει ως αποτέλεσμα την επιλεκτική ενίσχυση μίας περιοχής ενός DNA μορίου. Όλη η αντίδραση PCR ολοκληρώνεται στο ίδιο μείγμα αντιδραστηρίων, για το οποίο απαιτούνται: DNA στόχος, εκκινητές (primers), τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια, ένζυμο Taq πολυμεράση, ιόντα Mg^{2+} απαραίτητα για την ενζυμική δράση και κατάλληλο ρυθμιστικό pH για τη δράση του ενζύμου. Η σειρά των τριών σταδίων, αποδιάταξη (denaturation), υβριδισμού των εκκινητών (primers annealing) και επέκτασης των εκκινητών με τη σύνθεση καινούργιου κλώνου (extension) αποτελούν ένα κύκλο της αντίδρασης PCR και κάθε στάδιο πραγματοποιείται σε διαφορετική θερμοκρασία.

- Η αποδιάταξη του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 94-95 °C για 30 sec περίπου, διασπώντας τα ζεύγη βάσεων και δημιουργώντας μονόκλωνες μήτρες για τον επόμενο κύκλο της αντίδρασης.

- Ο υβριδισμός ανάλογα με τη σύνθεση των βάσεων A/T, G/C των εκκινητών σε θερμοκρασία 50-65 °C. Η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από τη θερμοκρασία τήξης T_m των εκκινητών. Η θερμοκρασία τήξεως υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο των Thein και Wallace $T_m = 4x$ (αριθμός των βάσεων G+C) + $2x$ (αριθμός των βάσεων A+T). Η ειδικότητα της αντίδρασης οφείλεται κατά μεγάλο ποσοστό στη θερμοκρασία υβριδισμού (T_a - annealing temperature) των εκκινητών. Συνήθως η θερμοκρασία υβριδισμού T_a , επιλέγεται να είναι κατά 5 °C μικρότερη του T_m .

- Τέλος η επέκταση των εκκινητών στους 72-74 °C εξαρτάται από το μέγεθος του προϊόντος της PCR και της ποσότητας της DNA πολυμεράσης. Ως επί το πλείστον χρησιμοποιείται η Taq DNA πολυμεράση, μία θερμοσταθερή πολυμεράση του βακτηρίου *Thermus aquaticus*, η οποία στη βέλτιστη θερμοκρασία 72 °C, προσθέτει 1000 bp/λεπτό, ενώ είναι αρκετά σταθερή ακόμη και στους 94 °C (Watson, 2007).

Στάδια PCR	Θερμ.	Χρονική διάρκεια	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη DNA	94 °C	4 min	1
Αποδιάταξη DNA	94 °C	30 sec	30
Υβριδισμός εκκινητών	51 °C	30 sec	
Πολυμερισμός αλυσίδων	72 °C	30 sec	
Τελικός πολυμερισμός	72 °C	5 min	1
Συντήρηση	4 °C	επ' αόριστον	

Οι παράγοντες που επιδρούν στη αντίδραση PCR είναι η ακεραιότητα, το μήκος και η αλληλουχία του τμήματος DNA που πρόκειται να ενισχυθεί (Brown, 2001), η DNA πολυμεράση, η θερμοκρασία υβριδισμού, η συγκέντρωση ιόντων Mg^{2-} , η συγκέντρωση ddNTPs, ο αριθμός των κύκλων και οι αναστολείς και ενισχυτές της αντίδρασης PCR. Επίσης, πολύ σημαντική παράμετρος είναι και η καταλληλότητα των εκκινητών.

2.5.1 Σχεδιασμός εκκινητών

Οι εκκινητές αποτελούν το στοιχείο-κλειδί στην επιτυχία ή αποτυχία μίας αντίδρασης PCR. Οι εκκινητές επιλέγονται ούτως ώστε να υβριδοποιούνται εκατέρωθεν του τμήματος DNA που θέλουμε να πολλαπλασιάσουμε. Κάθε νέος κλώνος που συντίθεται από τον ένα εκκινητή περιλαμβάνει τη θέση στην οποία υβριδοποιείται ο άλλος εκκινητή.

Οι εκκινητές πρέπει:

- Να έχουν μήκος 18-22 βάσεων. Εάν οι εκκινητές είναι πολύ μικροί μπορεί να υβριδιστούν μη ειδικά και να δώσουν μη επιθυμητά προϊόντα. Αντίθετα, αν οι εκκινητές είναι μεγάλοι σε μήκος, μειώνεται η απόδοση της αντίδρασης καθώς μειώνεται ο ρυθμός με τον οποίο οι εκκινητές υβριδίζονται στη μήτρα (Brown, 2001; Reece, 2004)
- Να είναι συμπληρωματικοί στον κλώνο της μήτρας έτσι ώστε να υβριδιστούν και τα 3' άκρα των υβριδισμένων εκκινητών να είναι αντικρυστά.
- Να αποτελούνται από βάσεις που έχουν περιεκτικότητα σε βάσεις γουανίνης (G) και κυτοσίνης (C) 40-60%.
- Να έχουν παραπλήσιες Tm ώστε να υβριδοποιούνται αποτελεσματικά και οι δύο στην ίδια θερμοκρασία.
- Να μην περιέχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες.
- Να μην έχουν αλληλοεπικάλυψη στο 3' άκρο, η οποία μπορεί να προκαλέσει το φαινόμενο εμφάνισης “διμερών εκκινητών” (primer dimer).

1. Προσθήκη σε σωληνάκι τύπου PCR:

Αντιδραστήρια	Τελική C
DNA	5-40ng
Mg ²⁺	1,5 mM
Primers	0,4-0,6μM
Buffer	1X
dNTPs	0,2 mM (το καθένα)
Taq	1U
H ₂ O	Έως το Vτελ
Τελικός V	20μl

2. Τοποθέτηση της αντίδρασης σε θερμοκυκλοποιητή στο κατάλληλο πρόγραμμα.
3. Ανάλυση των προϊόντων της PCR σε πήκτωμα αγαρόζης.

2.6 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Τα DNA μόρια, οι πρωτεΐνες και πολλές άλλες βιολογικές ενώσεις φέρουν μία ηλεκτρική φόρτιση, στην περίπτωση του DNA αρνητική. Συνεπώς, όταν τα DNA μόρια τοποθετούνται σε ένα ηλεκτρικό πεδίο μετακινούνται προς το θετικό πόλο. Ο ρυθμός μετατόπισης ενός μορίου σε ένα πήκτωμα εξαρτάται από το σχήμα του, το σύνολο του φορτίου του και από το μέγεθος του μορίου. Στα πηκτώματα τα οποία είναι συνήθως αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης ή ένα μείγμα και των δύο, σχηματίζεται ένα σύστημα πόρων μέσω των οποίων τα DNA μόρια πρέπει να ταξιδέψουν ώστε να φτάσουν στο θετικό ηλεκτρόδιο. Όσο μικρότερο είναι το μόριο DNA τόσο πιο γρήγορα μεταναστεύει μέσα στο πήκτωμα. Η σύσταση του πηκτώματος επηρεάζει επίσης το διαχωρισμό των DNA μορίων. Όσο πιο υψηλή η συγκέντρωση τόσο πιο μεγάλη είναι η διαχωριστική ικανότητα του πηκτώματος.

Ο πιο συχνός τρόπος απεικόνισης των μορίων DNA στα πηκτώματα αγαρόζης είναι με τη βοήθεια του Βρωμιούχου Αιθιδίου (EtBr). Το EtBr δεσμεύεται στα DNA μόρια μεταξύ παρακείμενων ζευγών βάσεων δημιουργώντας μερικό ξετύλιγμα της διπλής έλικας. Οι θέσεις των ζωνών του DNA στο πήκτωμα γίνονται ορατές με τη χρήση υπεριώδους ακτινοβολίας που προκαλεί το φθορισμό του δεσμευμένου EtBr (Brown, 2001).

1. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης με ανάμειξη σε μία κωνική φιάλη ρυθμιστικό διάλυμα TBE 0.5X και αγαρόζη ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα της αγαρόζης (π.χ. για 160 ml πηκτώματος 1% γίνεται χρήση 1,6 gr αγαρόζη 160 ml TBE).
2. Θέρμανση του διαλύματος σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη και γίνει διαυγές.
3. Συμπλήρωση, με τη βοήθεια του ζυγού, dH₂O ίσο με τον όγκο που εξατμίστηκε κατά τη θέρμανση εφόσον μειωθεί πρώτα λίγο η θερμοκρασία του διαλύματος
4. Προσθήκη EthBr σε τελική συγκέντρωση 1 µg/ml.

5. Μεταφορά του διαλύματος στη βάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής όπου έχουν τοποθετηθεί και τα χτενάκια.
6. Όταν το διάλυμα πήξει αφαιρείται το χτενάκι και το πήκτωμα μεταφέρεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα TBE αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα.
7. Προετοιμασία των δειγμάτων προς ηλεκτροφόρηση με την προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) που περιέχει μπλε χρωστική.
8. “Φόρτωση” των δειγμάτων στα πηγαδάκια όπως και του μάρτυρα (DNA ladder).
9. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης μπαίνει σε λειτουργία.
10. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία ώστε να γίνει ορατός ο διαχωρισμός των τμημάτων του DNA.

2.7 ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Η ανίχνευση μέσω υβριδοποίησης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων DNA μορίων που περιέχονται είτε σε βακτηριακές αποικίες είτε σε πλάκες βακτηριοφάγων. Χάρη στις καινοτόμες τεχνικές που αναπτύχθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του '70, δεν είναι απαραίτητο να καθαριστεί κάθε ανασυνδυασμένο μόριο. Απεναντίας, χρησιμοποιείται μία μέθοδος *in situ* ανίχνευσης.

Αρχικά, οι αποικίες ή οι πλάκες μεταφέρονται σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης ή νάιλον και μετά επεξεργάζονται ώστε να αφαιρεθούν όλα τα επιμολυντικά μόρια, αφήνοντας μόνο το DNA. Συνήθως, αυτή η επεξεργασία έχει ως αποτέλεσμα και την αποδιάταξη των DNA μορίων, έτσι ώστε οι υδρογονικοί δεσμοί μεταξύ των κλώνων της διπλής έλικας να διασπώνται. Τα μονόκλιωνα μόρια στερεοποιούνται στη μεμβράνη με ψήσιμο στους 80 °C ή με υπεριώδη ακτινοβολία. Τα μόρια δεσμεύονται στη μεμβράνη μέσω του σακχαροφωσφορικού σκελετού, έτσι ώστε οι βάσεις να είναι ελεύθερες να ζευγαρώσουν με συμπληρωματικά μόρια νουκλεϊκού οξέος. Ο ανιχνευτής πρέπει να σημανθεί, αποδιαταχθεί μέσω θέρμανσης και να τοποθετηθεί στη μεμβράνη μέσα σε ένα διάλυμα χημικών που προωθεί την υβριδοποίηση των νουκλεϊκών οξέων. Μετά από μία χρονική περίοδο που επιτρέπει στον υβριδισμό να

λάβει χώρα, το φίλτρο πλένεται για την απομάκρυνση αδέσμευτου ανιχνευτή, στεγνώνεται και οι θέσεις του δεσμευμένου ανιχνευτή εμφανίζονται.

2.7.1 Δημιουργία Ανιχνευτή

Ο ανιχνευτής συνήθως σημαίνονταν με ραδιενεργά νουκλεοτίδια, είτε με μετάφραση εγκοπής είτε με συμπλήρωση υπολειπόμενων 3' άκρων ή εναλλακτικά με τυχαίους εκκινητές, μία τεχνική που έχει ως αποτέλεσμα έναν ανιχνευτή με υψηλότερη δραστικότητα και επομένως ικανά να ανιχνεύσουν μικρότερες ποσότητες δεσμευμένου DNA. Το σήμα με αυτές τις μεθόδους ανιχνεύεται με αυτοραδιογραφία.

Ωστόσο, οι μέθοδοι ραδιενεργής σήμανσης έχουν πλέον αρχίσει να αντικαθίστανται με μη ραδιενεργές μεθόδους. Μία από αυτές είναι η σήμανση με τη μέθοδο της βιοτίνης. Σε αυτή τη μέθοδο γίνεται χρήση των τριφωσφορικών δεοξουριδινών (dUTP) τροποποιημένων μέσω αντίδρασης με βιοτίνη, ένα οργανικό μόριο που έχει υψηλή συγγένεια για την πρωτεΐνη αβιδίνη. Μετά την υβριδοποίηση οι θέσεις του δεσμευμένου βυτινιωμένου ανιχνευτή μπορούν να καθοριστούν μέσω έκπλυσης με αβιδίνη δεσμευμένης με ένα φθορίζοντα δείκτη. Αυτή η μέθοδος είναι τόσο ευαίσθητη όσο και η ανίχνευση με ραδιενεργή σήμανση (Brown, 2001).

1. Πραγματοποίηση PCR με μήτρα το πλασμίδιο στο οποίο έχει κλωνοποιηθεί το επιθυμητό κομμάτι που θα χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία του ανιχνευτή.
2. Ηλεκτροφόρηση και ανάκτηση των επιθυμητών τμημάτων από το πήκτωμα.
3. Προσθήκη DNA (100ng-1μg) και το ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer) 1X σε σωληνάκι τύπου eppendorf. Το ρυθμιστικό διάλυμα περιέχει τους εκκινητές της αντίδρασης οι οποίοι είναι εκφυλισμένα δεκανουκλεοτίδια. Επιπλέον προστίθεται η απαραίτητη ποσότητα dH₂O ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 50 μl.
4. Τοποθέτηση της αντίδρασης σε H₂O που βράζει για 10 min ώστε να αποδιαταχθεί το DNA.
5. Τοποθέτηση στον πάγο για 1 min.
6. Προσθήκη μη ραδιενεργών d(A/G/C)TPs και dTTP σε τελική συγκέντρωση 0,1 mM και 0.065 mM αντίστοιχα, βιτυλιωμένο UTP σε τελική συγκέντρωση 0,035 mM και 1 μl πολυμεράση Klenow σε τελική συγκέντρωση 5 U.

7. Επώαση στους 37 °C για 16 h.
8. Κατακρήμιση και αποθήκευση στους -20 °C.

2.7.2 Δοκιμασία του ανιχνευτή

1. Μετά την κατακρήμιση του ανιχνευτή, γίνεται λήψη μίας μικρής ποσότητας (1 μl) και αραίωση του 1:10 με dH₂O.
2. Τοποθέτηση στο είδος της μεμβράνης που θα χρησιμοποιηθεί στην υβριδοποίηση 1 μl, 3 μl, 6 μl του ανιχνευτή μαζί με 9 μl, 7 μl, 4 μl dH₂O αντίστοιχα ώστε να έχουν τελικό όγκο 10 μl.
3. Έπειτα ακολουθεί η διαδικασία εμφάνισης σήματος.

2.7.3 Μέθοδος SOUTHERN

Το 1975 ο Ed Southern συνδύασε την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα με την υβριδοποίηση, επινοώντας ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση αλληλουχιών, τη διαδικασία του στυπώματος κατά Southern. Κατά τη μέθοδο αυτή, το γονιδιωματικό DNA κόβεται με ένα ή περισσότερα περιοριστικά ένζυμα και τα τμήματα που προκύπτουν διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε HCl ώστε να αποπουρινωθεί, δηλαδή να αφαιρεθούν οι πουρινικές βάσεις από το σακχαρικό σκελετό του DNA. Με αυτό τον τρόπο χαλαρώνουν οι δεσμοί του DNA και αποδιατάσσεται πιο εύκολα και ολοκληρωμένα (Buckingham, 2007). Έστερα, το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε αλκαλικό διάλυμα, ώστε τα μόρια του DNA να αποδιαταχθούν. Στη συνέχεια, τοποθετείται ένα κατάλληλο υπόστρωμα πάνω στο πήκτωμα. Με κατάλληλους χειρισμούς δημιουργείται ροή ενός ρυθμιστικού διαλύματος με κατεύθυνση από το πήκτωμα προς το υπόστρωμα, ώστε το DNA να μεταφερθεί σε αυτό και να προκύψει στην επιφάνεια του ένα αντίγραφο της κατανομής που εμφάνιζαν τα μόρια του DNA στο πήκτωμα. Κατόπιν ακολουθεί ειδική υβριδοποίηση με ανιχνευτή και εμφάνιση του σήματος (Watson, 2007).

Μεταφορά του DNA από το πήκτωμα αγαρόζης σε νάιλον μεμβράνη:

1. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης, τοποθετείται ένας χάρακας κατά μήκος του πηκτώματος και γίνεται λήψη φωτογραφίας κάτω από ακτινοβολία UV.
2. Τοποθέτηση του πηκτώματος σε ένα δοχείο και προσθήκη διαλύματος HCl 0,2 N.
3. Ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min.
4. Έκπλυση του πηκτώματος με dH₂O και προσθήκη διαλύματος αποδιάταξης σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min.
5. Απόρριψη του διαλύματος και επανάληψη των βημάτων 3 και 4.
6. Έκπλυση του πηκτώματος με dH₂O και προσθήκη διαλύματος εξουδετέρωσης. Ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min.
7. Απόρριψη του διαλύματος και επανάληψη των βημάτων 6 και 7.
8. Έκπλυση του πηκτώματος με dH₂O.
9. Προσθήκη διαλύματος SSC 6X. Ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
10. Τοποθέτηση του πηκτώματος σε μία επιφάνεια με τα πηγαδάκια στην κάτω πλευρά της επιφάνειας.
11. Τοποθέτηση μεμβράνης πάνω στο πήκτωμα σε διαστάσεις 0,5x0,5 εκατοστά μικρότερη από ό,τι το πήκτωμα, αφού βραχεί πρώτα σε dH₂O και SSC 6X.
12. Τοποθέτηση, πάνω από τη μεμβράνη, 2 χαρτιών Whatman σε διαστάσεις 1x1 εκατοστά μικρότερα από το πήκτωμα αφού βραχούν σε SSC 6X και ακολουθούν άλλα 2 χαρτιά Whatman στεγνά στις ίδιες διαστάσεις με τα προηγούμενα.
13. Τοποθέτηση, πάνω από τα Whatman, χαρτιών σε διαστάσεις 1,5x1,5 εκατοστά μικρότερα από το πήκτωμα και βάρος ώστε να διευκολυνθεί η μεταφορά.
14. Τοποθέτηση διαλύματος SSC 6X περίγυρα της βάσης του πηκτώματος.
15. Παραμονή της κατασκευής 2 h σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά.
16. Μετά τη μεταφορά σημειώνονται στη μεμβράνη τα πηγαδάκια.

17. Παραμονή της μεμβράνης σε θερμοκρασία δωματίου να στεγνώσει και τοποθετείται στους 80 °C για 2 h ώστε να σταθεροποιηθεί το DNA στη μεμβράνη.

2.7.4 Προϋβριδοποίηση

1. Τοποθέτηση του salmon sperm DNA σε H₂O που βράζει για 10 min ώστε να αποδιαταχθεί. Το ssDNA αποτρέπει τη μη ειδική υβριδοποίηση του ανιχνευτή.
2. Μεταφορά του salmon sperm στον πάγο για 1 min.
3. Τοποθέτηση της μεμβράνης στο σωλήνα υβριδοποίησης με το DNA να βρίσκεται στη εσωτερική πλευρά του σωλήνα.
4. Προσθήκη salmon sperm DNA σε συγκέντρωση 100 µg/1ml διαλύματος, σε διάλυμα προϋβριδοποίησης και προσθήκη του διαλύματος στο σωλήνα υβριδοποίησης.
5. Προϋβριδοποίηση για 2 h με ανάδευση σε θερμοκρασία που κυμαίνεται ανάλογα με την ομολογία ή ετερολογία του ανιχνευτή.

2.7.5 Υβριδοποίηση

1. Τοποθέτηση του κατάλληλου ανιχνευτή σε H₂O που βράζει για 10 min ώστε να αποδιαταχθεί.
2. Τοποθέτηση του ανιχνευτή στον πάγο για 2 min.
3. Προσθήκη του διαλύματος υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή στο σωλήνα υβριδοποίησης.
4. Υβριδοποίηση για 16 h με ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιείται και η προϋβριδοποίηση.

2.7.6 Ανίχνευση σήματος Υβριδοποίησης

1. Συλλογή και φύλαξη του ανιχνευτή στους -20 °C, μετά το πέρας της υβριδοποίησης.
2. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε ένα δοχείο.

3. Προσθήκη διαλύματος πλύσης 1 ώστε να καλυφθεί η μεμβράνη. Ανάδευση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθως απόρριψη του διαλύματος.
4. Επανάληψη του βήματος 3.
5. Προσθήκη διαλύματος πλύσης 2, το οποίο έχει προθερμανθεί στη θερμοκρασία της υβριδοποίησης, ώσπου να καλυφθεί η μεμβράνη. Ανάδευση στη θερμοκρασία υβριδοποίησης για 20 min και ακολούθως απόρριψη του διαλύματος.
6. Επανάληψη του βήματος 5.
7. Προσθήκη διαλύματος A και ανάδευση για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Απόρριψη του διαλύματος. Προσθήκη διαλύματος B και ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
9. Απόρριψη του διαλύματος και προσθήκη διαλύματος B με αντίσωμα (5μl αντίσωμα/ 10ml διαλύματος). Ανάδευση για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Απόρριψη του διαλύματος. Προσθήκη διαλύματος A και ανάδευση για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου.
11. Επανάληψη του βήματος 10.
12. Εξισορρόπηση σε διάλυμα C για 2 min.
13. Απόρριψη του διαλύματος.
14. Κάλυψη της μεμβράνης με διάλυμα C που περιέχει NBT (50 μl NBT / 10ml διαλύματος) και BCIP (37,5 μl BCIP / 10ml διαλύματος).
15. Διατήρηση σε σκοτεινό θάλαμο έως ότου εμφανιστεί το σήμα.

2.8 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ

Το χρωμόσωμα του φάγου λ είναι δίκλωνο κυκλικό DNA με κολλώδη άκρα και έχει ραβδόμορφη μορφή όταν βρίσκεται έξω από το κύτταρο ξενιστή. Αμέσως μετά τη μόλυνση του βακτηρίου, από το φάγο λ, το ραβδόμορφο χρωμόσωμα μετατρέπεται σε κυκλικό και μια λιγάση επουλώνει τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Ο φάγος λ, όπως είναι γνωστό, μπορεί μετά την είσοδο του στο κύτταρο ξενιστή να ακολουθήσει: τη λυσιγονική κατάσταση ή τον λυτικό κύκλο. Στη λυσιγονική κατάσταση, το γένωμα του προφάγου εισέρχεται στο βακτηριακό

χρωμόσωμα ως ανενεργός προφάγος (σε καταστολή). Στη λυτική κατάσταση, είναι ενεργά (σε επαγωγή) τα απαραίτητα γονίδια του φάγου για την ωρίμανση του και τη λύση του ξενιστή.

Τα κανονικά στελέχη του ιού λ έχουν πέντε θέσεις διάσπασης EcoRI, ενώ τα τροποποιημένα έχουν μόνο δύο θέσεις διάσπασης για το ίδιο ένζυμο. Μπορούν να ενσωματώσουν DNA μέχρι 16 kb. Σε άλλα τροποποιημένα στελέχη υπάρχουν δύο θέσεις διάσπασης για άλλα περιοριστικά ένζυμα. Ανάμεσα στις δύο αυτές θέσεις υπάρχει ένα τμήμα από 25 kb του γενόματος του λ το οποίο δεν είναι απαραίτητο για τον πολλαπλασιασμό του και αντικαθίσταται από το ξένο DNA που πρόκειται να κλωνοποιηθεί (Τριανταφυλλίδης, 2004).

2.8.1 Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε φορέα βακτηριοφάγο λ (screening)

Επίστρωση βακτηριοφάγων λ σε τρυβλίο.

1. Δημιουργία τρυβλίων NZY άγαρ και διάλυμα top άγαρ.
2. Δημιουργία διάφορων αραιώσεων της φαγικής βιβλιοθήκης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} και 10^{-6} .
3. Επιλογή των αραιώσεων 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} και 10^{-6} για την επίστρωση τρυβλίων.
4. Προσθήκη 200 μl κύτταρα MRA και 2 μl από την αραιώση σε σωληνάκια τύπου erpendorf.
5. Επώαση στους 37 °C υπό ανάδευση για 20 min.
6. Προθέρμανση του NZY top άγαρ και αμέσως μετά τοποθέτηση του σε αποστειρωμένους σωλήνες, 3 ml στον καθένα, στο υδατόλουτρο στους 48-50 °C.
7. Μεταφορά των κυττάρων από τα σωληνάκια τύπου erpendorf στους σωλήνες ανάδευση και επίστρωση στο τρυβλίο υπό ασηπτικές συνθήκες.
8. Επώαση στους 37 °C για 12 h.

2.8.2 Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

1. Παρασκευή διαδοχικών αραιώσεων των τάξεων 10^{-1} - 10^{-7} της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε διάλυμα SM ώστε να χρησιμοποιηθούν στην τιτλοδότηση.
2. Ανάμειξη μίας μικρής ποσότητας των αραιώσεων αυτών (2-3μl) με βακτήρια ξενιστές του στελέχους XL1 Blue MRA (200μl) από καλλιέργεια που έχει αναπτυχθεί έτσι ώστε να έχει OD 0,4-0,6 σε σωληνάκια και επώαση σε θερμοκρασία 37° C για 20 min.
3. Επίστρωση σε τρυβλία NZY άγαρ όπως περιγράφεται παραπάνω.

ο προσδιορισμός του τίτλου γίνεται σύμφωνα με τη σχέση:

(αριθμός πλακών rfu x συντελεστής αραιώσης) / (όγκος που επιστρώθηκε μl x 1000 μl/ ml).

2.8.3 Μεταφορά των φαγικών πλακών σε μεμβράνη, υβριδοποίηση, εμφάνιση και διαλογή

1. Επιλογή των τρυβλίων που έχουν κατάλληλο μέγεθος και απόσταση μεταξύ τους για τη μεταφορά των φαγικών πλακών σε μεμβράνη.
2. Αποθήκευση στο ψυγείο για τουλάχιστον 2 h ώστε να μην επικολλάται το NZY top άγαρ στη μεμβράνη και χάνονται οι πλάκες που πιθανόν να δώσουν σήμα κατά την εμφάνιση.
3. Τοποθέτηση σε μία επιφάνεια 3 ml διαλύματος αποδιάταξης και 3 ml διαλύματος εξουδετέρωσης.
4. Τοποθέτηση της μεμβράνης στο τρυβλίο για 2 min κατά τα οποία γράφονται στη μεμβράνη στοιχεία αναγνώρισης του τρυβλίου και με μία βελόνα γίνονται χαρακτηριστικές οπές στη μεμβράνη και στο τρυβλίο ώστε να είναι δυνατός ο προσανατολισμός της μεμβράνης πάνω στο τρυβλίο όταν θα γίνει η απομόνωση της πλάκας. Εάν γίνει μεταφορά και σε δεύτερη μεμβράνη από το ίδιο τρυβλίο, η μεμβράνη παραμένει στο τρυβλίο για 4 min.
5. Τοποθέτηση της μεμβράνης ανάποδα σε διάλυμα αποδιάταξης (το DNA προς τα πάνω) για 2 min.

6. Τοποθέτηση της μεμβράνης ανάποδα σε διάλυμα εξουδετέρωσης (το DNA προς τα πάνω) για 5 min.
7. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε διάλυμα επαναφοράς pH το ανώτερο έως 30 sec.
8. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε χαρτί και αφού στεγνώσει, ψήσιμο στους 80 °C για 2 h ώστε να στερεοποιηθεί το DNA.
9. Εμφάνιση του σήματος.
10. Μετά την εμφάνιση του σήματος, απομόνωση των πλακών που έδωσαν σήμα με τη βοήθεια μιας γυάλινης πιπέτας Pasteur και τοποθέτηση σε ένα σωληνάκι τύπου erpendorf.
11. Προσθήκη, στα σωληνάκια erpendorf, 200 µl SM buffer στο οποίο διαχέονται οι φάγοι και φύλαξη στους 4 °C.

Στη δευτερεύουσα διαλογή η χρήση της βιβλιοθήκης αντικαθίσταται από τη χρήση των φάγων που απομονώθηκαν από το NZY άγαρ.

2.8.4 Απομόνωση φαγικού DNA

(Το πρωτόκολλο αποτελεί τροποποίηση της μεθόδου του Yamamoto et al., (1970), όπως αυτό περιγράφεται στο βιβλίο “Molecular Cloning, A laboratory manual” (Sambrook et al., 1989).

1. Αρχικά πραγματοποιείται επώαση μίας καλλιέργειας βακτηριακών κυττάρων MRA, για 12-16 h.
2. Λήψη 40 µl από το σωληνάκι τύπου erpendorf που περιέχει τη φαγική πλάκα και προσθήκη 500 µl MRA.
3. Επώαση υπό ανακίνηση για 20 min στους 37 °C και προθέρμανση του υγρού θρεπτικού υλικού στους 37 °C.
4. Προσθήκη 20 ml θρεπτικού υλικού, 200 µl MgSO₄ 1M, 300 µl MRA σε κωνική φιάλη.
5. Επώαση για 6 έως 7 h στις 220 στροφές, στους 37 °C.
6. Προσθήκη 100 µl χλωροφόρμιο και φυγοκέντρηση σε αποστειρωμένο falcon στις 8000 g για 10 min.
7. Λήψη του υπερκειμένου και μεταφορά του σε νέο falcon.

8. Προσθήκη DNAάσης και RNAάσης A με τελικές συγκεντρώσεις 1 µg/ml για 30 min στους 37 °C.
9. Προσθήκη NaCl σε τελική συγκέντρωση 1 M. Το NaCl προάγει το διαχωρισμό των φαγικών σωματιδίων από τα βακτηριακά υπολείμματα.
10. Ισχυρή ανακίνηση και διατήρηση στον πάγο για 12-16 h.
11. Φυγοκέντρηση στις 11000 g για 10 min.
12. Λήψη του υπερκειμένου σε καινούργια falcon.
13. Προσθήκη πολυαιθυλενικής γλυκόλης (PEG) σε τελική συγκέντρωση 10%. Η PEG προκαλεί τη κατακρήμνιση των φαγικών σωματιδίων.
14. Διατήρηση στο ψυγείο για τουλάχιστον 2 h.
15. Φυγοκέντρηση για 10 min στις 1100 g στους 4 °C.
16. Απόρριψη του υπερκειμένου και στέγνωμα.
17. Προσθήκη 1 ml SM buffer.
18. Ήπια ανάδευση για 30 min.
19. Προσθήκη 1 ml χλωροφόρμιο. Ισχυρή ανακίνηση και φυγοκέντρηση στις 3000 g για 15 min.
20. Μεταφορά του αιωρήματος των βακτηριοφάγων σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf.
21. Προσθήκη EDTA σε τελική συγκέντρωση 20 mM, SDS σε τελική συγκέντρωση 0,5% και Πρωτεΐνάση K σε τελική συγκέντρωση 50 µg/ml.
22. Επώαση για 1 h στους 56 °C και αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο.
23. Κατακρήμνιση του φαγικού DNA και αναδιάλυση του ιζήματος σε δ/μα Tris-EDTA που περιέχει RNAάση σε συγκέντρωση 20 µg/ml.
24. Αποθήκευση στους 4 °C.

2.9. ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Αρχικά, τα αλληλουχημένα τμήματα DNA επεξεργάζονται με το ηλεκτρονικό πρόγραμμα OMIGA. Στη συνέχεια με τη βοήθεια του διαδικτυακού προγράμματος BLAST του NCBI γίνεται σύγκριση των αλληλουχιών αυτών με αλληλουχίες που υπάρχουν κατατεθειμένες στις βάσεις δεδομένων. Με αυτόν τον τρόπο επιβεβαιώνεται η κλωνοποίηση επιθυμητού τμήματος DNA ή εκτιμάται η

σημαντικότητα της ομοιότητας του τμήματος με αλληλουχία άλλου οργανισμού. Η σύγκριση αυτή δύναται να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των οργανισμών.

ΥΛΙΚΑ**ΣΤΕΛΕΧΗ *E. coli***

DH5α : supE44 ΔlacU169(φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 rel A1.

XL1-Blue MRA: Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac

ΦΟΡΕΙΣ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗΣ

pBluescript II SK(+): πολυσυνδέτης (653-760 bp)

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA:

Διάλυμα ομοιογενοποίησης: 100 mM NaCl 1M, 200 mM σουκρόζη, 100 mM Tris (pH 7.4), 20 mM EDTA, 0,5% SDS.

Διάλυμα επαναδιάλυσης TE-RNase:

TE: 1 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

TE-RNase: 20 μg RNase σε 1 ml TE.

ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5X TBE (1 L): 54 g Tris-base, 27,5 g Βορικό οξύ, 20 ml EDTA 0,5 M (pH 8.0).

ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA

Solution I (GET): 50 mM glucose, 25 mM Tris Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0).

Solution II (άλκαλι λύσης): 0.2 N NaOH (το δ/μα φτιάχνεται εκείνη τη στιγμή από stock 10 N), 1% SDS.

Solution III: 5 M potassium acetate (CH₃COOK) 60 ml, glacial acetic acid (CH₃COOH) 11,5 ml, dH₂O 28,5 ml.

ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Διάλυμα Αποδιάταξης: 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl.

Διάλυμα Εξουδετέρωσης: 0,5 M Tris-HCl (pH 7.5), 1,5 M NaCl.

Διάλυμα 20X SSC: 0,3 M Κιτρικό νάτριο (pH 7), 3 M NaCl

Διάλυμα Υβριδοποίησης: 6X SSC, 5X Denhardt's, 0,5% SDS.

Διάλυμα Denhardt's 50X: 5 g Ficoll, 5 g polyvinylpyrrolidone, 5 g BSA (Fraction V) dH₂O σε τελικό όγκο 500 ml.

Διάλυμα πλύσης A: 2X SSC, 0,1% SDS.

Διάλυμα πλύσης B: 0,2X SSC, 0,1% SDS.

Διάλυμα A: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl.

Διάλυμα B: Διάλυμα A, 1% Διάλυμα Blocking.

Διάλυμα Blocking (10%): Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη 10 gr ανά 100 ml Διάλυματος A.

Διάλυμα C: 100 mM Tris-HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂.

Διάλυμα επαναφοράς pH: 0,2 M Tris-HCl (pH 7.5), 2X SSC.

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ:

LB Broth (1 L): 10 g NaCl, 10 g Tryptone, 5 g εκχύλισμα ζύμης. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

SOC (1 L): 20 g bacto-tryptone, 5 g Bacto-yeast extract, 0,5 g NaCl, 20 ml glucose 1M. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

LB-agar (1 L): 10 g Tryptone, 15 g εκχύλισμα ζύμης, 15 g άγαρ, 5 g NaCl (pH 7). Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ Λ:

NZY Agar (1 L): 5 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 5 g εκχύλισμα ζύμης, 10 g NZ αμίνη, 15 g άγαρ, (pH 7.5). Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

SM buffer (1 L): 5,8 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 50 ml Tris Cl 1M (pH 7.5), 5 ml ζελατίνη 2%. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

NZY Top Agar (1 L): 5 g NaCl, 2 g MgSO₄·7H₂O, 5 g εκχύλισμα ζύμης, 10 g NZ αμίνη, 0,7% (w/v) αγαρόζη. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για την επίτευξη της κλωνοποίησης τμημάτων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του *Bactrocera oleae*, που αποτελεί και το σκοπό της παρούσης εργασίας, ήταν απαραίτητη η δημιουργία ανιχνευτών που στη συνέχεια θα χρησιμοποιούνταν για τη διαλογή φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης δάκου. Οι ανιχνευτές δημιουργήθηκαν με τη χρήση ενισχυμένων αλληλουχιών από γονιδιωματικό DNA των εντόμων *Drosophila melanogaster* και *Bactrocera oleae*.

3. Ενίσχυση εξονίων των γονιδίων του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης

Αρχικά, σχεδιάστηκαν εκκινητές με τη βοήθεια δημοσιευμένων αλληλουχιών της *Drosophila melanogaster* και με τη χρήση του προγράμματος OMIGA με σκοπό την ενίσχυση και κλωνοποίηση των γονιδίων του νικοτινικού υποδοχέα του *Bactrocera oleae*. Η ονομασία του κάθε εκκινητή συντελείται από το γράμμα D που συμβολίζει το έντομο *Drosophila melanogaster*, τα a, b και τους αριθμούς που αντιπροσωπεύουν τις υπομονάδες για την ενίσχυση των οποίων σχεδιάστηκαν, τους αριθμούς που ακολουθούν το Ex και συμβολίζουν ποιο εξόνιο της υπομονάδας της *D. melanogaster* χρησιμοποιήθηκε και τα F και R που αντιπροσωπεύουν την κατεύθυνση τους, Forward (εμπρόσθιος) και Reverse (οπίσθιος) αντίστοιχα.

Έπειτα, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση με τα ζευγάρια των εκκινητών που παρατίθενται στον πίνακα 3 με μήτρα γονιδιωματικό DNA από *Drosophila melanogaster* και *Bactrocera oleae*. Η ενίσχυση αυτή πραγματοποιείται ώστε να δημιουργηθούν τμήματα γονιδιωματικού DNA που αντιστοιχούν σε περιοχές του νικοτινικού υποδοχέα και να χρησιμοποιηθούν αργότερα ως ανιχνευτές για την απευθείας διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

Οι αντιδράσεις PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, στο οποίο διαπιστώθηκε η ενίσχυση όλων των αναμενόμενων προϊόντων των αντιδράσεων που είχαν ως μήτρα DNA από τη *Drosophila melanogaster*. Αντίθετα, στην περίπτωση των αντιδράσεων που είχαν ως μήτρα DNA από το *Bactrocera oleae* δεν παρατηρήθηκε ενίσχυση όλων των σχεδιασμένων εξονίων των υπομονάδων παρά μόνο του εξονίου της υπομονάδας a7.

Όνομασία εκκινητή	Αλληλουχία εκκινητή	Θερμοκρασία Ta	Αναμενόμενο προϊόν
Da1-Ex7F	GACTCGGACAACATCGAGG	55° C	304 bp
Da1-Ex7R	AGGAGGAAGAACACGGTAAGC	59° C	
Da2-Ex5F	TTGCTCTGTGCATCAGCATCC	59° C	464 bp
Da2-Ex5R	CGAGTTCATTTGCATCTCGTCC	61° C	
Da3-Ex9F	TGCAAACCTACAACCTGATGG	57° C	354 bp
Da3-Ex9R	GAGAAATTCGCCGAGCAGC	55° C	
Da4-Ex5F	TGACTCTTGCAACTAAAGC	49° C	152 bp
Da4-Ex5R	GGCAGTTGGACTTATGATG	53° C	
Da5-Ex4F	GAATCTCCGCTGGAACACC	55° C	256 bp
Da5-Ex4R	AACTGCCGAAC TTCATCTCG	55° C	
Da7-Ex7F	CTATAATTGCTGCCCAGAACC	57° C	135 bp
Da7-Ex7R	CAGTGTA AACCTAGCAGTGC	59° C	
Db1-Ex6F	AAGATTCTGCCACCAACGTGC	59° C	512 bp
Db1-Ex6R	ATCCTCGTTCCGCAAGTGC	55° C	
Db2-Ex5F	GTA ACTCTGATGACGAAAGC	53° C	154 bp
Db2-Ex5R	CATTGTAGGTCCATGAACC	51° C	
Db3-Ex2F	ATGTCAAGGCCCTGGATCG	55° C	141 bp
Db3-Ex2R	TTGCCGTTCAACTCGTGC	51° C	

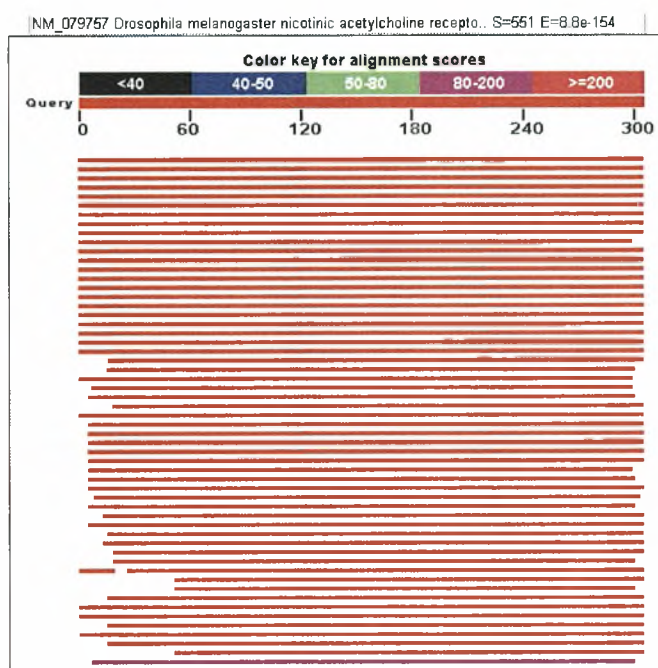
Πίνακας 3: Οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν για την ενίσχυση, οι αλληλουχίες τους, η θερμοκρασία υβριδοποίησης και το μέγεθος του αναμενόμενου προϊόντος.

Τα επιθυμητά προϊόντα ανακτήθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και εισήχθησαν σε φορέα pBluescriptII με άκρα θυμίνης εφόσον η Taq πολυμεράση αφήνει στα προϊόντα της πολυαδενυλικές ουρές. Ακολούθησε μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση και επιλογή των κατάλληλων αποικιών με τη μέθοδο blue/white selection όπου το χρώμα των αποικιών υποδεικνύει τα μετασχηματισμένα κύτταρα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε απομόνωση πλασμιδιακού DNA και ακολούθησε πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *PvuII*. Το περιοριστικό ένζυμο *PvuII* πέπτει το φορέα ένθεσης pBluescriptII στις θέσεις 427 και 927, ενώ ολόκληρο το μέγεθος του φορέα είναι περίπου 3000 bp. Αναμένεται, λοιπόν στην ηλεκτροφόρηση τα πλασμίδια στα οποία έχει εισαχθεί το ένθεμα να εμφανίζουν δύο τμήματα, τα οποία θα αντιστοιχούν στο φορέα και το ένθεμα, εάν βέβαια δεν υπάρχει επιπλέον θέση *PvuII* στο ένθεμα. Μάλιστα, το μέγεθος του ενθέματος σε κάθε περίπτωση θα περιέχει επιπλέον 500 bp του φορέα λόγω της πέψης με *PvuII*, ενώ το μέγεθος του φορέα θα αντιστοιχεί σε 2.500 bp. Σύμφωνα με αυτά, η ηλεκτροφόρηση της πέψης του πλασμιδιακού DNA που πραγματοποιήθηκε εμφάνισε τις επιθυμητές ζώνες,

δηλαδή του ενθέματος και του φορέα, για τα δείγματα A1DM3, A2DM2, A3DM3, A5DM1, A7BO1, A7DM1, B1DM2, B3DM2, στα οποία και πραγματοποιήθηκε στη συνέχεια ανάλυση της πρωτοδιάταξής τους.

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των δειγμάτων και η ακόλουθη νουκλεοτιδική τους σύγκριση στο πρόγραμμα blast του διαδικτυακού τόπου NCBI κατέδειξε ότι η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής σε όλα τα δείγματα A1DM3, A2DM2, A3DM3, A5DM1, A7BO1, A7DM1, B1DM2, B3DM2 (εικόνα 12).



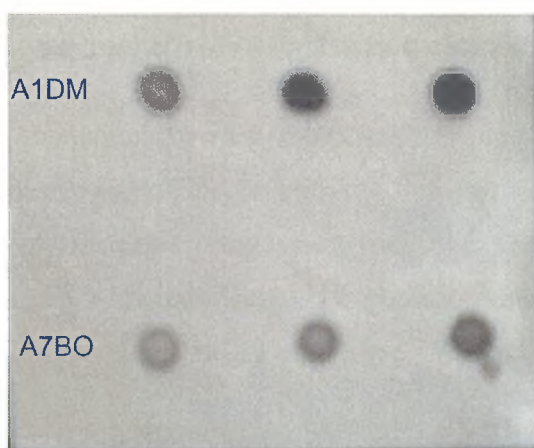
Εικόνα 12: Νουκλεοτιδική σύγκριση με το πρόγραμμα blast του δείγματος A1DM3. Το αποτέλεσμα έδειξε 100% ομοιότητα με την υπομονάδα α1 του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster*.

3.1 Διαλογή της φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Παρόλο που η κλωνοποίηση ήταν επιτυχής για όλα τα δείγματα τα οποία εστάλησαν για αλληλούχιση, επιλέχθηκαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία ανιχνευτή το πλασμίδιο A1DM3 με ένθεμα το εξόνιο 7 της υπομονάδας α1 της *Drosophila melanogaster*, και το πλασμίδιο A7BO1 με ένθεμα το δυνητικό εξόνιο 7 της υπομονάδας α7 του *Bactrocera oleae*.

Ως μήτρα για τη σήμανση του ανιχνευτή χρησιμοποιήθηκε το ένθεμα των πλασμιδίων, αφού προηγήθηκε ενίσχυση τους. Η σήμανση πραγματοποιήθηκε με τη δημιουργία αλυσίδων στις οποίες αντί για δεοξυθυμιδίνες ενσωματώθηκαν

βιτυλιωμένες ουριδίνες. Με αυτόν τον τρόπο οι αλυσίδες που δημιουργήθηκαν φέρουν ένα μόριο βιοτίνης επικολημένο στα μόρια της ουριδίνης που ενσωματώθηκαν. Η ανίχνευση του σήματος, με αυτόν τον ανιχνευτή, βασίζεται στην ικανότητα της ισχυρής σύνδεσης ανάμεσα στη βιοτίνη και τη στρεπταβιδίνη. Η στρεπταβιδίνη, που προστίθεται είναι συνδεδεμένη με αλκαλική φωσφατάση, η οποία, με τη σειρά της, καταλύει μια αντίδραση δημιουργίας χρώματος με το X-phosphate και το NBT. Μετά τη δημιουργία του ανιχνευτή πραγματοποιήθηκε εμφάνιση σήματος για τον έλεγχο του, που κατέδειξε ότι ήταν επιτυχής η παρασκευή και επέτρεψε τη χρήση τους για τη μετέπειτα διαλογή (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Το σποτάρισμα των ανιχνευτών (probes) που αντιστοιχούν στο εξόνιο 7 της υπομονάδας α1 της *Drosophila melanogaster* και στο δυνητικό εξόνιο 7 της υπομονάδας α7 του *Bactrocera oleae*.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε τιτλοδότηση ώστε να επιστρωθεί ο κατάλληλος αριθμός ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων. Η απευθείας διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου πραγματοποιήθηκε περίπου σε 80.000 πλάκες ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων λ. Δεδομένης της εκτίμησης του μεγέθους του γονιδιώματος του δάκου [που έχει υπολογιστεί $5,4 \times 10^8$ bp (Gomulski et al., 1997)], του μέσου μεγέθους του ενθέματος του βακτηριοφάγου λ (~20kb) και της σχέσης $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$, υπολογίζεται ότι η διαλογή 80.000 φαγικών κλώνων θα επέτρεπε την απομόνωση ενός γονιδίου μονού αντιγράφου με πιθανότητα 99%.

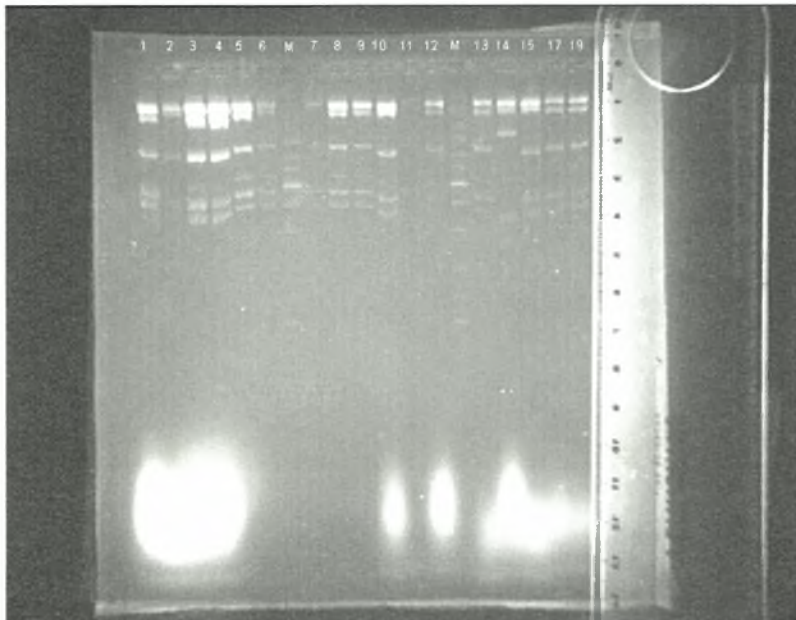
Η διαλογή έγινε σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 55 °C λόγω του ότι ο ένας ανιχνευτής, ο A1DM3 ήταν ετερόλογος. Η εμφάνιση παρουσίασε σήμανση 19 πλακών στη μεμβράνη με τον ετερόλογο ανιχνευτή και σήμανση 5 πλακών με τον ομόλογο ανιχνευτή. Επειδή κατά την πρώτη διαλογή υπάρχει η περίπτωση να ελήφθησαν παραπάνω από ένας κλώνοι, ακολούθησε δεύτερη διαλογή στις ήδη

απομονωμένες πλάκες, στις ίδιες συνθήκες, ώστε να απομονωθεί ένας μεμονωμένος κλώνος.

Τελικά, επιτεύχθηκε η απομόνωση 17 βακτηριοφάγων των A1.1, A1.2, A1.3, A1.4, A1.5, A1.6, A1.7, A1.8, A1.9, A1.10, A1.11, A1.12, A1.13, A1.14, A1.15, A1.17, A1.19 όσον αφορά τη διαλογή με τον ετερόλογο ανιχνευτή. Αντίθετα, ο ομόλογος ανιχνευτής BOA7 δεν έδωσε θετικό σήμα, γεγονός που σημαίνει ότι τα σήματα στην αρχική διαλογή ήταν ψευδώς θετικά. Επομένως, ακολούθησε ανάλυση των απομονωμένων φαγικών κλώνων μόνο για αυτούς που απομονώθηκαν με τον ετερόλογο ανιχνευτή.

3.2 Ανάλυση των απομονωμένων φαγικών κλώνων

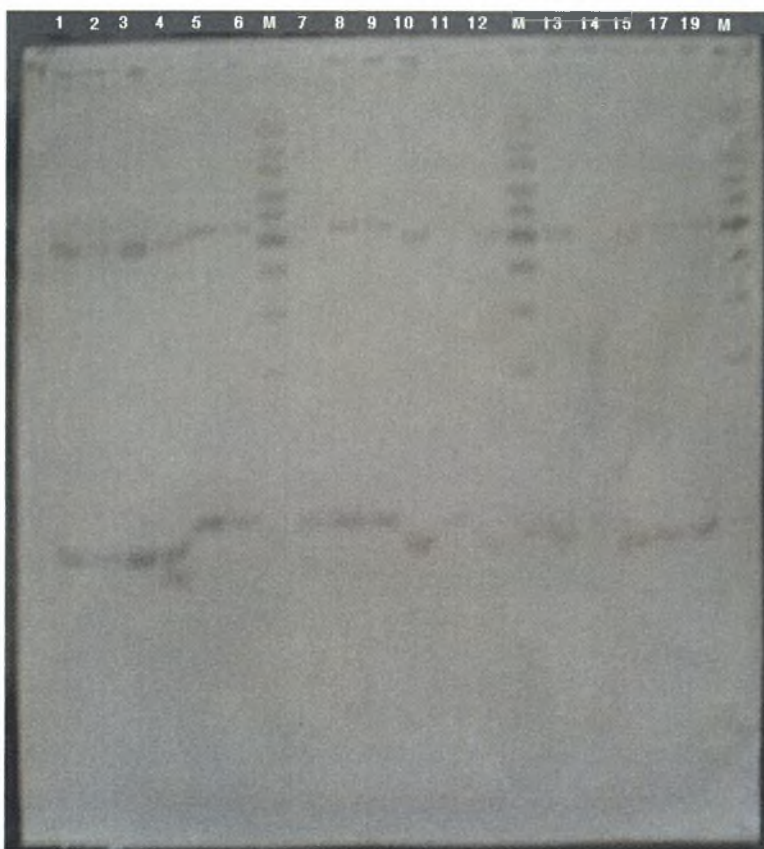
Η διαλογή οδήγησε στην απομόνωση, όπως αναφέρθηκε, 17 βακτηριοφαγικών κλώνων. Για τη διεξαγωγή της δομικής ανάλυσης των φαγικών αυτών κλώνων, πραγματοποιήθηκε απομόνωση του DNA τους, πέψη με το ένζυμο *HindIII* και στη συνέχεια ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση των τμημάτων σε πήκτωμα αγαρόζης 1% έδειξε ότι οι 15 από τους 17 εμφανίζουν το ίδιο προφίλ (Εικόνα 14).



Εικόνα 14: Απεικόνιση της ηλεκτροφόρησης της πέψης του φαγικού DNA με ακτινοβολία UV. Σειρά φόρτωσης των φάγων που έχουν υποστεί πέψη: 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, μάρτυρας, 1.7, 1.8, 1.9, 1.10, 1.11, 1.12, μάρτυρας, 1.13, 1.14, 1.15, 1.17, 1.19, μάρτυρας. Το μηδέν του χάρακα ξεκινάει από το ύψος των πηγαδιών ώστε να μπορεί να μετρηθεί η αντίστοιχη ζώνωση που θα δώσει σήμα στη μεμβράνη κατά την εμφάνιση.

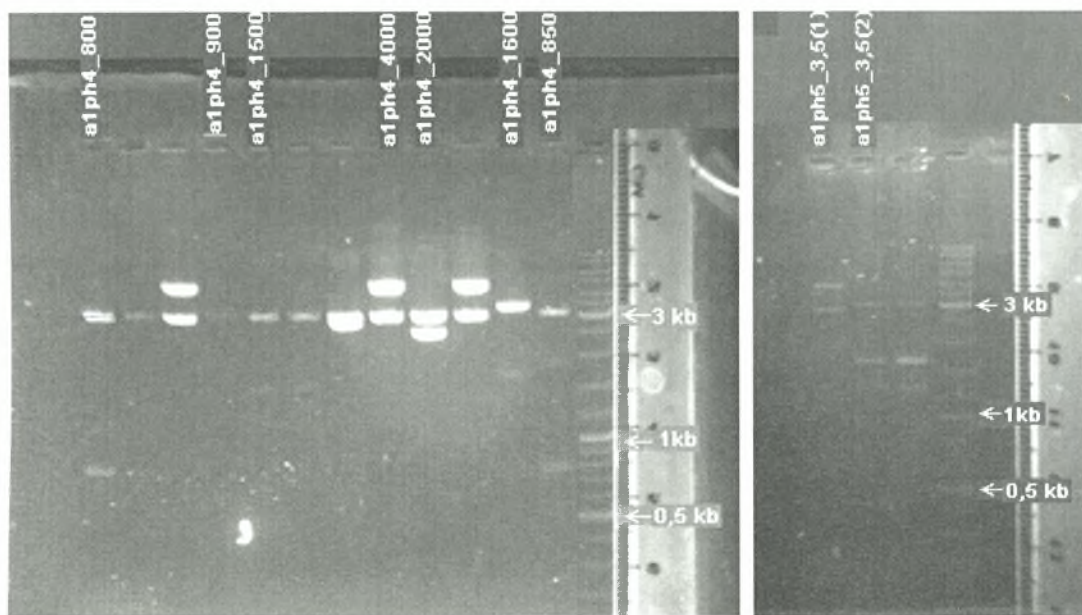
Στη συνέχεια, με σκοπό την επιβεβαίωση του γεγονότος ότι οι κλώνοι περιέχουν ένθεμα το οποίο αντιστοιχεί σε νικοτινικό υποδοχέα του δάκου πραγματοποιήθηκε ανάλυση κατά Southern σε θερμοκρασία υβριδοποίησης 55 °C με ανιχνευτή τον ετερόλογο A1DM3, με τον οποίο είχε πραγματοποιηθεί η αρχική διαλογή.

Η εμφάνιση του σήματος στην ανάλυση κατά Southern (εικόνα 15) έδειξε ότι από τους 17 βακτηριοφάγους που απομονώθηκαν οι 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19 ήταν ίδιοι μεταξύ τους, ενώ διαφοροποιείται ο φάγος 4. Ακόμη, ο βακτηριοφάγος 14 δεν έδωσε καθόλου σήμα με αποτέλεσμα να θεωρηθεί ότι δεν περιέχει ένθεμα που να αντιστοιχεί σε υπομονάδα του νικοτινικού υποδοχέα. Από αυτούς τους κλώνους έγινε επιλογή των κλώνων 4, 5 για νουκλεοτιδική ανάλυση.



Εικόνα 15: Εμφάνιση του σήματος στη μεμβράνη έπειτα από τη μέθοδο Southern. Στην εικόνα απεικονίζονται 17 βακτηριοφάγοι. Ωστόσο, οι 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 19 είναι ίδιοι μεταξύ τους, ενώ διαφοροποιείται ο βακτηριοφάγος 4. Ο βακτηριοφάγος 14 δεν έδωσε καθόλου σήμα.

Προκειμένου να δημιουργηθούν υποκλώνοι των φάγων 4 και 5, πραγματοποιήθηκε επανάληψη της πέψης με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III και ακολούθησε κλωνοποίηση των τμημάτων που προέκυψαν σε φορέα pBluescriptII με άκρα *Hind*III. Από την πέψη του κλώνου 4 επιλέχθηκαν όλα τα τμήματα για κλωνοποίηση ενώ από την πέψη του κλώνου 5 επιλέχθηκε το τμήμα των 3,5 kb. Αφού προηγήθηκε μετασχηματισμός και απομόνωση των πλασμιδίων, η πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III κατέδειξε τα πλασμίδια που περιείχαν τα επιθυμητά τμήματα (δηλαδή φορέα στις 3000 bp και ένθεμα) (εικόνα 16) και εστάλησαν για ανάλυση της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας, τα πλασμίδια α1ph4_800, α1ph4_850, α1ph4_900, α1ph4_1500, α1ph4_1600, α1ph4_2000, α1ph4_4000, α1ph4_850, α1ph5_3,5(1) και α1ph5_3,5(2). Οι ονομασίες των πλασμιδίων συντελούνται από το α1 που συμβολίζει την α1 υπομονάδα, το rh4 ή rh5 που συμβολίζει το φάγο από τον οποίο απομονώθηκε το ένθεμα και έναν ακόμη αριθμό που συμβολίζει το μέγεθος του ενθέματος.



Εικόνα 16: Πέψη των πλασμιδίων pBluescriptII με το περιοριστικό ένζυμο *Hind*III. Επιλέχθηκαν να αλληλουχηθούν οι φάγοι οι οποίοι εμφανίζουν μία ζώνη στις 3 kb που είναι το τμήμα του φορέα και ακόμη μία ζώνη που αποτελεί το ένθεμα. Οι συγκεκριμένοι φάγοι κατονομάζονται άνωθεν των πηγαδιών.

Οι αλληλουχίες των υποκλώνων που αποκτήθηκαν, επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα OMIGA και διερευνήθηκαν σε επίπεδο ομοιότητας με αλληλουχίες άλλων οργανισμών στο πρόγραμμα BLAST του διαδικτυακού τόπου NCBI.

Τα αποτελέσματα της νουκλεοτιδικής σύγκρισης έδειξαν ότι από τις αλληλουχίες που αναλύθηκε η πρωτοδιάταξη τους κάποιες αντιστοιχούσαν μόνο σε φορέα, κάποιες αντιστοιχούσαν σε ένθεμα το οποίο δεν παρουσίαζε ιδιαίτερη ομοιότητα με κατατεθειμένες αλληλουχίες και κάποιες από αυτές περιείχαν ένθεμα που παρουσίαζε ομοιότητα με κατατεθειμένες αλληλουχίες του εντόμου *Drosophila melanogaster*. Συγκεκριμένα, τα πλασμίδια α1ph4_1500, α1ph5_3,5(1) και α1ph5_3,5(2) δεν περιείχαν ένθεμα αλλά αποτελούσαν μόνο φορέα, ενώ τα πλασμίδια α1ph4_2000 και α1ph4_4000 περιείχαν ένθεμα το οποίο, όμως, δεν εμφάνιζε σημαντική ομοιότητα με κατατεθειμένες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων. Το γεγονός αυτό, υποδεικνύει ότι τα ενθέματα που περιέχονται σε αυτά τα πλασμίδια μπορεί να είναι ιντρόνια των υπομονάδων του νικοτινικού υποδοχέα. Τέλος, τα πλασμίδια α1ph4_850, α1ph4_800, α1ph4_900, α1ph4_1600 περιείχαν ενθέματα τα οποία έδειξαν σημαντική ομοιότητα με αλληλουχίες του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster* και άλλων εντόμων.

Τα πλασμίδια α1ph4_850, α1ph4_800 εμπεριέχουν το ίδιο ένθεμα μεταξύ τους, το οποίο αντιστοιχεί σε αλληλουχία του δυνητικού ιντρονίου 6, σε αλληλουχία του δυνητικού εξονίου 7 και αλληλουχία του δυνητικού ιντρονίου 7 της α1 υπομονάδας του nAChR του δάκου. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης, με το πρόγραμμα CLUSTALW του ενθέματος του πλασμιδίου α1ph4_800 με το εξόνιο 7 της α1 υπομονάδας του nAChR της *Drosophila melanogaster* που παρατίθεται στην εικόνα 17, οι βάσεις από 1 έως 279 του ενθέματος του πλασμιδίου αντιστοιχούν στο τέλος της αλληλουχίας του δυνητικού ιντρονίου 6 με δέκτη AG. Ακόμη, οι βάσεις από 280 έως 740 του ενθέματος αποτελούν την αλληλουχία του δυνητικού εξονίου 7, ενώ, οι βάσεις από 741 έως 776 αποτελούν την αρχή της αλληλουχίας του δυνητικού ιντρονίου 7 με δότη GT. Η νουκλεοτιδική σύγκριση του δυνητικού εξονίου 7 του δάκου στο πρόγραμμα blast έδειξε 80% ομοιότητα με το εξόνιο 7 της α1 υπομονάδας της *D. melanogaster* (εικόνα 18).

Το πλασμιδίο α1ph4_900 εμπεριέχει αλληλουχία του δυνητικού ιντρονίου 7, την αλληλουχία του δυνητικού εξονίου 8 και αλληλουχία του δυνητικού ιντρονίου 8 της α1 υπομονάδας του nAChR του δάκου. Σύμφωνα με το αποτέλεσμα της ομοπαράθεσης, με το πρόγραμμα CLUSTALW, του ενθέματος του πλασμιδίου α1ph4_900 με το εξόνιο 8 της α1 υπομονάδας του nAChR της *Drosophila melanogaster* που παρατίθεται στην εικόνα 19, οι βάσεις από 1 έως 70 του ενθέματος του πλασμιδίου αντιστοιχούν στο τέλος της αλληλουχίας του δυνητικού ιντρονίου 7 με δέκτη AG. Ακόμη, οι βάσεις από 71 έως 285 αποτελούν την αλληλουχία του δυνητικού εξονίου 8, ενώ οι βάσεις από 286 έως 941 αποτελούν την αρχή της αλληλουχίας του δυνητικού ιντρονίου 8 με δότη GT. Το αποτέλεσμα της σύγκρισης του δυνητικού εξονίου 8 του δάκου στο πρόγραμμα blast έδειξε 76% ομοιότητα με το εξόνιο 8 της α1 υπομονάδας της *D. melanogaster* (εικόνα 20).

CLUSTAL 2.0.12 multiple sequence alignment

alph4_900 alexon8DM	AAATTCGATATCAAGCTTAGCAAAAAGTAAATTTGTATTGCTAATATTTCTGCACTTTC 60	alph4_900 alexon8DM	GTGTTTTAACATTACTTTTAACTATGCAATTTAAAATTTACAAAATTTGCTCTATATCTAA 540
alph4_900 alexon8DM	TCTCGTGCCTTTTATAGATCGCCTGTGACACATAAAATGGCCGATGGTACAGCGITTA 120	alph4_900 alexon8DM	AACTAGGCTACTAAGATACTAGAAAAGATGCCAATAACTTTGTGGAAGTATATCTTTTTT 600
alph4_900 alexon8DM	TTTATACAAATTTTACCTAAACTCCTTTGTCATCGAACGACCGAAGAAAACGAAAGCCAA 180	alph4_900 alexon8DM	TTTTTAAAGCGGATCAATTTGTACTCTGTCATCCCTTAAAGTTTAAACAGAACTACTCTTA 660
alph4_900 alexon8DM	GAGGACGATCAACCGCCGAAGTGTCTTACCGATGCTTCCATTGGCCACCGGATCTGGAT 240	alph4_900 alexon8DM	TACGTAGGTTGCCATTTATATTTTCAGGATTTGGCAACCGGAGTGTGCAATCTGGCCACT 720
alph4_900 alexon8DM	AAATTCGTGAATTCAGGATTCGAAACGATTTAGTGGGACTATGGTATACAGGTAAGTTC 300	alph4_900 alexon8DM	CACAACITTTATTTGTTAAGTTTAAAGTTTTTGTATGCTGACATCTCAGAAAGTTTTGACA 780
alph4_900 alexon8DM	TTAAGAGCACATCTTGAAAATCTAATCTCACTCAAATGAAAATCTGTAAATAAGTATTC 360	alph4_900 alexon8DM	TACGAGCCCTATTCGTGTGCTTACAGTAACTTAAAATATTCATCTCGGCCAAAAGTGG 840
alph4_900 alexon8DM	ATTTTTTATCAATGAAAATAAGTFACTATTAGTATGAACTTTGCGGGAAAAAAGTGATTA 420	alph4_900 alexon8DM	AATGAAATTCGAACAAATTCGGCATTTATTTTGTACAAAGTGGATTAATCTCAGCAGCAA 900
alph4_900 alexon8DM	TTCTGAAAGTGGCTAGCCACATATTTGAAATATAATAACAGATTTGGATTTGTGTGCTTACT 480	alph4_900 alexon8DM	AGCATCGATGAACTTAAITAAAATTTTGGCGATGAAAGCTTA 941

Εικόνα 19: Αποτέλεσμα ομοπαράθεσης των αλληλουχιών του πλασμιδίου α1ph4_900 και του εξονίου 8 της υπομονάδας α1 της *Drosophila melanogaster* με το πρόγραμμα CLUSTAL W. Με κίτρινο χρώμα αναδεικνύονται οι δυνητικές αλληλουχίες των ιντρονίων, ενώ, ενδιαμέσως βρίσκεται το δυνητικό εξόνιο 8.

GENE ID: 42918 nAcrAlpha-96Aa | nicotinic Acetylcholine Receptor alpha 96Aa
[Drosophila melanogaster] (Over 10 PubMed links)

Score = 150 bits (166), Expect = 2e-39
Identities = 165/217 (76%), Gaps = 3/217 (1%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1      TGGTATACCATAGTCGGCCACTAAATCGTTTCGAATCGTAAATTCACGAAATTTATCCACATC 60
           ||| || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 2452   TGGAAATGCCGTAGTTCGCCGCTGAAACCGCTTCGAATCGTATGTTGACAAACTTGTCCACATC 2398

Query 61     CGGTGGCAAATGGHAG&CATCGGTAA&C&CTTCGGGCGGTTGATCGTCCCTCGTGGCTTC 120
           ||| ||| || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 2392   CGGCGGCGAGTGTATAGACATCGGTGAG&C&CTTCGGGCGGCTGGTCCCTCCTCG--GSC-TC 2326

Query 121    GTTTTTCCTTCGGTTCGTTCGATGCA&AG&ASTTAG&TAA&ATTT&TATA&ATA&AG&CTG 180
           | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 2325   CTCCCTCTTGGGCGGCTCGATG&AG&C&G&CTTGG&C&G&ATCTGG&T&AA&AG&G&G&CTG 2276

Query 181    TACCCATGGCGCCATTTTATGTGTCAC&G&G&ATCTA 217
           ||| || | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
Sbjct 2275   C&CC&C&G&G&T&G&C&AT&G&C&AT&G&C&T&G&C&G&G&ATCTA 2239
    
```

Εικόνα 20: Νουκλεοτιδική σύγκριση του δυνητικού εξονίου 8 του *Bactrocera oleae* στο blast, έδειξε 76% ομοιότητα με το εξόνιο 8 της Da1 (a1 υπομονάδα της *Drosophila melanogaster*).

Τέλος, το πλασμίδιο α1rh4_1600 εμπεριέχει ως ένθεμα μία αλληλουχία η οποία φαίνεται να είναι ένα μικρότερο τμήμα της αλληλουχίας του ενθέματος το οποίο εμπεριέχεται στα πλασμίδια α1rh4_850 και α1rh4_800 και έχει ομοιότητα με το εξόνιο 7 της υπομονάδας α1 του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster*.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Το spinosad είναι ένα σχετικά νέο εντομοκτόνο που προέκυψε από το βακτήριο *Saccharopolyspora spinosa* και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο μεγάλου εύρους εντόμων. Επομένως, λόγω του εύρους χρήσης, αλλά και όπως συμβαίνει για κάθε νέο εντομοκτόνο, εξυπακούεται ότι εγείρονται πολλές ερωτήσεις. Πόσο γρήγορα αναπτύσσεται η ανθεκτικότητα και ως ποιο βαθμό; Πόσα γονίδια εμπλέκονται; Τα γονίδια που προκαλούν την ανθεκτικότητα είναι επικρατή ή υπολειπόμενα; Ακόμη, υπάρχει διασταυρούμενη ανθεκτικότητα;

Σύμφωνα με μελέτες, ο πρωταρχικός στόχος του spinosad είναι ο νικοτινικός υποδοχέας της ακετυλοχολίνης, με δεύτερο στόχο τον υποδοχέα GABA. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι η απάλειψη της υπομονάδας Da6 έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός στελέχους της *Drosophila melanogaster* το οποίο είναι ανθεκτικό στο spinosad. Ωστόσο, δεν είναι υπαίτια για την ανθεκτικότητα στο spinosad η Da6 υπομονάδα σε όλους τους οργανισμούς. Στη *Musca domestica* η ανθεκτικότητα στο spinosad φαίνεται ότι οφείλεται σε υπολειπόμενο παράγοντα αλλά όχι στη Mda6 υπομονάδα (Gao, 2007)

Η θεωρία προβλέπει ότι ο αριθμός των γονιδίων που επιλέγονται και προκαλούν ανθεκτικότητα εξαρτάται από το εάν η επιλογή δρα εντός ή εκτός της φαινοτυπικής διασποράς του μη ανθεκτικού πληθυσμού. Μελέτες στόχων εντομοκτόνων οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι απλές αντικαταστάσεις σε μοναδικά γονίδια μπορούν να προκαλέσουν ανθεκτικότητα και πανομοιότυπες αντικαταστάσεις προκύπτουν σε ένα μεγάλο εύρος εντόμων. Η ταυτότητα της μεταλλαγής της θέσης-στόχου μπορεί να εξηγηθεί από την αναγκαιότητα διατήρησης των λειτουργιών αγρίου τύπου των ανθεκτικών στόχων και επομένως ένας μικρός μόνο αριθμός αντικαταστάσεων αμινοξέων μπορεί να γίνει ανεκτός σε σημαντικούς υποδοχείς και ένζυμα (Ffrench-Constant, 2004).

Στη παρούσα μελέτη, έγινε προσπάθεια κλωνοποίησης του γονιδίου της υπομονάδας α1 του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του εντόμου *Bactrocera oleae*. Ενισχύθηκαν αλληλουχίες του αντίστοιχου νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster* με ειδικούς εκκινητές, κλωνοποιήθηκαν και ταυτοποιήθηκαν με αλληλούχιση. Κατόπιν, οι αλληλουχίες αυτές σημάνθηκαν ώστε να χρησιμοποιηθούν ως ετερόλογοι ανιχνευτές για τη διαλογή γονοδιαμορφωτικής

βιβλιοθήκης του δάκου. Οι αλληλουχίες που έδιναν σήμα με τους ανιχνευτές εντοπίστηκαν με τη μέθοδο southern, κλωνοποιήθηκαν και εστάλησαν για αλληλούχιση.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης της πρωτοδιάταξης των δειγμάτων ήταν αλληλουχίες οι οποίες έπειτα από ομοπαράθεση έδειξαν υψηλή ομοιότητα με αλληλουχίες του νικοτινικού υποδοχέα της *Drosophila melanogaster*. Τα πλασμίδια α1ph4_850 και α1ph4_800 εμπεριέχουν αλληλουχίες του δυνητικού ιντρονίου 6, του δυνητικού εξονίου 7 και του δυνητικού ιντρονίου 7 της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου. Η σύγκριση με το πρόγραμμα blast του δυνητικού εξονίου 7 με το αντίστοιχο εξόνιο της *Drosophila melanogaster* έδειξε ομολογία 80% (εικόνα 18). Το πλασμίδιο α1ph4_900 εμπεριέχει αλληλουχίες του δυνητικού ιντρονίου 7, του δυνητικού εξονίου 8 και του δυνητικού ιντρονίου 8 της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα του δάκου. Η νουκλεοτιδική σύγκριση, επίσης, με το πρόγραμμα blast του δυνητικού εξονίου 8 με το αντίστοιχο εξόνιο της *Drosophila melanogaster* έδειξε ομολογία 76% (εικόνα 20).

Ως γνωστόν, τα εξόνια είναι αλληλουχίες που αντιπροσωπεύονται στο ώριμο mRNA και μεταφράζονται δημιουργώντας πρωτεϊνικά μόρια, απαραίτητα για τη δομή και τις λειτουργίες του κυττάρου. Εν προκειμένω, τα δυνητικά εξόνια 7 και 8 παρουσιάζουν παρόμοιο μέγεθος με τα αντίστοιχα της *D. melanogaster*. Το δυνητικό εξόνιο 7 του δάκου και το εξόνιο 7 της *D. melanogaster* αποτελούνται και τα δύο από 461 bp, ενώ το δυνητικό εξόνιο 8 του δάκου αποτελείται από 215 bp και το εξόνιο 8 της *D. melanogaster* από 217bp. Από τα παραπάνω και σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα των ομοπαράθεσεων τους, αναδεικνύεται η υψηλή εξελικτική συντήρησή τους. Το γεγονός ότι τα εξόνια 7 και 8 εμφανίζουν τόσο μεγάλη συντήρηση μεταξύ των δύο ειδών (*Drosophila melanogaster*, *Bactrocera oleae*), αντικατοπτρίζει το νευραλγικό ρόλο των εξονίων αυτών για τη λειτουργία του νικοτινικού υποδοχέα.

Όσον αφορά στα ιντρόνια, είναι γνωστό ότι αποτελούν αλληλουχίες που παρεμβάλλονται μεταξύ των εξονίων αλλά αποκόπτονται κατά τη μετατροπή του pre-mRNA σε mRNA με τη διαδικασία του ματίσματος. Κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία, τα ιντρόνια αποκόπτονται σε συντηρημένες, αν και κάπως μικρές σε μήκος, πρότυπες αλληλουχίες. Οι θέσεις ματίσματος, από τα αριστερά προς τα δεξιά κατά μήκος του ιντρονίου, ονομάζονται 5' θέση ματίσματος ή αλλιώς θέση-δότης και 3' θέση ματίσματος ή αλλιώς θέση-δέκτης και περιλαμβάνουν τις συντηρημένες

αλληλουχίες GU-AG αντίστοιχα (κανόνας GT-AG). Στην παρούσα μελέτη, τα αποτελέσματα της αλληλούχισης έδειξαν ότι τα δυνητικά ιντρόνια 6, 7 και 8 που κλωνοποιήθηκαν υπόκεινται στον παραπάνω κανόνα. Στο δυνητικό ιντρόνιο 6, το 3' άκρο το οποίο κλωνοποιήθηκε, έχει θέση-δέκτη AG (εικόνα 17), ενώ στο δυνητικό ιντρόνιο 7, το 5' άκρο έχει θέση-δότη GT και το 3' άκρο έχει θέση-δέκτη AG (εικόνες 17 και 19 αντίστοιχα). Επίσης, στο δυνητικό ιντρόνιο 8, κλωνοποιήθηκε το 5' άκρο το οποίο έχει θέση-δέκτη AG (εικόνα 19).

Όπως προαναφέρθηκε, στο ιντρόνιο 7, έχει κλωνοποιηθεί η αλληλουχία του 5' άκρου και του 3' άκρου. Αν οι δυο αλληλουχίες συνενωθούν, προκύπτει αλληλουχία μήκους 105 bp, η οποία μάλιστα δεν εμφανίζει αλληλεπικάλυψη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι το μέγεθος του ιντρονίου είναι μεγαλύτερο από 105 bp και δεν έχει κλωνοποιηθεί ολόκληρο. Βάσει των προαναφερθέντων και δεδομένου ότι το ιντρόνιο 7 της *Drosophila melanogaster* αποτελείται από 75 bp, προκύπτει ότι το δυνητικό ιντρόνιο 7 του *B. oleae* είναι μεγαλύτερο σε μήκος από αυτό της *D. melanogaster*. Το αποτέλεσμα αυτό συνάδει με προηγούμενα ευρήματα, σύμφωνα με τα οποία τα ιντρόνια του γενετικού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου είναι μεγαλύτερα σε μέγεθος από αυτά του γενετικού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης της *D. melanogaster* (Κακάνη, διδακτορική διατριβή 2009). Τέλος, πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι σε πολλά σπονδυλωτά και ασπόνδυλα είδη το μέγεθος και ο αριθμός των ιντρονίων συμβαδίζει με το μέγεθος του γονιδιώματος (Vinogradov, 1999), φαινόμενο που επαληθεύεται και στην παρούσα σύγκριση μεταξύ των εντόμων *B. oleae* και *D. melanogaster*.

Στη συνέχεια, οι αλληλουχίες του δάκου που απομονώθηκαν, μπορούν να ενισχυθούν και να σημανθούν ώστε να χρησιμοποιηθούν ως ανιχνευτές σε μία νέα διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Με αυτό τον τρόπο μπορούν σταδιακά να απομονωθούν οι φάγοι οι οποίοι εμπεριέχουν αλληλεπικαλυπτόμενες αλληλουχίες με αυτές που ήδη απομονώθηκαν. Η διεξαγωγή πολλών διαλογών μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση και αλληλούχιση όλων των αλληλουχιών που συντελούν στο γονιδιακό τόπο της α1 υπομονάδας του νικοτινικού υποδοχέα της ακετυλοχολίνης του *Bactrocera oleae*. Ακόμη, η ίδια διαδικασία μπορεί να εφαρμοστεί από την αρχή και για τις υπόλοιπες υπομονάδες που εμπλέκονται στη συγκρότηση του νικοτινικού υποδοχέα. Η εύρεση όλων αυτών των γονιδιακών τόπων είναι μεγάλης σημασίας διότι αφενός μεν δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες για το γονιδίωμα του δάκου, αφετέρου δε η γνώση αυτών θα δώσει τη δυνατότητα για τη διεξαγωγή μίας μοριακής

και γενετικής ανάλυσης, η οποία θα επιτρέψει τη δημιουργία ενός μοριακού test για τη διεξαγωγή ελέγχου της ανθεκτικότητας στο spinosad στους φυσικούς πληθυσμούς. Το συγκεκριμένο μοριακό test θα μπορεί να ανιχνεύει τις ποικιλομορφίες των εντόμων ή τις μεταλλάξεις που προκύπτουν και προσδίδουν ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο spinosad. Μία έγκαιρη ανίχνευση της αύξησης του πληθυσμού των ανθεκτικών εντόμων είναι απαραίτητη για την απόσυρση του εντομοκτόνου από την αγορά για ένα εύλογο χρονικό διάστημα, ώστε τα ποσοστά των ευαίσθητων ατόμων να επανέλθουν σε φυσιολογικά επίπεδα. Με αυτό τον τρόπο προστατεύεται τόσο η γενετική ποικιλομορφία του δάκου όσο και η καλλιέργεια της ελιάς που έχει μεγάλη οικονομική, και όχι μόνο, σημασία. Ταυτόχρονα, διαφυλλάσσεται η αποτελεσματικότητα του spinosad, καθώς περιορίζεται η ανάπτυξη ανθεκτικών σε αυτό στελεχών και καθίσταται δυνατή η μετέπειτα επανακυκλοφορία του.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bass C, Lansdell SJ, Millar NS, Schroeder I, Turberg A, Field LM, Williamson MS (2006) Molecular characterisation of nicotinic acetylcholine receptor subunits from the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Insect Biochem Mol Biol* 36:86–96.
- Brawerman G, Mendecki J, Lee SY. A procedure for the isolation of mammalian messenger ribonucleic acid. *Biochemistry*. 1972 Feb 15;11(4):637–641.
- Breer, H., and D. B. Sattelle, 1987 Molecular properties and functions of insect acetylcholine receptors. *J. Insect Physiol.* 33: 771–790.
- Bret B.L., Larson L.L., Schoonover J.R., Sparks T.C., Thompson G.D., Biological properties of spinosad, *Down to Earth* Vol.52. No1, 1997).
- Broumas T, Haniotakis G, Liaropoulo C, et al. 2002. The efficacy of an improved form of the mass-trapping method, for the control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin)(Dipt., Tephritidae): Pilotscale feasibility studies. *J Applied Entomol* 126:217–23.
- Brown T.A., *Gene Cloning And DNA Analysis- An Introduction*, 4rth edition, Blackwell Science, 2001.
- Buckingham L., Flaws M.L., *Molecular Diagnostics: fundamentals, methods and clinical applications*, F.A. Davis publications, 2007.
- Callec J.J., 1974, Synaptic transmission in the central nervous system of insects. In *Insect Neurobiology* (Ed. by Treherne J. E.), pp. 119-185. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- Clausen C.P., 1978. *Introduced Parasitoids and Predators of Arthropod Pests and Weeds: A World Review*. US Department of Agriculture Handbook 480. Washington, DC.
- Collier T.R., Van Steenwyk R.A., Prospects for integrated control of olive fruit fly are promising in California, *California Agriculture* , Vol.57, No 1, January-March 2003.
- Corringer P.J., Le Novère N., Changeux J.P., 2000, Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:431–458.
- Engel A.G., Ohno K., Sine S.M., 2003, Congenital myasthenic syndromes: Progress over the past decade. *Muscle Nerve* 27:4–25.

- Ferguson J.S., 2004, Development and stability of insecticide resistance in the leafminer *Liriomyza trifolii* (Diptera: Agromyzidae) to cyromazine, abamectin, and spinosad. *J. Econ. Entomol.* 97: 112-119.
- Fleming J.T., Squire M.D., Barnes T.M., Tomoe C., Matsuda K. et al., 1997 *Caenorhabditis elegans* levamisole resistance genes *lev-1*, *unc-29*, and *unc-38* encode functional nicotinic acetylcholine receptor subunits. *J. Neurosci.* 17: 5843-5857.
- Ffrench-Constant R. H., Daborn P.J., Le Goff G., The genetics and genomics of insecticide resistance, 2004, *Trends in Genetics*, Vol. 20, No 3.
- Fournier, D. et al., 1989, *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase gene. Structure, evolution and mutations. *J. Mol. Biol.* 210: 15-22.
- Gao J.R., Deacutis J.M., Scott J.G., 2007, The nicotinic acetylcholine receptor subunit M α 6 from *Musca domestica* is diversified via post-transcriptional modification, *Insect Molecular Biology*, 16: 325-334.
- Gehle V.M., Walcott E.C., Nishizaki T., Sumikawa K., 1997, Nglycosylation at the conserved sites ensures the expression of properly folded functional ACh receptors. *Brain Res Mol Brain Res* 45:219–229.
- Gomulski L.M, Torti C., Malacrida A.R., Gasperi G., 1997, Ccmar1, a full – length mariner element from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, *Insect Mol Biol* 6: 241-253.
- Grauso M., Reenan R.A., Culetto E., Sattelle D.B., 2002, Novel Putative Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunit Genes, Da5, Da6 and Da7, in *Drosophila melanogaster* Identify a New and Highly Conserved Target of Adenosine Deaminase Acting on RNA-Mediated A-to-I Pre-mRNA Editing. *Genetics* 160:1519–1533.
- Gundelfinger E.D., and Hess N., 1992, Nicotinic acetylcholine receptor of the central nervous system of *Drosophila*. *Biochim.Biophys. Acta* 1137: 299–308.
- Hale K.A., and Portwood D.E., 1996, The aerobic soil metabolism of spinosad -a novel natural insect control agent. *J Environ Sci. Health B31:477±484.*
- Hemingway J., 2000, The molecular basis of two contrasting metabolic mechanisms of insecticide resistance, *Insect Biochem Mol Biol* 30: 1009-1015.

- Hoopengardner B., Bhalla T., Staber C., Reenan R., 2003, Nervous system targets of RNA editing identified by comparative genomics. *Science* 301:832–836).
- Imoto K., Busch C., Sakmann B., Mishina M., Konno T., Nakai J., Bujo H., Mori Y., Fukuda K., and Numan S., 1988, Rings of negatively charged amino acids determine the acetylcholine receptor channel conductance. *Nature (Lond.)*. 335:645-648.
- Itier V., Bertrand D., 2002, Mutations of the neuronal nicotinic acetylcholine receptors and their association with ADNFLE. *Neurophysiol Clin* 32:99–107.
- Jones A.K., Grauso M., Sattelle D.B., 2005b, The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* 85:176–187.
- Jones A.K., Marshall J., Blake A.D., Buckingham S.D., Darlison M.G., Sattelle D.B., 2005c, Sgbeta1, a novel locust (*Schistocerca gregaria*) non-alpha nicotinic acetylcholine receptor like subunit with homology to the *Drosophila melanogaster* Dbeta1 subunit. *Invert Neurosci* 5:147–155.
- Jones A.K., Raymond-Delpech V., Thany S.H., Gauthier M., Sattelle D.B., 2006, The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Res* 16:1422–1430.
- Ju-Chun Hsu, Hai-Tung Feng, 2006, Development of Resistance in Oriental Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) in Laboratory Selection and Cross-Resistance, *J. Econ.Entom.* 99(3):931-936.
- Kakani EG, Mathiopoulos KD, 2008, Mechanisms of insecticide resistance *Bio Τεύχος* No 29.
- Kao PN, Karlin A., 1986, Acetylcholine receptor binding site contains a disulfide cross-link between adjacent half-cystinyl residues. *J Biol Chem* 261:8085–8088.
- Karlin A., And Akabas M.H., 1995, Toward a structural basis for the function of nicotinic acetylcholine receptors and their cousins. *Neuron* 15:1231-1244.
- Karlin A., 2002, Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3:102-114.

- Kerkut G. A., Pitman R. M. and Walker R. J. (1969), Iontophoretic application of acetylcholine and GABA onto insect central neurons. *Camp. Biochem. Physiol.* 31, 611-633.
- Kirst H.A., Michel K.H., Mynderse J.S., Chao E.H., Yao R.C., Nakatsukasa W.M., Boeck L.D., Occlowitz J., Paschel J.W., Deeter J.B., and Thompson G.D., Discovery, isolation and structure elucidation of a family of structurally unique fermentation-derived tetracyclic macrolides, in “Synthesis and Chemistry of Agrochemicals III” (D. R. Baker, J. G. Fenyes, and J. J. Steffens, Eds.), pp. 214–225, Am. Chem. Soc., Washington, DC, 1992.
- Lagos D., Ruiz M.F., Sacher L., Komitopoulou K., 2005, Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster*, *Gene* 348:111-121.
- Lansdell SJ, Millar NS. 2000. Cloning and heterologous expression of Dalpha4, a *Drosophila* neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit: identification of an alternative exon influencing the efficiency of subunit assembly. *Neuropharmacology* 39:2604–2614.
- Lansdell SJ, Millar NS, 2002, Dbeta3, an atypical nicotinic acetylcholine receptor subunit from *Drosophila*: molecular cloning, heterologous expression and coassembly. *J Neurochem* 80:1009–1018.
- Lee D., and O’Dowd D.K., 1999, Fast excitatory synaptic transmission mediated by nicotinic acetylcholine receptors in *Drosophila* neurons. *J. Neurosci.* 19: 5311–5321.
- Lester, H.A., Dibas. M.I., Dahan, D.S., Leite, J.F. and Dougherty, D.A, 2004, Cys-loop receptors: new twists and turns. *Trends Neurosciences* 127:329-336.
- Liu, M. Y., and J. E. Casida, 1993 High affinity binding of [3H]-Imidacloprid in the insect acetylcholine receptor. *Pestic. Biochem. Physiol.* 46: 40–46.
- Liu Z, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han Z, Millar NS, 2005, A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *Proc Natl Acad Sci USA*, 102:8420–8425.
- Lund AE, Narahashi T. 1982. Dose-dependent interaction of the pyrethroid isomers with sodium channels of squid membranes. *Neurotoxicology* 3:11–24.

- Matsuda K, Buckingham SD, Kleier D, Rauh JJ, Grauso M, Sattelle DB, 2001, Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinoid acetylcholine receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 22:573-580.
- Matsuda, K., S. D. Buckingham, J. C. Freeman, M. D. Squire, H. A. Baylis *et al.*, 1998, Effects of the α subunit on Imidacloprid sensitivity of recombinant nicotinic acetylcholine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 123: 518–524.
- McGehee , D.S., and L.W. Role, 1996 Presynaptic ionotropic receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6:342-349.
- Miyazaki N., Ohyama K., Dunlap D. Y., Matsumara F., 1996, Cloning and sequencing of the para-type sodium channel gene from susceptible and *kdr* resistant German cockroaches (*Blatella germanica*) and the house fly (*Musca domestica*), *Mol. Gen. Genet* 252: 61-68.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin 1999, Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution : transverse tunnel in the channel wall, *J Mol Biol* 288:765-786.
- Montiel Bueno A., Gones O., Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals, IOBC wprs Bulletin Vol.25, 2002.
- Namba T, Nolte CT, Jackrel J, Grob D: Poisoning due to organophosphate insecticides. Acute and chronic manifestations. *Am J Med* 1971, 50:475–492.
- Narahashi T. 1996. Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol* 78:1–14.
- Navajas M, Thistlewood H., Lagnel J., Marshall D., Tsagkarakou A., Pasteur N. 2001. Field releases of the predatory mite *Neoseiulus fallacis* (Acari: Phytoseiidae) in Canada monitored by pyrethrinoid resistance and allozyme markers. *Biological control*, 20: 191-198.
- Neuenschwander,P., Beneficial insects caught by yellow traps used in mass trapping of the olive fly, *Dacus oleae*. *Ent. Exp. &Appl.* 32, 286-296, 1982.
- Nishizaki T, 2003, N-glycosylation sites on the nicotinic ACh receptor subunits regulate receptor channel desensitization and conductance. *Brain Res Mol Brain Res* 114:172–176.
- Newcomb RD, Campbell PM, Ollis DL, Cheah E, Russell RJ, Oakeshott JG., 1997, A single amino acid substitution converts a carboxylesterase to an

- organophosphorus hydrolase and confers insecticide resistance on a blowfly, Proc. Natl. Acad Sci 94: 7464-7468.
- Perry Trent, McKenzie J. A., Batterham Philip, A D6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad, Insect Biochemistry and Molecular Biology 37:184-188, 2007).
 - Raymond-Delpech V., Matsuda K., Sattelle B.M., Rauh J.J., Sattelle D. B., Ion channels: molecular targets of neuroactive insecticides, Invert Neurosci, 2005, 5: 119-133.
 - Reece R.J., Analysis of Genes and Genomes, WILEY, 2004.
 - Reigart JR, Roberts JR, Organophosphate Insecticides. eds. Recognition and Management of Pesticide Poisonings (Fifth Edition), 1999:34-48.
 - Richmond, J. E., and E. M. Jorgensen, 1999 One GABA and two acetylcholine receptors function at the *C. elegans* neuromuscular junction. Nat. Neurosci. 2: 791-797.
 - Salgado V.L., The modes of action of Spinosad and other insect control products. Down to Earth Vol.52. No1, 35-43, 1997.
 - Salgado V.L., Studies on the Mode of Action of Spinosad: Insect Symptoms and Physiological Correlates, Pestic. Biochem. Physiol. 60, 91-102, 1998.
 - Sattelle D.B., Jones A.K., Sattelle B.M., Matsuda K., Reenan R., Biggin P.C., 2005, Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. Bioessays 27:366-376.
 - Scott G.J., Unraveling the mystery of spinosad resistance in insects, 2008, J. Pestic. Sci., 33(3). 221-227.
 - Sayyed, A.H., Omar D., and Wright D.J., 2004, Genetics of spinosad resistance in a multi-resistant field-selected population of *Plutella xylostella*. Pest Manag. Sci. 60: 827-832.
 - Schoonover J.R. and Larson L.L., 1995, Laboratory activity of spinosad on non-target beneficial arthropods, 1994. Arthrop Manag Tests 20:357.
 - Seeburg P.H., 2002, A-to-I editing: new and old sites, functions and speculations. Neuron 35:17-20.
 - Shono T., and Scott J.G., 2003, Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due to a recessive factor on autosome 1. Pestic. Biochem. Physiol. 75: 1-7.

- Sine S.M., and Engel A.G., 2006, Recent advances in Cys-loop receptor structure and function. *Nature*. 440:448–455.
- Sparks T.C., Thompson G.D., Kirst H.A., Hertlein M.B., Mynderse J.S., Turner J.R. and Worden T.V., Fermentation derived insect control agents-The spinosyns in *Biopesticides Use and Delivery* eds by Hall F and Menn JJ, Humana, Totowa, NJ, USA, pp171±188 (1999).
- Soderlund D.M., Bloomquist J.R., 1989, Neurotoxic actions of pyrethroid insecticides. *Annu Rev Entomol* 34:77±96.
- Sterile Insect Technique, Principles and Practice in Area-Wide Pest Management, Springer editions, 2005.
- Stetefeld J., Ruegg M.A., 2005, Structural and functional diversity generated by alternative mRNA splicing. *Trends Biochem Sci* 30:515–521.
- Stryer Lubert, Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, 5^η έκδοση, 2005.
- Swope, S.L., S.J. Moss, L.A. Raymond and R.L. Huganir, 1999, Regulation of ligand-gated ion channels by protein phosphorylation. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 3:49-78.
- Thompson G.D., Michel K.H., Yao R.C., Mynderse J.S., Mosburg C.T., Worden T.V., Chio E.H., Sparks T.C., and Hutchins S.H., 1997, The discovery of *Saccharopolyspora spinosa* and a new class of insect control products *Down to Earth* Vol.52. No1.
- Tzanakakis 1989, Small scale rearing. In: Robinson AS, Hooper G. (eds) *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Amsterdam: Elsevier, p105-118.
- Unwin N., Acetylcholin receptor channel imaged in the open state, *Nature*, 1995, 373:37-43.
- Unwin, N., 1996 Projection structure of the nicotinic acetylcholine receptor: distinct conformations of the alpha subunits. *J. Mol. Biol.*257: 586-596.
- Vinogradov A.E, 1999, Intron-Genome Size Relationship on a Large Evolutionary Scale, *J. Mol. Evol* 49:376-384.

- Wang W., Mo, J., Cheng, J., Zhuzng, P., Tang, Z., 2006. Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pestic Biochem. Physiol.* 84, 180-187.
- Watson James D., Caudy Amy A., Myers Richard M., Witkowski Jan A., Ανασυνδυασμένο DNA-Γονίδια και Γονιδιώματα-Μία Συνοπτική Παρουσίαση, 1^η Ελληνική Έκδοση, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις, 2007.
- Wharton RA, Gilstrap FE. 1983. Key to and status of opiine braconid (Hymenoptera) parasitoids used in biological control of *Ceratitis* and *Dacus* s. l. (Diptera:Tephritidae). *Annals Entomol Soc Am* 76:721-42.
- Young H.P., Bailey W.D., and Roe R.M., 2003, Spinosad selection of a laboratory strain of the tobacco budworm, *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae), and characterization of resistance. *Crop Prot.* 22: 265-273.
- Zhao, J.-Z., Y. X. Li, H. L. Collins, L. Gusukuma-Mínuto, R.F.L. Mau, G. D. Thompson, and A. M. Shelton. 2002. Monitoring and characterization of diamondback moth resistance to spinosad. *J. Econ. Entomol.* 95: 430-436.
- Θέριος Ι. Ν., Ελαιοκομία, Εκδόσεις Γαρταγάνη, 2005.
- Κακάνη Ε.Γ., 2009, Μοριακή ανάλυση γονιδιακών τόπων που εμπλέκονται στο μηχανισμό ανάπτυξης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα του σημαντικότερου παρασίτου της ελιάς, του εντόμου *Bactrocera oleae*.
- Μπρούμας Θ. και Κατσόγιαννος Π., 2001, εχθροί της ελιάς, αφιέρωμα Ελαιοκομία, 2002, Γεωργία και Κτηνοτροφία (Μάρτιος), 66-97.
- Τζανακάκης, Εντομολογία, Universal Studio Press, 1995
- Τριανταφυλλίδης Κωνσταντίνος, Κλασική και Μοριακή Γενετική, εκδοτικός οίκος Αδελφών Κυριακίδη, 2004.