

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική Εργασία

Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της  
ελιάς



Κωνσταντίνος Σταυρόπουλος

ΛΑΡΙΣΑ 2012

## Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Κωνσταντίνου Μαθιόπουλου.

### ***Τριμελής Επιτροπή***

#### **Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος**

Αναπληρωτής καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### **Σαραφίδου Θεολογία**

Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

#### **Αυγουστίνος Αντώνης**

Διδάσκων ΠΔ407 του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

## *Ευχαριστίες*

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τον κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο, για την εμπιστοσύνη που έδειξε προς το πρόσωπο μου και την ανάθεση αυτής της διπλωματικής εργασίας, τη βοήθεια και την καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της εκπονήσεως της, τις συμβουλές, την υποστήριξη καθώς και την εύστοχη πάντοτε επισήμανση των λαθών μου. Ακόμη, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου, για τη μεταλαμπάδευση των γνώσεων του, του τρόπου σκέψης του, αλλά και την αγάπη και το ενδιαφέρον του που μου μετέδωσε απλόχερα.

Επίσης, ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στην υποψήφια διδάκτορα κ. Μαρία-Ελένη Γρηγορίου, για την πολύτιμη και ανεκτίμητη βοήθειά της και την άψογη συνεργασία μας και στην υποψήφια διδάκτορα κ. Έφη Σαγή, για τις πολύτιμες συμβουλές και γνώσεις που μου μετέδωσε.

Τέλος, ευχαριστώ πολύ τις μεταπτυχιακές φοιτήτριες Βάσω Παπακρίβου, Παναγιώτα Κοσκινιώτη και τις προπτυχιακές φοιτήτριες κ. Χρυσάνθη Αλεξανδρή και κ. Αναστασία Μανούση, για την αρμονική συνύπαρξη μέσα στο εργαστήριο και για το ευχάριστο και φιλικό κλίμα το οποίο επικρατεί στο χώρο αυτό.

Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

## Περιεχόμενα

<b>1. Εισαγωγή.....</b>	<b>9</b>
1.1 Το ριβοσωμικό RNA.....	9
1.2 Η χρησιμότητα του rRNA.....	11
1.2.1 Στη φυλογενετική ανάλυση.....	11
1.2.2 Στην αναγνώριση και ανακάλυψη νέων μικροοργανισμών.....	13
1.3 Το rRNA στα έντομα.....	14
1.3.1 Η διάσπαση του 28S rRNA στα έντομα.....	14
1.3.2 Ρετρομεταθετά στοιχεία διακόπτουν το rDNA των εντόμων.....	16
1.3.3 Το IGS στα έντομα.....	17
1.4 Ο δάκος της ελιάς.....	19
1.4.1 Περιγραφή του δάκου.....	19
1.4.2 Ο κύκλος ζωής του.....	22
1.4.3 Η ζημιά που προκαλεί.....	22
<b>2. Σκοπός.....</b>	<b>25</b>
<b>3. Μέθοδοι.....</b>	<b>27</b>
3.1 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	27
3.1.1 PCR για γονιδιακή ενίσχυση DNA.....	27
3.1.2 PCR μεγάλου μήκους (Long PCR).....	29
3.2 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων.....	30
3.2.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	30
3.2.2 Εξαγωγή μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	32
3.2.3 Κατάτμηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	32
3.2.4 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο.....	33

## Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

3.2.5	Κατακρήμιση DNA με ισοπροπανόλη.....	34
3.3	Βακτηριοφάγος λ-DASH® II (Stratagene).....	35
3.3.1	Ανάπτυξη βακτηρίων ξενιστών.....	35
3.3.2	Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.....	36
3.3.3	Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο.....	37
3.3.4	Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ.....	37
3.3.5	Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου λ.....	38
3.4	Υβριδοποίηση.....	39
3.4.1	Σήμανση ανιχνευτών.....	39
3.4.2	Μεταφορά DNA σε νάilon μεμβράνη.....	40
3.4.3	Μεταφορά φαγικών πλακών σε νάilon μεμβράνη.....	42
3.4.4	Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνη.....	42
3.4.5	Εμφάνιση σήματος.....	43
3.5	Κλωνοποίηση.....	44
3.5.1	Αντίδραση σύνδεσης και Ηλεκτροδιάτρηση.....	44
3.5.2	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	45
<b>4.</b>	<b>Υλικά.....</b>	<b>47</b>
4.1	PCR.....	47
4.2	Ηλεκτροφόρηση.....	47
4.3	Βακτηριοφάγος λ.....	48
4.4	Υβριδοποίηση.....	49
4.5	Κλωνοποίηση.....	49
<b>5.</b>	<b>Αποτελέσματα.....</b>	<b>51</b>
5.1	Ενίσχυση του IGS σε γονιδιωματικό DNA δάκου με PCR.....	51
5.2	Απομόνωση και επεξεργασία της δομής του rDNA.....	52

Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

5.2.1	Δημιουργία ανιχνευτών.....	52
5.2.2	Διαλογή φαγικής βιβλιοθήκης.....	52
5.2.3	Επεξεργασία της δομής του rDNA.....	52
<b>6.</b>	<b>Συζήτηση.....</b>	<b>55</b>
<b>7.</b>	<b>Βιβλιογραφία.....</b>	<b>57</b>



Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

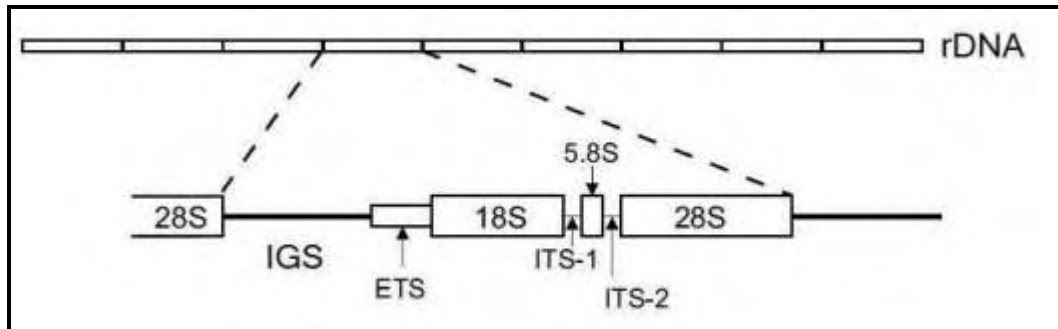
### 1.1 *Το ριβοσωμικό RNA*

Το ριβοζονουκλεϊκό οξύ, δηλαδή το RNA, είναι μία από τις δύο κατηγορίες των πολυμερών νουκλεϊκών οξέων στο κύτταρο. Αποτελείται από μονομερή νουκλεοτίδια που παίζουν σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες της μεταγραφής και της μετάφρασης του DNA σε πρωτεϊνικά προϊόντα. Τα προϊόντα της μεταγραφής, δηλαδή της μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας από το DNA σε RNA, είναι το mRNA (messenger RNA: αγγελιοφόρο RNA), το οποίο μεταφέρει τη γενετική πληροφορία για την παραγωγή μιας πολυπεπτιδικής αλυσίδας, το tRNA (transfer RNA: μεταφορικό RNA), το οποίο μεταφέρει αμινοξέα σε μια επεκτεινόμενη πολυπεπτιδική αλυσίδα στα ριβοσώματα του κυττάρου, το snRNA (small nuclear RNA: μικρό πυρηνικό RNA), το οποίο συνδέεται με ειδικές πρωτεΐνες σχηματίζοντας ριβονουκλεοπρωτεϊνικά συμπλέγματα (snRNP) που συμμετέχουν στη διαδικασία ματίσματος του RNA στα ευκαρυωτικά κύτταρα, το καταλυτικό RNA ή ριβοζύμη (Thomas R. Cech and Sidney Altman, 1989), το οποίο έχει την ικανότητα να καταλύει χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα στο κύτταρο και τέλος το rRNA (ribosomal RNA: ριβοσωμικό RNA), το οποίο συνδέεται με πρωτεΐνες και σχηματίζεται το ριβόσωμα.

Τα ριβοσωμικά γονίδια (εκτός των γονιδίων που κωδικοποιούν το 5S rRNA), είναι εγκατεστημένα στον πυρηνίσκο του πυρήνα. Λόγω της μεγάλης σημασίας τους κατά την πρωτεϊνοσύνθεση, τα γονίδια αυτά μεταγράφονται με πολύ γοργούς ρυθμούς. Για την άμεση ανταπόκριση στα υψηλά επίπεδα μεταγραφής rRNA, τα ευκαρυωτικά κύτταρα διαθέτουν πολλά επαναλαμβανόμενα αντίγραφα αυτών των γονιδίων, τα οποία είναι οργανωμένα σε μεταγραφικές μονάδες και βρίσκονται στην περιοχή οργανωτή του πυρηνίσκου (NOR: Nucleolus Organizer Region) σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα (Cheryl Prokhorowich et al. 2002). Στα ευκαρυωτικά κύτταρα ο αριθμός των αντιγράφων κυμαίνεται από 100 μέχρι 2000, ενώ στα προκαρυωτικά από ένα μέχρι 15 αντίγραφα τα οποία οργανώνονται σε ένα οπερόνιο (Klappenbach and Saxman, 2001).

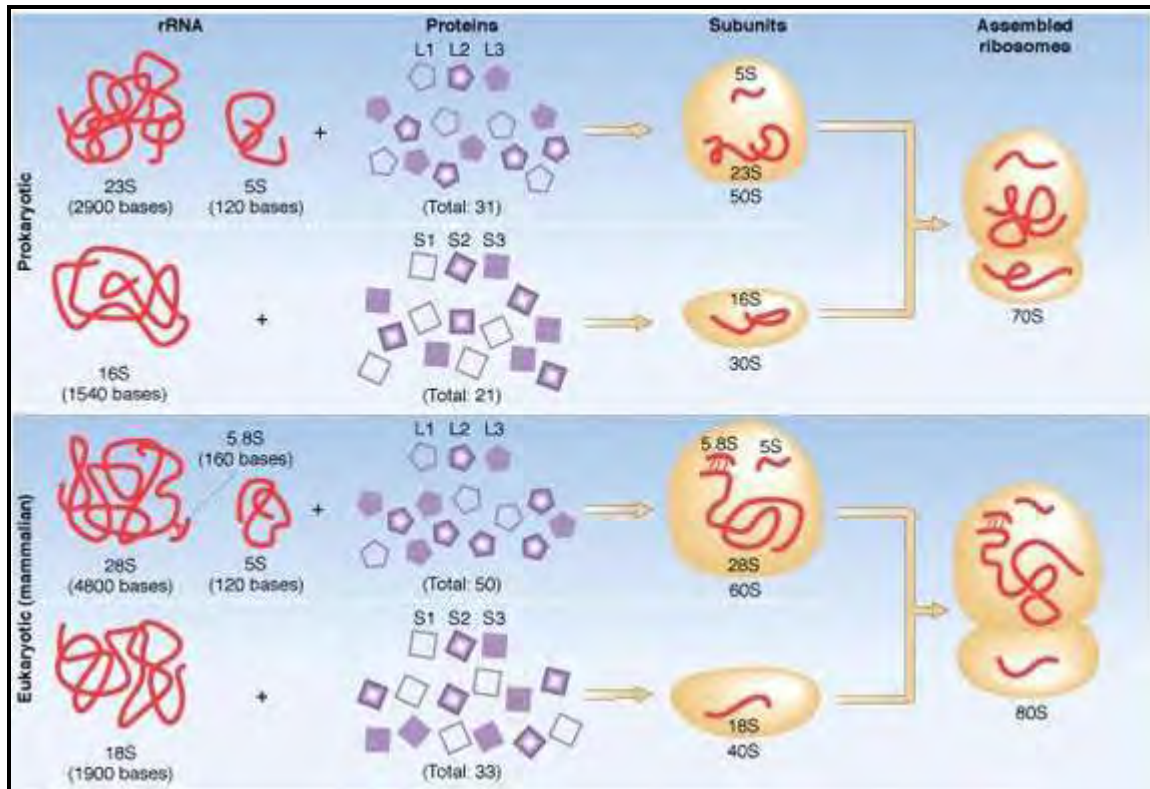
Το rRNA αποτελεί το 80-85% του συνολικού RNA ενός κυττάρου (Paule MR and Lofquist AK, 1996) και τα διαφορετικά rRNA διαχωρίζονται μεταξύ τους από την ταχύτητα καθίζησης τους (S: Svedberg: μονάδα μέτρησης της ταχύτητας καθίζησης). Κάθε μεταγραφική μονάδα περιέχει αλληλουχίες που κωδικοποιούν για το 18S, 5,8S και 28S rRNA. Οι αλληλουχίες αυτές διαχωρίζονται μεταξύ τους από δύο εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα (ITS: Internal Transcribed Spacer) ITS1 και ITS2. Ανοδικά του 18S βρίσκεται ένα εξωτερικό μεταγραφόμενο

διάστημα (ETS: External Transcribed Spacer), το οποίο περιέχει πληροφορίες που απαιτούνται για την σωστή επεξεργασία του rRNA (Wouter Musters et al. 1990). Οι μεταγραφικές μονάδες διαχωρίζονται από τα πολυάριθμα αντίγραφα τους από ένα μη μεταγραφόμενο διάστημα (NTS: Non Transcribed Spacer), το οποίο ονομάζεται και διαγονιδιακό διάστημα (IGS: InterGenic Spacer). Αυτή η περιοχή περιέχει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες λειτουργούν ως υποκινητής και ως ενισχυτές της μεταγραφής (J. J. Gillespie et al. 2006) (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1: Σχηματική απεικόνιση της οργάνωσης των μεταγραφικών μονάδων του rDNA.

Η πρωτεϊνσύνθεση είναι μία από τις πιο θεμελιώδεις δραστηριότητες στις οποίες συμμετέχει και κατέχει κύριο ρόλο το rRNA και η οποία διεξάγεται από τα ριβοσώματα. Τα ριβοσώματα είναι μεγάλα συμπλέγματα που αποτελούνται από rRNA και πρωτεΐνες και η ικανότητα τους να καταλύουν την πρωτεϊνσύνθεση οφείλεται στο RNA (Smit and Widmann, 2007). Πιο συγκεκριμένα αποτελούνται από δύο υπομονάδες, όπου η κάθε μία αποτελείται από rRNA και πρωτεΐνες. Η μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα των ευκαρυωτών περιλαμβάνει τρία rRNA: 28S (>4000 νουκλεοτίδια), 5,8S (160 νουκλεοτίδια), 5S (120 νουκλεοτίδια), καθώς και 50 πρωτεΐνες, ενώ των προκαρυωτών περιλαμβάνει δύο rRNA: 23S (2900 νουκλεοτίδια), 5S (120 νουκλεοτίδια), καθώς και 30 περίπου πρωτεΐνες. Η μικρή ριβοσωμική υπομονάδα των ευκαρυωτών περιλαμβάνει το 18S rRNA (1900 νουκλεοτίδια), καθώς και 30 περίπου πρωτεΐνες, ενώ των προκαρυωτών περιλαμβάνει το 16S (1540 νουκλεοτίδια) και περίπου 20 πρωτεΐνες. Το 5S rRNA κατέχει σημαντικό ρόλο στη δομή της μεγάλης ριβοσωμικής υπομονάδας των ευκαρυωτών, όμως δεν κωδικοποιείται στον πυρηνίσκο όπως τα υπόλοιπα rRNA (Ciganda and Williams, 2011) (Εικόνα 1.2). Επίσης, υπάρχει και το 16S (1540 νουκλεοτίδια) και το 12S rRNA (900 νουκλεοτίδια) που αντιστοιχούν στην μεγάλη και μικρή ριβοσωμική υπομονάδα των μιτοχονδριακών RNA των σπονδυλωτών (Van Etten, Walberg and Clayton, 1980). Το rRNA των χλωροπλαστών και των μιτοχονδρίων μοιάζει περισσότερο με αυτό των προκαρυωτών, παρά με των ευκαρυωτών (Evrard, Kuntz and Weil, 1990).



Εικόνα 1.2: Σχηματική απεικόνιση της μεγάλης και της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας των προκαρυωτών και των ευκαρυωτών.

## 1.2 Η χρησιμότητα του rRNA

### 1.2.1 Στη φυλογενετική ανάλυση

Η μοριακή φυλογενετική ανάλυση είναι η χρήση μακρομοριακών αλληλουχιών για την αναδόμηση των εξελικτικών σχέσεων ανάμεσα στους οργανισμούς. Το μέγεθος της διαφοράς μεταξύ ομόλογων DNA, RNA, ή πρωτεϊνικών αλληλουχιών σε διαφορετικούς οργανισμούς χρησιμοποιείται ως κριτήριο για το πόσο αυτοί οι οργανισμοί αποκλίνουν μεταξύ τους. Τα βήματα μιας μοριακής φυλογενετικής ανάλυσης είναι: 1) απόφαση τι οργανισμός / αλληλουχία / γονίδιο / περιοχή θα εξεταστεί, 2) καθορισμός των αλληλουχιών πειραματικά, 3) αναγνώριση των ομόλογων καταλοίπων και 4) σύγκριση των αλληλουχιών για καθορισμό των σχέσεων (James W. Brown, NC State University).

Η σύγκριση των rRNA αλληλουχιών είναι ένα πολύ ισχυρό εργαλείο για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τη φυλογενετική και εξελικτική σχέση ανάμεσα σε βακτήρια, αρχαία και ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Weisburg et al. 1991). Τα διάφορα rRNA έχουν και διαφορετικά φυλογενετικά οφέλη (Jorgenson and Cluster, 1988). Τα 18S και 28S rRNA αναπτύσσονται σχετικά αργά και είναι χρήσιμα στην κατεύθυνση ευρέων φυλογενετικών υποθέσεων

περιλαμβάνοντας ένα ευρύ πεδίο οργανισμών (Bruns et al. 1991; Cullings 1994; Maidak et al. 1997). Το εσωτερικό μεταγραφόμενο διάστημα (ITS) αναπτύσσεται σχετικά γρήγορα και μπορεί να είναι χρήσιμο στον καθορισμό μεταξύ ειδών (Cullings et al. 1996; Vogler and Bruns, 1998) και μερικές φορές στις σχέσεις μέσα στο γένος (Baura et al. 1992). Το διαγονιδιακό διάστημα (IGS), μία μη κωδική περιοχή, αναπτύσσεται σε ένα κατάλληλο ρυθμό για πληθυσμιακές μελέτες (Appel and Gordon, 1996). Το 5,8S rRNA αναπτύσσεται σχετικά αργά και εξαιτίας της θέσης του ανάμεσα στο ITS, χρησιμοποιείται γενικά ως εργαλείο ευθυγράμμισης. Παρόλα αυτά αυτή η περιοχή φαίνεται να περιέχει αξιοσημείωτες φυλογενετικές πληροφορίες (Hershkovitz and Lewis, 1996).

Η ανάλυση του 16S rRNA είναι μια απλή και συνηθισμένη μέθοδος για την αναγνώριση μικροοργανισμών (Banykin et al. 2004). Η χρήση αυτού του rRNA είναι συχνά η καλύτερη επιλογή, διότι είναι παρόν σε όλα τα κύτταρα (προκαρυωτών, μιτοχονδρίων και χλωροπλαστών), έχει ακριβώς την ίδια λειτουργία σε όλα τα κύτταρα, η αλληλουχία και η δομή του έχουν συντηρηθεί αρκετά και είναι εύκολο να αλληλουχηθεί, διαθέτει περιοχές που αναπτύσσονται αργά και άλλες γρήγορα και τέλος είναι αρκετά μεγάλο (~1500 νουκλεοτίδια) για πληροφοριακούς σκοπούς (Janda and Abbott, 2007). Η ασυνήθιστη αυτή συντήρηση του rRNA μπορεί να φανεί σε αυτά τα τμήματα των ακολουθιών από διαφορετικούς οργανισμούς (Εικόνα 1.3).

Human	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGT ATATTAAGTTGCTGCAGTTAAAAAG
Yeast	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGT ATATTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAG
Corn	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGT ATATTTAAGTTGTTGCAGTTAAAAAG
<i>E. coli</i>	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCG TTAATCGGAATTAAGGGCGTAAAGCG
<i>Anacystis nidulans</i>	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGGAGAGGCAAGCG TTATCCGGAATTAAGGGCGTAAAGCG
<i>Thermotoga maritima</i>	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGGGCAAGCG TTACCCGGATTAAGGGCGTAAAGGG
<i>Methanococcus vannielii</i>	GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACCGACGGCCCGAGTG GTAGCCACTCTTATTGGGCCTAAAGCG
<i>Thermococcus celer</i>	GTGGCAGCCGCCGCGGTAATACCGGCGGCCCGAGTG GTGGCCGCTATTATTGGGCCTAAAGCG
<i>Sulfolobus sulfotaricus</i>	GTGTCAGCCGCCGCGGTAATACCAGCTCCGCGAGTGG TCGGGGTGATTAAGGGCGTAAAGCG

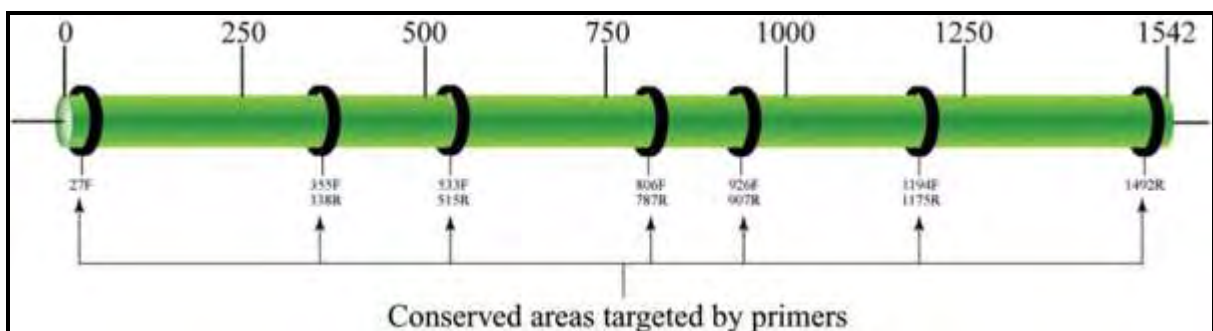
Εικόνα 1.3: Απεικόνιση τμήματος της αλληλουχίας του 16S rRNA σε διαφορετικούς οργανισμούς.

Το 16S rRNA, το πιο συνηθισμένο για φυλογενετική ανάλυση, μαζί με το 23S rRNA έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποσαφήνιση των φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα σε πολλά βακτήρια

### 1.2.2 Στην αναγνώριση και ανακάλυψη νέων μικροοργανισμών

Οι κλασικές μέθοδοι για την αναγνώριση βακτηρίων είναι βασισμένες σε χαρακτηριστικά που παρατηρούνται σε γνωστά είδη με αναμενόμενες βιοχημικές και φυσικές ιδιότητες κάτω από ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης. Όταν κοινοί μικροοργανισμοί παρουσιάζονται με ασυνήθιστους φαινοτύπους, η εμπιστοσύνη στο φαινότυπο μπορεί να δεσμευτεί για την ακριβής αναγνώριση (Petti C.A. and Polage C.R., 2005). Η αναγνώριση μέσω γονιδιακής αλληλούχισης είναι περισσότερο αντικειμενική, δεν απαιτεί ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης η ακόμα και ζωντανό μικροοργανισμό, και έχει την προστιθέμενη ικανότητα να καθορίζει ταξινομικές σχέσεις μεταξύ βακτηρίων (Barth Reller and Melvin P. Weinstein, 2007).

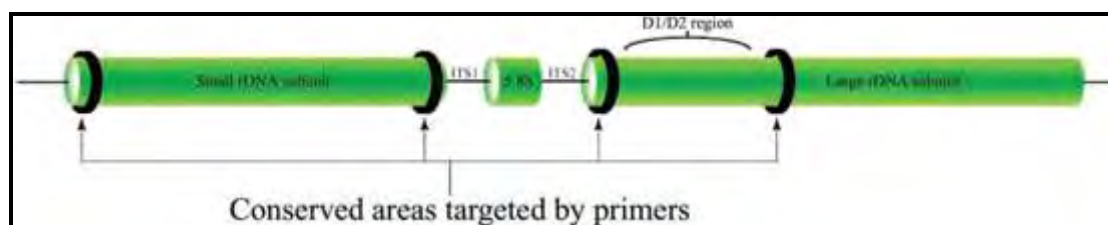
Μία από τις πιο ελκυστικές δυνατότητες της χρήσης των πληροφοριών που δίνει η αλληλουχία του 16S rRNA, είναι ότι εξασφαλίζει την αναγνώριση του γένους και του είδους για βακτήρια στα οποία δεν υπάρχει ένα αναγνωρισμένο βιοχημικό προφίλ και για στελέχη τα οποία είναι σπάνια συνδεδεμένα με ανθρώπινες μολυσματικές νόσους (Janda and Abbott, 2007; Drancourt and Bollet, 2000). Για την αναγνώριση βακτηρίων, το 16S rRNA είναι ιδιαίτερος σημαντικό, στην περίπτωση των βακτηρίων με ασυνήθιστο φαινοτυπικό προφίλ, σπάνιων βακτηρίων, αργά αναπτυσσόμενων βακτηρίων και βακτηρίων αδύνατον να καλλιεργηθούν (προς το παρόν). Έχει εξασφαλίσει, όχι μόνο τις γνώσεις για την αιτιολογία των μολυσματικών ασθενειών, αλλά επίσης βοηθάει τους γιατρούς στην επιλογή αντιβιοτικών και στο να προσδιορίσουν τη διάρκεια της θεραπείας. Ακόμη, με τη χρήση του έχουν ανακαλυφθεί 215 νέα είδη βακτηρίων από ανθρώπινα δείγματα τα τελευταία χρόνια (Woo PC and Lau SK, 2008) (Εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Σχηματική απεικόνιση του 16S rRNA των βακτηρίων.

Όμοια με τα βακτήρια, κλασική ταυτοποίηση των μυκήτων απαιτεί βιοχημικά τεστ και εμπειρία στην αναγνώριση της μορφολογίας των αναπαραγωγικών δομών των μυκήτων μακροσκοπικά και μικροσκοπικά. Η αναγνώριση ή ταυτοποίηση μέσω γονιδιακής αλληλούχισης

δεν απαιτεί βιώσιμους οργανισμούς ή σχηματισμό σπορίων, καθιστώντας έτσι ικανή μία γρήγορη διάγνωση (Barh Reller and Melvin P. Weinstein, 2007). Τα γονίδια της περιοχής του rDNA, που αποτελούν ευνοϊκούς στόχους για την αναγνώριση μυκήτων, είναι τα εσωτερικά μεταγραφόμενα διαστήματα (ITS1, ITS2), τα οποία έχουν αποδειχτεί χρήσιμα για την ταυτοποίηση των *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* (Chen YC and Eisner JD, 2000; Ciardo DE and Schär G, 2006) και είδη των *Aspergillus*, zygomycetes, dematiaceous molds και άλλων ιατρικά σχετικών μυκήτων (Iwen PC and Hinrichs SH, 2002; Schwarz P and Bretagne S, 2006). Επίσης, οι αλληλουχίες τους χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση και τη διάκριση του *Fusarium spp.*, υπεύθυνου για οπτικές μολύνσεις (Oecbsler and Feilmeier, 2009). Παρόλα αυτά όμως, οι περιοχές ITS έχουν περιορισμούς και εναλλακτικά γονίδια στόχοι είναι απαραίτητα στην αναγνώριση ιδιαίτερων γενών, όπως είναι οι D1 και D2 επικράτειες του 28S rRNA (Hall L and Wohlfiel S, 2004) (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5: Σχηματική απεικόνιση της δομής του rDNA των μυκήτων.

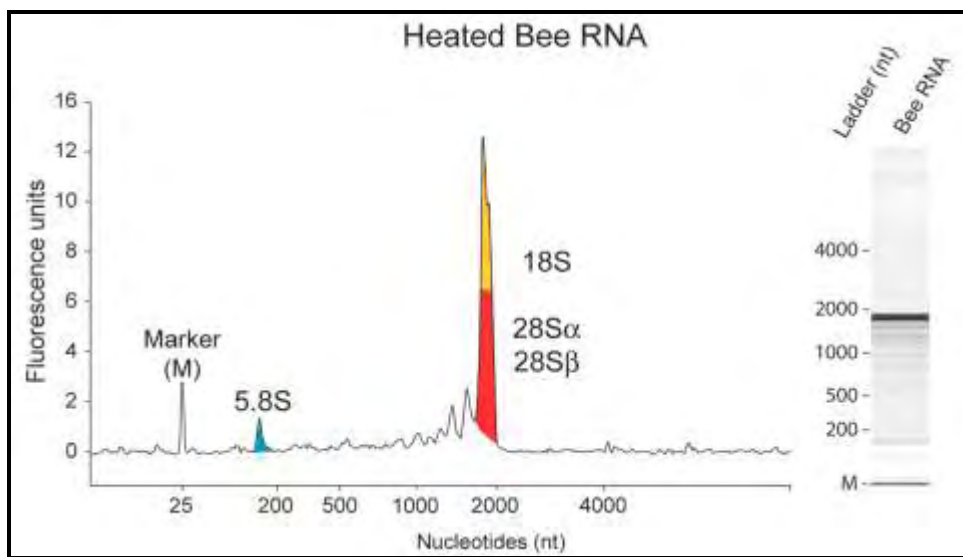
### 1.3 Το rRNA στα έντομα

#### 1.3.1 Η διάσπαση του 28S rRNA στα έντομα

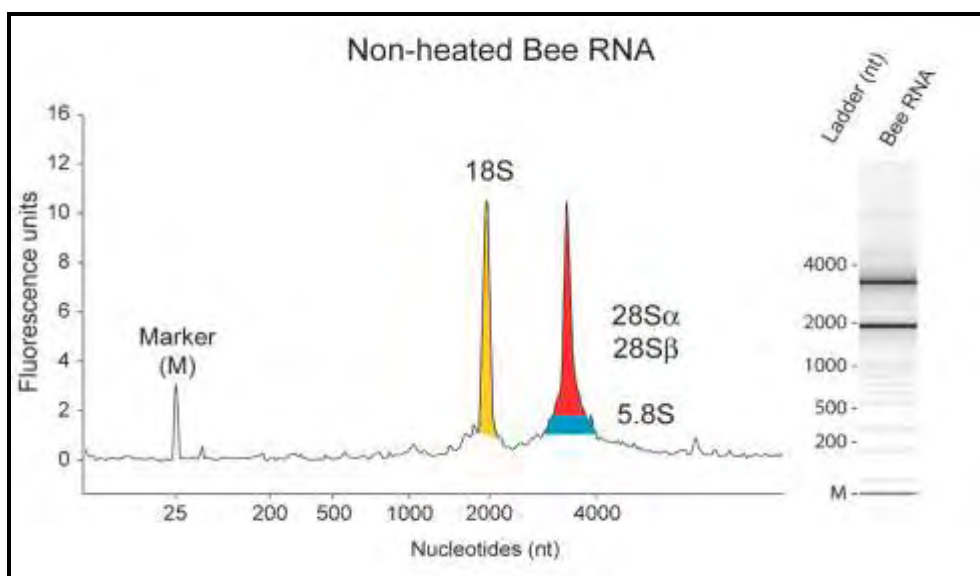
Το κυτταροπλασματικό ριβόσωμα των ευκαρυωτικών κυττάρων περιέχει τέσσερα RNA μόρια, 28S, 18S, 5,8S και 5S rRNA. Η έκταση της κωδικής περιοχής του rRNA (rDNA) είναι από 4000 νουκλεοτίδια σε μερικούς μονοκύτταρους οργανισμούς μέχρι 5000 νουκλεοτίδια στον άνθρωπο (Loening et al. 1968; Ishikawa et al. 1977). Το 28S rRNA των εντόμων και πολλών άλλων πρωτοστόμιων χαρακτηρίζεται από το διαχωρισμό του σε δύο ισομεγέθεις υπομονάδες,  $\alpha$  (1900 νουκλεοτίδια) και  $\beta$  (2000 νουκλεοτίδια) (Winnebeck et al. 2010), κάτω από συνθήκες αποδιάταξης (Ishikawa and Newburgh, 1972). Αυτές οι δύο υπομονάδες είναι συνδεδεμένες μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου στις περιοχές κοντά στο σημείο αποκοπής, το οποίο βρίσκεται στο μέσο του 28S rRNA. Το συγκεκριμένο αυτό σημείο αποκοπής, το οποίο αποκαλείται « *hidden break* », έχει επίσης βρεθεί στο 23S rRNA των χλωροπλαστών των φυτών (Kössel and Natt, 1985), αλλά σε κανένα 28S rRNA των δευτεροστόμιων (Fujiwara and Ishikawa, 1986).

## Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

Στην μέλισσα *A. mellifera* το rRNA προφίλ της φανέρωσε μία μονή rRNA κορυφή αντί για δύο καθαρές κορυφές που αναμένονται για τα δύο μεγάλα rRNA είδη, 18S και 28S. Προτάθηκε έτσι ότι μία μονή κορυφή rRNA είναι κοινά εμφανίσιμη στο RNA των εντόμων και πιθανότατα δεν αναπαριστά αποδιάταξη, παρόλα αυτά όμως δεν υπάρχει μια εξήγηση γι αυτό το φαινόμενο (Εικόνα 1.6A). Ενδιαφέρον παρατηρήθηκε όταν τα δείγματα δεν αποδιατάσσονταν με θερμότητα, πριν το διαχωρισμό, εμφανίζονταν οι δύο αναμενόμενες 18S και 28S rRNA κορυφές (Εικόνα 1.6B). Φαίνεται επομένως πως η θερμότητα μεταλλάξει το 28S rRNA σε δύο κομμάτια (α και β), τα οποία συγκρατούνται με το 18S rRNA κλάσμα (Winnebeck et al. 2010).



Εικόνα 1.6A: Διαγραμματική απεικόνιση του rRNA προφίλ της *A. mellifera*.



Εικόνα 1.6B: Διαγραμματική απεικόνιση του rRNA προφίλ της *A. mellifera*.



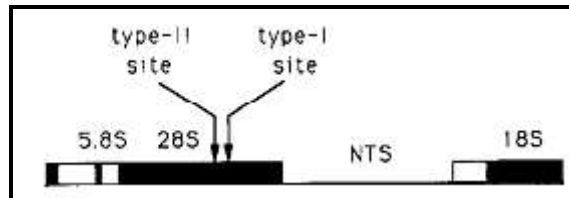
Ο μηχανισμός εισαγωγής του hidden break, μία διακοπή του φωσφοδιεστερικού δεσμού συγκεκριμένα στο 28S rRNA των πρωτοστόμιων, έχει μελετηθεί σε πολλά έντομα. Πιο συγκεκριμένα στο λεπιδόπτερο, *Bombyx mori*, μετά από ανάλυση έχει προταθεί ότι μία έκταση 30 νουκλεοτιδίων αποκόπτεται από το μέσο της περιοχής του 28S rRNA και γεννάται το hidden break (Fujiwara and Ishikawa, 1986). Το μέγεθος της έκτασης που αφαιρείται ποικίλει ανάμεσα σε διαφορετικά έντομα, όπως στη *Sciara coprophila* 19 νουκλεοτίδια (Delanversin et al. 1983) και στη *Drosophila melanogaster* 60 νουκλεοτίδια (Ware and Renkawitz, 1985). Έχει προταθεί ότι μία αλληλουχία εξαιρετικά πλούσια σε αδενίνη και ουρακίλη (AU – rich), η οποία περιλαμβάνει την ειδική UAAU περιοχή και σχηματίζει μία θηλιά, μπορεί να είναι ένα σήμα για την εισαγωγή του hidden break.

Όλα τα έντομα φαίνεται να έχουν τα δύο κομμάτια του 28S rRNA, επομένως και το hidden break, και εκτός από την κλάση των εντόμων φαίνεται να υπάρχουν όχι μόνο και σε άλλα αρθρόποδα, αλλά και σε πολλά άλλα πρωτοστόμια (Ishikawa et al. 1977). Με μεγάλη έκπληξη ανακαλύφθηκαν και σε αρκετά είδη τρωκτικών, θηλαστικά, στη Νότια Αμερική που ανήκουν στο γένος *Ctenomys* (Melen et al. 1999). Από τα έντομα στα μόνα που δεν έχει βρεθεί αυτός ο διαχωρισμός του 28S rRNA είναι οι αφίδες (Shine and Dalgarno, 1973). Σύγκριση αλληλουχιών προτείνει ότι, σε αντιδιαστολή με αυτά που βρέθηκαν στο rRNA άλλων εντόμων, μία θηλιά που σχηματίζεται σε αυτή την περιοχή του rDNA των αφίδων δεν είναι πλούσια σε αδενίνη και ουρακίλη (AU – rich). Όχι μόνο η θηλιά του rRNA των αφίδων δεν διαθέτει την UAAU περιοχή, η οποία μπορεί να είναι ένα σήμα για την εισαγωγή του hidden break, αλλά η συγκεκριμένη περιοχή μοιάζει με το 28S rRNA των δευτεροστόμιων, που δεν περιέχουν το hidden break (Ogino and Fujiwara, 1990).

### **1.3.2 Ρετρομεταθετά στοιχεία διακόπτουν το rDNA των εντόμων**

Η ευκαρυωτική πολυγονιδιακή οικογένεια του rRNA (rDNA) είναι γενικά συγκροτημένη σε μερικές εκατοντάδες μέχρι μερικές χιλιάδες αντίγραφα σε επαναλαμβανόμενες μονάδες παραταγμένες στη σειρά σε ένα ή περισσότερα χρωμοσώματα. Μία από τις πιο κοινές αιτίες της ποικιλομορφίας του rDNA είναι το μέγεθος του διαγονιδιακού διαστήματος (IGS). Μία δεύτερη αιτία της ποικιλομορφίας της έκτασης του rDNA είναι η παρέμβαση στα 28S ριβοσωμικά γονίδια από δύο τύπους αλληλουχιών ένθεσης, οι οποίες έχουν μελετηθεί με λεπτομέρεια στην *Drosophila melanogaster* και στο λεπιδόπτερο *Bombyx mori* (Jackubczak et al. 1990; 1991). Ο τύπος I (R1) είναι στοιχεία, τα οποία έχουν εισέλθει ακριβώς στην ίδια θέση στο 28S γονίδιο των δύο ειδών και προκαλούν πανομοιότυπους διπλασιασμούς σε στοχευμένη θέση. Ο τύπος II (R2) είναι στοιχεία,

τα οποία έχουν αναφερθεί να είναι λιγότερο διαδεδομένα και διακόπτουν το 28S γονίδιο στην ίδια θέση και στα δύο είδη, 75 νουκλεοτίδια ανωδικά από τα στοιχεία του τύπου I, αλλά χωρίς διπλασιασμούς στη θέση εισαγωγής τους (Bigot and Lutchter, 1992) (Εικόνα 1.7).



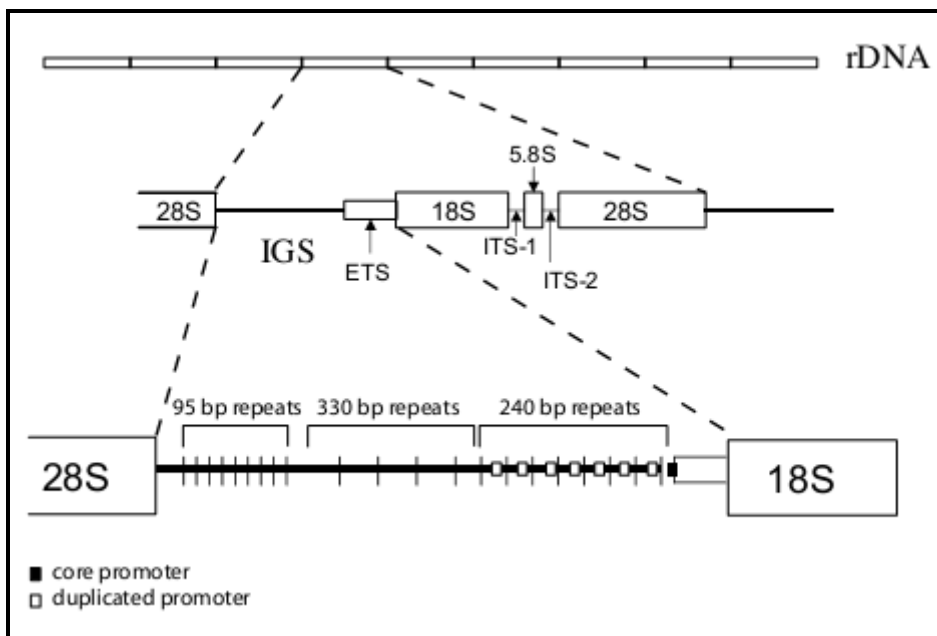
Εικόνα 1.7: Σχηματική απεικόνιση των R1 και R2 στοιχείων.

Μεταθετά στοιχεία υπάρχουν πιθανώς στο γονιδίωμα κάθε ευκαρυώτη (Berg and Howe, 1989). Ανάμεσα στους πιο άφθονους τύπους αυτών των στοιχείων είναι τα ρετρομεταθετά στοιχεία, τα οποία όπως και οι ρετροϊοί μετακινούνται στο ενδιάμεσο ενός RNA (Boeke and Corces, 1989). Τα ρετρομεταθετά στοιχεία μπορούν να χωριστούν σε δύο μεγάλες τάξεις (Xiong et al. 1988; 1990). Η μία τάξη είναι ίδια με τους ρετροϊούς οι οποίοι εμπεριέχουν μακριά επαναλαμβανόμενα άκρα (LTRs), και κωδικοποιούν πρωτεΐνες που έχουν όμοια αμινοξέα με αυτά των ρετροϊών. Στη δεύτερη τάξη, τα ρετρομεταθετά στοιχεία που δεν έχουν LTRs, απουσιάζει οποιοσδήποτε τύπος επαναλαμβανόμενων άκρων και έχουν μικρότερα επίπεδα όμοιων αμινοξέων με αυτά των ρετροϊών. Τα R1 και R2 (προηγουμένως ειπώθηκαν ως τύπος εισαγωγής I και II) είναι μη LTR ρετρομεταθετά στοιχεία, τα οποία βρίσκονται σε επακριβείς θέσεις στο κλάσμα του 28S rRNA. Η παρουσία είτε του R1 είτε του R2 μαζί με το rDNA, το απενεργοποιεί (Jamrich and Miller, 1984; Kidd and Glover, 1981). Μόνο μερικά αντίγραφα των R1 και R2 είναι τοποθετημένα εκτός του rDNA και παρουσιάζονται μη λειτουργικά (Roitha et al. 1981; Browne and Read, 1984; Xiong and Burke, 1988). Ξεχωριστά αντίγραφα των R1 και R2 έχουν το ίδιο 3' άκρο, αλλά μπορεί να έχουν κολοβό 5' άκρο, μία ιδιαιτερότητα που είναι κοινή σε άλλα μη LTR ρετρομεταθετά στοιχεία (Dawid and Rebbert, 1981; Kerrebrock et al. 1989). Η παρουσία ενός R2 στοιχείου σε ένα 28S γονίδιο μπορεί να αναστείλει την έκφραση ενός R1 στοιχείου (Ye and Pérez-González, 2005).

### 1.3.3 Το IGS στα έντομα

Σύμφωνα με όσα έχουν προαναφερθεί, λόγω της σημαντικότητας των ριβοσωμάτων στη σύνθεση των πρωτεϊνών, στην αύξηση του κυττάρου και στην ανάπτυξη του οργανισμού, τα ριβοσωμικά γονίδια χρειάζονται να μεταγράφονται σε πολύ υψηλούς ρυθμούς. Στην επίτευξη

αυτών των υψηλών επιπέδων μεταγραφής των ριβοσωμικών γονιδίων, σημαντικό ρόλο φαίνεται να διαδραματίζει η δομή του διαγονιδιακού διαστήματος (IGS). Η έκταση του IGS κυμαίνεται από 2 kb στις ζύμες μέχρι 21 kb στα θηλαστικά και είναι αρκετά ποικιλόμορφο ανάμεσα στα άτομα ακόμα και του ίδιου είδους (Moss T and Stefanovsky VY, 1995). Αυτοί οι πολυμορφισμοί οφείλονται κυρίως στον αριθμό των διαφορετικών εσωτερικών επαναλήψεων που παρουσιάζονται στο IGS (Εικόνα 1.8). Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, μερικές από αυτές τις επαναλαμβανόμενες περιοχές περιέχουν διπλασιασμούς του υποκινητή των ριβοσωμικών γονιδίων (Moss T and Stefanovsky VY, 1995). Αυτοί οι διπλασιασμοί του υποκινητή φαίνεται να προάγουν τη μεταγραφή του rDNA. Για παράδειγμα, στη *Drosophila melanogaster*, η δραστικότητα του υποκινητή σχετίζεται άμεσα με τον αριθμό των εσωτερικών επαναλήψεων του IGS που περιέχουν τις διπλασιασμένες αλληλουχίες του υποκινητή (Grimaldi G and Nocera PP, 1988; 1990).



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση της περιοχής του IGS, στην οποία απεικονίζονται οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του υποκινητή.

Επίσης, μελέτες υποστηρίζουν την άποψη ότι η δομή του IGS είναι εξίσου σημαντική για την μεταγραφή του rDNA και συνεπώς για τον ρυθμό ανάπτυξης. Σε μελέτες στη *Drosophila melanogaster* βρέθηκε μία σχέση ανάμεσα στο μήκος του IGS και στο χρόνο ανάπτυξης. Πιο αναλυτικά, σε σειρές που επιλέχθηκαν για γρήγορη ανάπτυξη φάνηκε να έχουν μεγαλύτερο μήκος του IGS κατά μέσο όρο, εξαιτίας των περισσότερων αντιγράφων του διπλασιασμένου υποκινητή, σε σχέση με σειρές οι οποίες επιλέχθηκαν για αργή ανάπτυξη (Cluster et al. 1987). Ομοίως, κάτω από επιλογή για γρήγορη ανάπτυξη σε σειρές *Daphnia pulex* το μήκος του IGS ήταν μεγαλύτερο

κατά μέσο όρο (Gorokhova E and Dowling TA, 2002). Ακόμη, μεγαλύτερα τμήματα σχετίζονται με υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης σε διαφορετικά είδη *Daphnia* (Weider and Glenn, 2004).

Επιπλέον, πολλές εργασίες που ασχολούνται με τις διαδικασίες ομογενοποίησης του rDNA της *Drosophila*, έχουν αναλύσει το διαγονιδιακό διάστημα (IGS) (Coen et al. 1982a,b; Coen and Dover, 1983; Tautz et al. 1987; Williams et al. 1987). Το IGS είναι σημαντικό διότι, είναι συγκροτημένο από διαφορετικούς τύπους και αριθμούς μικρών διαδοχικών επαναλαμβανόμενων μονάδων, οι οποίες του δίνουν τη δυνατότητα να είναι πολυμορφικό. Η κατανομή των διαφορετικών μεγεθών του μήκους του IGS μοιράζεται ανάμεσα στο rDNA των X και Y χρωμοσωμάτων, και οι άμεσες παρατηρήσεις των άνισων ανταλλαγών (Coen and Dover, 1983; Gillings et al. 1987), δείχνουν ότι ενδοχρωμοσωμικά γεγονότα παίζουν ρόλο στην εξέλιξη αυτής της περιοχής (Polanco and González, 1998). Άνισος επιχιασμός και σε επίπεδο των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του IGS, αλλά και σε επίπεδο ολόκληρης της rDNA μονάδας, φαίνεται να είναι ο κύριος μηχανισμός που οδηγεί στο συνολικό εξελικτικό πρότυπο του rDNA της *Drosophila* (Dover et al. 1993).

Η πολυμορφικότητα του IGS που του επιτρέπει να έχει μια ιδιαίτερη δομή, είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την εύρεση μοριακών δεικτών (Caruto et al. 2011), τη μελέτη του ρυθμού εξέλιξης, την κατανόηση της δράσης της διαδικασίας ομογενοποίησης του rDNA, καθώς επίσης και για την ανακάλυψη χρήσιμων μονοπατιών για τη ρύθμιση της μεταγραφής του rDNA (González and Barrera, 2002). Λόγω του ότι αυτή η περιοχή εξελίσσεται πολύ γρήγορα και περιέχει έναν μεγάλο αριθμό από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, παρουσιάζεται ως ιδανική για την εύρεση διαγνωστικών δεικτών, που θα οδηγήσουν στον εύκολο διαχωρισμό ανάμεσα σε πολύ κοντινές ταξινομικές ομάδες (υποείδη), όταν μάλιστα, είναι αδύνατη η διάκριση με βάση τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του εντόμου (π.χ. στα στάδια προνύμφης και νύμφης). Οι ειδοειδικές διαφορές που παρουσιάζονται στο IGS συχνά αντικατοπτρίζουν διαφορετικές προελεύσεις και ιδιότητες του οργανισμού, όπως φαίνεται να συμβαίνει με το κουνούπι *Aedes albopictus* (Black et al. 1989).

## **1.4 Ο δάκος της ελιάς**

### **1.4.1 Περιγραφή του δάκου**

Ο δάκος (*Bactocera oleae*) είναι ένα είδος φρουτόμυγας που ανήκει στο υπογένος *Daculus* της οικογένειας Tephritidae. Είναι ένα φυτοφάγο είδος, του οποίου η προνύμφη (κάμπια) τρέφεται με τον καρπό του δέντρου της ελιάς, δηλαδή με την ελιά, και αποτελεί ένα σημαντικό ζιζάνιο στην

## Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

καλλιέργεια της. Εμφανίζεται στη βόρεια, ανατολική και νότια Αφρική, Νότια Ευρώπη, Κανάρια νησιά, Ινδία και δυτική Ασία, δηλαδή όπου υπάρχουν ελαιόδεντρα. Επίσης, έχει κάνει την εμφάνιση του και στην Καλιφόρνια και γενικά πλέον σε όλη την Αμερική. Η κάμπια τρέφεται αποκλειστικά και μόνο με τον καρπό της ελιάς (*Εικόνα 1.9*), ενώ τα ενήλικα τρέφονται με νέκταρ, σταγόνες μελιού και άλλες ευκαιριακές πηγές υγρού ή ρευστού φαγητού. Η ζημιά που προκαλεί στους καρπούς της ελιάς από την εναπόθεση των αυγών του είναι περίπου 30% όλης της σοδειάς στις χώρες γύρω από τη Μεσόγειο, και ιδιαίτερα στην Ελλάδα και στην Ιταλία.



**Εικόνα 1.9:** Προσβεβλημένος καρπός ελιάς στον οποίο φαίνεται η προνύμφη (κάμπια) του δάκου.

Τα αυγά του έχουν μήκος 0.7 με 1.2 mm, είναι λεπτοκαμωμένα και επιπεδοποιημένα στο στομάχι του, και έχουν ένα μικρό λευκό φυμάτιο που είναι απαραίτητο για την αναπνοή του εμβρύου. Η κάμπια έχει μία κωνική – κυλινδρική στενή πρόσοψη, και αναπτύσσεται σε τρία στάδια. Η ώριμη κάμπια έχει μήκος 6 με 7 mm και είναι άσπρο – κίτρινου χρώματος. Τα εμπρόσθια αισθητήρια όργανα είναι διπολικά και το οπίσθιο αισθητήριο όργανο έχει οχτώ απλούς επιθηλιακούς αισθητήρες. Το νυμφικό στάδιο λαμβάνει χώρα μέσα στο βομβύκιο, ένα ελλειπτικό κέλυφος που σχηματίζεται στο τελευταίο στάδιο της μεταμόρφωσης της κάμπιας. Το βομβύκιο έχει μήκος 3.5 με 4.5 mm και ποικίλει στο χρώμα του από απαλό λευκό σε κίτρινο – καφέ, όταν είναι στεγνό. Η αλλαγή χρώματος του βομβυκίου είναι σε θέση να ερμηνεύσει την ηλικία της νύμφης. Τα ενήλικα άτομα έχουν μήκος 4 με 5 mm και άνοιγμα φτερών περίπου 10 mm. Τα φτερά

## Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

του είναι τοποθετημένα οριζόντια, κυρίως διαφανή με καφέ στίγματα και μακριά από το σώμα. Το κεφάλι, ο θώρακας και το υπογάστριο είναι καφέ με πιο σκούρα σημάδια και ο θώρακας έχει αρκετές άσπρες ή κίτρινες κηλίδες σε κάθε πλευρά. Το τέλος του υπογαστρίου στο αρσενικό είναι αμβλύ, ενώ το θηλυκό έχει ένα μεγάλο μαύρο ωοθέτη στο τέλος του υπογαστρίου του, που είναι ορατός με γυμνό μάτι. Επίσης, τα φτερά του αρσενικού είναι πιο σκληρά στην κορυφή του εδραίου πτερυγίου, που είναι μακρύτερο από του θηλυκού (Εικόνες 1.10, 1.11).



**Εικόνα 1.10:** Απεικόνιση ενήλικου αρσενικού δάκου.



**Εικόνα 1.11:** Απεικόνιση ενήλικου θηλυκού δάκου.

### **1.4.2 Ο κύκλος ζωής του**

Στις περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο, κάθε χρόνο εμφανίζονται δύο ως πέντε γενιές του δάκου. Τον χειμώνα τον περνάει σε νυμφικό στάδιο αρκετά εκατοστά κάτω από το έδαφος και από στρώμα φύλλων, και τα ενήλικα άτομα αναδύονται από το Μάρτιο μέχρι το Μάιο, ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και τη θερμοκρασία. Κάτω από συνθήκες καλοκαιριού, παρέρχεται μία περίοδος των 6 με 10 ημερών πριν την απόθεση αυγών. Κατά αυτήν την περίοδο στο θηλυκό ωριμάζουν η ωοθήκη και το πρώτο σετ αυγών. Αρχές Ιουνίου τα θηλυκά αναζητούν ενεργά και εναποθέτουν σε πρόωρα ώριμους καρπούς ελιάς. Περίπου 10 με 12 αυγά εναποθέτονται καθημερινά, συνήθως 1 σε κάθε καρπό και περίπου 200 με 250 κατά τη διάρκεια ζωής τους. Το θηλυκό τρυπάει τον καρπό με το όργανο εναπόθεσης αυγών και αφήνει ένα αυγό κάτωθεν του φλοιού. Τα αυγά εκκολάπτονται μέσα σε 2 – 4 μέρες. Το στάδιο της προνύμφης (κάμπιας) διαρκεί 10 – 13 ημέρες, ενώ το στάδιο της νύμφης 10 ημέρες σε καλοκαιρινές συνθήκες. Τα ενήλικα άτομα ζουν για αρκετούς μήνες.

Ο κύκλος ζωής και ανάπτυξης του δάκου είναι στενά συνδεδεμένος με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, κυρίως του κλίματος και της θέσης των δέντρων της ελιάς. Η θερμοκρασία παίζει ένα σημαντικό ρόλο στη βιωσιμότητα και στους ρυθμούς αναπαραγωγής. Θερμοκρασίες πάνω από 30°C προκαλούν αναρρόφηση των αδένων των ωοθηκών ελαττώνοντας έτσι τη γονιμότητα των θηλυκών. Επίσης, συνεχείς θερμοκρασίες πάνω από 32°C για αρκετές ώρες τη μέρα προκαλούν θνησιμότητα πάνω από 80% στα αυγά και στις κάμπιες. Από την άλλη, χαμηλές θερμοκρασίες έχουν ελάχιστες συνέπειες, διότι η δραστηριότητα των εντόμων εξασθενεί κάτω από 0°C. Γενικά, η βέλτιστη θερμοκρασία για εναπόθεση αυγών και ανάπτυξη των προνυμφών είναι ανάμεσα στους 20 και 30°C, μαζί με την ανάγκη ενός υγρού καιρού.

### **1.4.3 Η ζημιά που προκαλεί**

Οι ζημιές που προκαλούνται από το δάκο είναι δύο ειδών: ποσοτικές και ποιοτικές. Από ποσοτικής πλευράς, η ζημιά που προκαλούν οι κάμπιες του δεύτερου και ειδικότερα του τρίτου σταδίου, αφαιρώντας σημαντικό μέγεθος του πολφού (σάρκα του φρούτου), έχει ως αντίκτυπο τη μείωση της απόδοσης της ελιάς. Μέρος της παραγωγής χάνεται επίσης κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης των καρπών από τα επιτιθέμενα θηλυκά. Οι τρύπες και τα δαγκώματα των καρπών από τις κάμπιες σε αρχικό στάδιο δεν έχουν σημαντική επιρροή στην απόδοση. Από ποιοτικής πλευράς, σημαντική είναι η φθορά στην ποιότητα του λαδιού που εξάγεται από καρπούς, οι οποίοι έχουν υψηλό ποσοστό επιθέσεων από κάμπιες του τρίτου σταδίου. Το λάδι που αποκομίζεται από

## Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

μολυσμένους καρπούς έχει υψηλά επίπεδα οξύτητας (εκφράζεται ως ελαϊκό οξύ από 2 μέχρι 10%, ανάλογα του ποσοστού παρασιτισμού) και μικρότερο όρο ζωής, αφού έχει υψηλή τιμή υπεροξειδίου.



Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Ο δάκος είναι ο σοβαρότερος εχθρός της ελιάς. Προσβάλλει αποκλειστικά τους καρπούς της ήμερης και της άγριας ελιάς και κάθε χρόνο προκαλεί στην ελαιοκομία της χώρας μας σοβαρές οικονομικές ζημιές. Η μέχρι σήμερα καταπολέμηση του δάκου βασίζεται κυρίως στη χρήση χημικών εντομοκτόνων τα οποία όμως μολύνουν τα γεωργικά προϊόντα, έχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υπόλοιπη πανίδα και χλωρίδα, και γενικότερα το περιβάλλον και την υγεία του ανθρώπου. Οι σοβαρές συνέπειες από τη χρήση χημικών ουσιών κάνουν αναγκαία την ανάπτυξη εναλλακτικών, φιλικών προς το περιβάλλον, και αποτελεσματικότερων μεθόδων καταπολέμησης του δάκου της ελιάς. Για την επίτευξη όμως αυτών, απαιτούνται χρήσιμα εργαλεία (διαγνωστικοί δείκτες) στο γονιδίωμα του δάκου, για τον εύκολο διαχωρισμό μεταξύ των υποειδών, που θα έχει ως αποτέλεσμα την καλύτερη διερεύνηση της προέλευσης και των ιδιοτήτων των πληθυσμών, επομένως και την στοχευόμενη καταπολέμηση τους.

Ένα χρήσιμο εργαλείο αποτελούν οι μεταγραφικές μονάδες του ριβοσωμικού DNA, οι οποίες βρίσκονται σε πολυάριθμα αντίγραφα, εξελίσσονται γρήγορα και είναι κατάλληλες για φυλογενετική ανάλυση και ταξινόμηση των υποειδών του εντόμου. Πιο συγκεκριμένα, μία ιδιαίτερη περιοχή του rDNA, το IGS (διαγονιδιακό διάστημα), εξαιτίας της ταχύτατης εξέλιξης του, των αρκετών εσωτερικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών του, καθώς επίσης και της ποικιλομορφίας που διαθέτει, παρουσιάζεται ως ένα πιθανό βασικό εργαλείο για την απόκτηση πληροφοριών και την δημιουργία διαγνωστικών δεικτών. Η χρήση αυτής της πληροφορίας για τη δημιουργία διαγνωστικών δεικτών για το δάκο, θα έδινε τη δυνατότητα για διάκριση μεταξύ των υποειδών του εντόμου και επομένως τη δυνατότητα μελέτης της προέλευσης, καθώς και του τρόπου εξάπλωσης του και φυσικά θα αναδείκνυε νέες μεθόδους για την καταπολέμηση του.

Ο σκοπός της αναφερόμενης διπλωματικής εργασίας είναι η ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου και η ολοκλήρωση της αλληλούχισης του, ώστε να καταστεί δυνατή η ανάπτυξη κατάλληλων διαγνωστικών δεικτών για τη διάκριση των υποειδών καθώς και να διεκπεραιωθούν οι απαραίτητες φυλογενετικές αναλύσεις. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε PCR μεγάλου μήκους για την ενίσχυση της περιοχής IGS με εκκινητές εκατέρωθεν αυτής και εντός των 18S και 28S περιοχών καθώς επίσης και διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε βακτηριοφάγους, με στόχο την κλωνοποίηση και αλληλούχιση της συγκεκριμένης περιοχής.

Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

### 3. ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 *Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)*

##### 3.1.1 PCR για γονιδιακή ενίσχυση DNA

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) αποτελεί μια απλή, ταχεία, επιλεκτική και εξαιρετικά ευαίσθητη in vitro μέθοδο πολλαπλασιασμού του γενετικού υλικού ενός οργανισμού, η οποία πραγματοποιείται με την βοήθεια του ενζύμου της πολυμεράσης και επαναλαμβανόμενους κύκλους τριών διαδοχικών αντιδράσεων. Η PCR μέθοδος ενισχύει κομμάτια DNA μέχρι και 10 kb (Mullis et al. 1986). Μία βασική αντίδραση PCR απαιτεί διάφορα συστατικά και αντιδραστήρια που περιλαμβάνουν:

- i. μήτρα DNA, η οποία περιέχει τη στοχευόμενη περιοχή DNA που θα ενισχυθεί.
- ii. ένα ζεύγος εκκινήτων, οι οποίοι είναι συμπληρωματικοί στο 3' άκρο της κάθε κωδικής και μη κωδικής αλυσίδας του DNA στόχου. Είναι συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συνήθως 15 – 30 βάσεων, τα οποία πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή το 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 ζεύγη βάσεων και να έχουν παραπλήσια θερμοκρασία τήξεως ( $T_m$ ).
- iii. ειδική DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση), που έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή διατηρώντας τη δραστηριότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία γύρω στους 75 – 80 °C.
- iv. κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs).
- v. ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) για την Taq πολυμεράση, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης.
- vi. κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος  $MgCl_2$ . Τα ιόντα  $Mg^{+2}$  σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση.

Κάθε κύκλος πολυμερισμού περιλαμβάνει:

- i. την αποδιάταξη του DNA. Ολική αποδιάταξη του DNA στόχου πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 94 °C για 20 – 30 δευτερόλεπτα. Η αποδιάταξη οφείλεται στη διάσπαση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στις συμπληρωματικές βάσεις.
- ii. την αναδιάταξη των αλυσίδων με τους κατάλληλους συμπληρωματικούς εκκινήτες. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση των εκκινήτων εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η

## Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση ρυθμίζεται περίπου 5 °C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T<sub>m</sub>).

- iii. την επιμήκυνση από κάθε εκκινητή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72 °C.

### Διαδικασία:

- 1) Σε eppendorf τύπου PCR προστίθενται:

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>
DNA	5 – 40 ng
Buffer	1x
dNTPs	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM
Εμπρόσθιος εκκινητής	0,4 – 0,6 μM
Οπίσθιος εκκινητής	0,4 – 0,6 μM
Taq πολυμεράση	1 unit
H <sub>2</sub> O	μέχρι τελικού όγκου

- 2) Οι συνθήκες της αντίδρασης στη συσκευή PCR:

		<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Χρόνος</u>
Αρχική αποδιάταξη	1 κύκλος	95 °C	4 min
Αποδιάταξη DNA στόχου	30 κύκλοι	95 °C	30 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	30 κύκλοι	T <sub>m</sub> – 5 °C	30 sec
Επιμήκυνση εκκινητών	30 κύκλοι	72 °C	1 min
Τελική επιμήκυνση	1 κύκλος	72 °C	5 min

- 3) Τα προϊόντα της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδιου.

### 3.1.2 PCR μεγάλου μήκους (Long PCR)

Η PCR μεγάλου μήκους παρέχει τη δυνατότητα ενίσχυσης έως και 40 kb, σε αντίθεση με την απλή PCR. Η μέθοδος αυτή είναι ίδια με την απλή PCR, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιεί μία υψηλής απόδοσης Taq πολυμεράση με δράση 3' 5' εξωνουκλεάσης, ώστε να επιδιορθώνει τη λανθασμένη ενσωμάτωση νουκλεοτιδίων, και DMSO που αυξάνει την απόδοση της αντίδρασης. Η διαδικασία έγινε με χρήση των Long PCR Enzyme (Fermentas και Biolabs).

#### Διαδικασία:

1) Σε eppendorf τύπου PCR προστίθενται:

<u>Αντιδραστήρια</u>	<u>Τελική συγκέντρωση</u>
DNA	0,75 – 1 µg
Buffer	1x
dNTPs	0,2 mM
DMSO	4 %
Εμπρόσθιος εκκινητής	0,6 – 1 µM
Οπίσθιος εκκινητής	0,6 – 1 µM
Taq πολυμεράση	2,5 unit
H <sub>2</sub> O	μέχρι τελικού όγκου

2) Οι συνθήκες της αντίδρασης στη συσκευή PCR:

		<u>Θερμοκρασία</u>	<u>Χρόνος</u>
Αρχική αποδιάταξη	1 κύκλος	94 °C	3 min
Αποδιάταξη DNA στόχου	9 κύκλοι	96 °C	20 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	9 κύκλοι	T <sub>m</sub> – 5 °C	30 sec
Επιμήκυνση εκκινητών	9 κύκλοι	68 °C	16 min
Αποδιάταξη DNA στόχου	24 κύκλοι	94 °C	20 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	24 κύκλοι	T <sub>m</sub> – 5 °C	30 sec
Επιμήκυνση εκκινητών	24 κύκλοι	68 °C	16 min
			+ 10 sec/κύκλος
Τελική επιμήκυνση	1 κύκλος	68 °C	10 min

3) Τα προϊόντα της PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμιδίου.

## **3.2 Χειρισμός νουκλεϊκών οξέων**

### **3.2.1 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης**

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθαρισμό κομματιών DNA (Sambrook et al. 1989). Η τεχνική αυτή είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει μίγματα κομματιών DNA που δεν μπορούν να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Επιπλέον, η θέση του DNA στο πήκτωμα μπορεί να προσδιοριστεί άμεσα: οι ζώνες του DNA χρωματίζονται με μικρή συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου (φθορίζουσα χρωστική που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA). Μπορούμε έτσι να δούμε με υπεριώδες φως ακόμα και 1 ng DNA.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στο πήκτωμα αγαρόζης εξαρτάται κυρίως από τέσσερις παραμέτρους:

- i. Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά δίκλινα DNA κινούνται με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογάριθμου (log) μοριακού τους βάρους.
- ii. Τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πήκτωμα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.
- iii. Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοικτή κυκλική μορφή (μορφή II) και γραμμικό DNA (μορφή III) του ίδιου μοριακού βάρους έχουν διαφορετική κινητικότητα σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι σχετικές κινητικότητες των τριών μορφών εξαρτώνται κυρίως από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και το βαθμό υπερελικώσεως της μορφής I του DNA.
- iv. Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση (volts), που σημαίνει μικρό ρεύμα, η κινητικότητα γραμμικών κομματιών DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Όμως, αν αυξήσουμε την ένταση του ηλεκτρικού ρεύματος (αύξηση των volts), η κινητικότητα κομματιών DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνονται με διαφορετικό συντελεστή για κάθε κομμάτι DNA.

**Διαδικασία:**

- 1) Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης και θερμαίνεται έως ότου τηχθεί η αγαρόζη και το διάλυμα γίνει τελείως διαυγές.
- 2) Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml.
- 3) Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος της τηγμένης αγαρόζης κατεβεί στους 50 °C, μεταφέρεται σε μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία έχουν τοποθετηθεί, με κάθετη διευθέτηση «χτενάκια», ώστε να προκύψουν οι ειδικές θέσεις «πηγαδάκια» φόρτωσης των δειγμάτων.
- 4) Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα, τα χτενάκια απομακρύνονται και η βάση τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο αυτού που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
- 5) Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται διάλυμα χρωστικής με αναλογία (1:4).
- 6) Τα δείγματα φορτώνονται στα πηγαδάκια σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης υπό σταθερή τάση.
- 7) Η παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται με έκθεση του πηκτώματος σε ακτινοβολία UV.

**Σημειώσεις:**

- ❖ Για τον προσδιορισμό του μεγέθους των ζωνών του DNA στο πήκτωμα παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα ηλεκτροφορείται το κατάλληλο πρότυπο μεγεθών DNA (ladder).
- ❖ Το διάλυμα χρωστικής αυξάνει την πυκνότητα του δείγματος λόγω της παρουσίας γλυκερόλης σε αυτό, ώστε να εισαχθεί ευκολότερα στο πηγαδάκι. Το διάλυμα είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA, επιτρέποντας τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης.
- ❖ Η ηλεκτροφόρηση μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον ποσοτικό προσδιορισμό DNA. Ο ηλεκτροφορητικός ποσοτικός προσδιορισμός ενδείκνυται σε περιπτώσεις είτε χαμηλής συγκέντρωσης DNA, είτε μη καθαρότητας των προς ανάλυση διαλυμάτων. Η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Έτσι, σύγκριση του φθορισμού που εκπέμπεται από το προς ανάλυση δείγμα με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (ladder), παρέχει τη δυνατότητα εκτίμησης της ποσότητας του προς ανάλυση διαλύματος. Η εκτίμηση πραγματοποιείται είτε εμπειρικά, είτε με ποσοτική σύγκριση σε προγράμματα επεξεργασίας στον υπολογιστή.



### **3.2.2 Εξαγωγή μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Η διαδικασία έχει στόχο την ανάκτηση μορίων DNA μετά από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης και πραγματοποιήθηκε με χρήση του Invisorb® Spin DNA Extraction Kit 250 (Invitek).

#### **Διαδικασία:**

- 1) Μετά το πέρας τη ηλεκτροφόρησης, το επιθυμητό τμήμα DNA αποκόπτεται από το πήκτωμα αγαρόζης, τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf 2ml και προσδιορίζεται το βάρος του.
- 2) Σε βάρος >150mg προστίθενται 1ml Gel Solubilizer S και το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 50 °C για 10 λεπτά, έως ότου επιτευχθεί η τήξη του πηκτώματος.
- 3) Έπειτα, προστίθενται 500μl Binding Enhancer και το μείγμα αναδεύεται με πιπέτα 2-3 φορές.
- 4) Το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη (Spin Filter), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής, και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 10.500 – 11.300 rpm για 1 λεπτό.
- 5) Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής, επανατοποθετείται η στήλη και το βήμα επαναλαμβάνεται.
- 6) Στη συνέχεια, προστίθενται 500μl Wash Buffer, ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 9.000 rpm για 30 sec, το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής, επανατοποθετείται η στήλη και το βήμα επαναλαμβάνεται.
- 7) Ακολουθεί φυγοκέντρηση full speed για 4 λεπτά, μεταφορά της στήλης σε καινούριο eppendorf 1,5ml και προστίθενται 20μl Elution Buffer στο κέντρο της στήλης.
- 8) Έπειτα, ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και φυγοκέντρηση σε 9.000 rpm για 1 λεπτό και το βήμα επαναλαμβάνεται.
- 9) Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4 °C.

### **3.2.3 Κατάτμηση DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες**

Τα ένζυμα περιορισμού (restriction enzymes) είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που απομονώθηκαν από διάφορους προκαρυωτικούς οργανισμούς, κυρίως βακτήρια. Τα ένζυμα περιορισμού προστατεύουν τους μικροοργανισμούς αυτούς από την εισβολή ξένου DNA και έχουν ως ιδιότητα να πέπτουν το DNA σε συγκεκριμένες αλληλουχίες. Η προστασία του πυρηνικού DNA του ξενιστή από τα ένζυμα περιορισμού χαρακτηρίζεται από τροποποιήσεις που επιφέρουν στις θέσεις στόχους αυτών. Υπάρχουν δύο κύριες ομάδες ενζύμων περιορισμού. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τα ένζυμα που δημιουργούν κολλώδη μονόκλωνα άκρα (sticky ends). Η δεύτερη ομάδα περιλαμβάνει ένζυμα που δημιουργούν μη κολλώδη δίκλωνα άκρα (blunt ends).

Η δράση του κάθε ενζύμου εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία επώασης και τη σύσταση του διαλύματος επώασης. Η ποσότητα του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί αποτελεί συνάρτηση της ενεργότητάς του και της ποσότητας και μεγέθους του προς κατάτμηση DNA.

**Διαδικασία:**

- 1) Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται διαδοχικά το DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) του ενζύμου, η κατάλληλη ποσότητα ddH<sub>2</sub>O έως τον τελικό όγκο και το ένζυμο.
- 2) Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επώάζεται στην κατάλληλη για το χρησιμοποιούμενο ένζυμο θερμοκρασία (συνήθως 37 °C) για 1 – 2 ώρες.
- 3) Η αντίδραση πέψης τερματίζεται είτε με την προσθήκη διαλύματος EDTA σε τελική συγκέντρωση 10 mM, είτε με επώαση του μείγματος στη θερμοκρασία απενεργοποίησης του ενζύμου.

**Σημειώσεις:**

- ❖ Η συγκέντρωση του ενζύμου δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% του τελικού όγκου της αντίδρασης διότι μπορεί να προκληθεί αναστολή της δράσης του λόγω αυξημένης παρουσίας γλυκερόλης. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες διατηρούνται σε διάλυμα γλυκερόλης 50% και σε θερμοκρασία -20%.
- ❖ Η ποσότητα του ενζύμου μπορεί να μειωθεί εάν αυξηθεί ο χρόνος επώασης της αντίδρασης.

### **3.2.4 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφορμιο**

Η διαδικασία έχει στόχο την απομάκρυνση πρωτεϊνών από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων, λόγω της ιδιότητας της φαινόλης να αποδιατάσσει και να διαχωρίζει τις πρωτεΐνες μαζί με τα λιπίδια από τα νουκλεϊκά οξέα. Τα νουκλεϊκά οξέα συγκεντρώνονται στην υδατική φάση, η οποία μετά από φυγοκέντρηση σχηματίζει την άνω φάση λόγω της μικρότερης πυκνότητάς της. Η παρουσία του χλωροφορμίου διευκολύνει το διαχωρισμό των φάσεων λόγω της μεγάλης πυκνότητας που προσδίδει στην οργανική φάση και απομακρύνει τα τυχόν εναπομείναντα φαινόλης από το διάλυμα. Πρωτόκολλο τροποποιημένο από το Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, E. F. Fritisch, T. Maniatis, 1989.

**Διαδικασία:**

- 1) Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (0,5V/0,5V) και ακολουθεί ανάδευση έως ότου σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα.
- 2) Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14.000g για 5 λεπτά ώστε να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, οργανική και υδατική.

- 3) Η υδατική φάση, στην οποία περιέχονται τα νουκλεϊκά οξέα, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf, προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου (1V), και αφού προηγηθεί ανάδευση, φυγοκεντρείται σε 14.000g για 5 λεπτά.
- 4) Ακολουθεί μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και επανάληψη της εκχύλισης με χλωροφόρμιο.
- 5) Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση σε αιθανόλη.

### **3.2.5 Κατακρήμνιση DNA με ισοπροπανόλη**

Η κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη έχει ως στόχο τη συμπύκνωση, την αφαλάτωση και την επανάκτηση νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Η διαδικασία μπορεί να ποικίλλει στη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό ιζήματος, στον τύπο και τη συγκέντρωση των μονοσθενών κατιόντων που προστίθενται, καθώς και στο χρόνο και την ταχύτητα της φυγοκέντρωσης. Ακολουθήθηκε ένα πρωτόκολλο τροποποιημένο από το Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, 1989.

#### **Διαδικασία:**

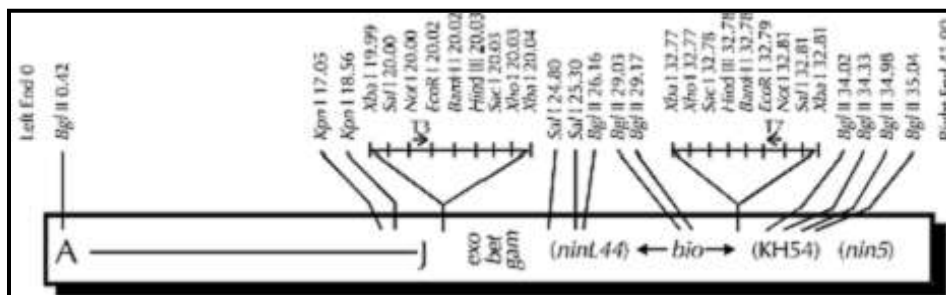
- 1) Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ) τελικής συγκέντρωσης 0,3 M και ίσος όγκος (1V) ισοπροπανόλης.
- 2) Το μείγμα, ύστερα από ισχυρή ανάδευση, τοποθετείται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά και έπειτα, φυγοκεντρείται σε 14.000g για 20 λεπτά.
- 3) Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται μισός όγκος αιθανόλης 70% (0,5V), ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα.
- 4) Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 14.000g για 5 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
- 5) Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε υδατικό διάλυμα.

#### **Σημειώσεις:**

❖ Η κατακρήμνιση μικρής ποσότητας νουκλεϊκών οξέων μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη φορέων συγκατακρήμνισης (όπως γλυκογόνο, tRNA ζύμης, γραμμικό πολυακρυλαμίδιο). Οι φορείς αυτοί είναι αδιάλυτοι σε διαλύματα αιθανόλης και κατά τη φυγοκέντρωση δημιουργούν ίζημα το οποίο παγιδεύει τα νουκλεϊκά οξέα.

### 3.3 Βακτηριοφάγος λ-DASH<sup>®</sup> II (Stratagene)

Ο βακτηριοφάγος λ-DASH<sup>®</sup> II (Εικόνα 3.1) αποτελεί φορέα αντικατάστασης ο οποίος χρησιμοποιείται για την κλωνοποίηση μεγάλων τμημάτων γονιδιωματικού DNA και παρουσιάζει τα εξής χαρακτηριστικά: **α)** αναπτύσσεται σε κύτταρα XL1-Blue MRA' (P2) εκμεταλλεόμενος την επιλογή *spi* (*spi* selection-sensitive to P2 inhibition). Οι βακτηριοφάγοι λ, οι οποίοι περιέχουν ενεργά τα γονίδια *red* και *gam* δεν μπορούν να αναπτυχθούν σε στελέχη ξενιστών που περιέχουν λυσιγόνους φάγους P2. Τα γονίδια *red* και *gam* στο βακτηριοφάγο λ-DASH<sup>®</sup> II εντοπίζονται στο τμήμα που απομακρύνεται κατά την εισαγωγή του ενθέματος (*stuffer*). Έτσι, ο αγρίου τύπου λ-DASH<sup>®</sup> II δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε κύτταρα XL1-Blue MRA', σε αντίθεση με τον ανασυνδυασμένο λ-DASH<sup>®</sup> II, ο οποίος καθίσταται *red*-/*gam*- μετά την απομάκρυνση του «*stuffer*» και την εισαγωγή του ενθέματος. Με τον τρόπο αυτό, κατά την επίστρωση της βιβλιοθήκης σε στέλεχος XL1-Blue MRA' (P2) πραγματοποιείται *spi* επιλογή και αναπτύσσονται μόνο ανασυνδυασμένοι βακτηριοφάγοι. **β)** Επιπλέον, είναι κατασκευασμένος κατά τέτοιο τρόπο ώστε να φέρει εκατέρωθεν του ενθέματος, τους υποκινητές T3 και T7 και να επιτρέπει τη δημιουργία τελο-ειδικών (*end*-specific) RNA ανιχνευτών και **γ)** το ένθεμα μπορεί να απομακρυνθεί με κατάτμηση με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI, καθώς αυτό είναι κλωνοποιημένο στις θέσεις EcoRI του φορέα.



**Εικόνα 3.1:** Γενετικός χάρτης του βακτηριοφάγου λ-DASH<sup>®</sup> II. Το ένθεμα κλωνοποιείται στις θέσεις EcoRI και μπορεί να αποκτηθεί με κατάτμηση με την περιοριστική ενδονουκλεάση NotI.

#### 3.3.1 Ανάπτυξη βακτηρίων ξενιστών

Η ανάπτυξη των βακτηρίων πραγματοποιείται παρουσία μαλτόζης και ιόντων μαγνησίου. Ο βακτηριοφάγος λ για να εισαχθεί στο κύτταρο συνδέεται στον εξωμεμβρανικό υποδοχέα της μαλτοπορίνης (Schwartz, 1967), ο φυσιολογικός ρόλος της οποίας είναι η διευκόλυνση της διάχυσης της μαλτόζης και της μαλτοδεξτρίνης μέσα στο κύτταρο (Szmelcman and Hofnung, 1975). Η σύνδεση του υποδοχέα, ο οποίος κωδικοποιείται από το βακτηριακό γονίδιο *lamb*,

καταστέλλεται από τη γλυκόζη και επάγεται από τη μαλτόζη. Έτσι, η παρουσία της μαλτόζης στο θρεπτικό μέσο έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υποδοχέων στην επιφάνεια των κυττάρων. Τα ιόντα μαγνησίου χρησιμοποιούνται για τη διευκόλυνση της πρόσδεσης του βακτηριοφάγου στον υποδοχέα (Lieb, 1953).

#### Διαδικασία:

- 1) Βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA' αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5ml) εμπλουτισμένο με 10mM MgSO<sub>4</sub> και 0,2% μαλτόζη είτε σε θερμοκρασία 37 °C υπό ισχυρή ανάδευση (210 rpm) για 4 – 6 ώρες, είτε σε θερμοκρασία 30 °C για 12 – 16 ώρες.
- 2) Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 2.000g για 10 λεπτά.
- 3) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναιωρείται ήπια στην απαραίτητη ποσότητα διαλύματος 10mM MgSO<sub>4</sub>, ώστε η οπτική πυκνότητα (OD<sub>600</sub>) του εναιωρήματος των κυττάρων να παρουσιάζει τιμή 0,4 – 0,6 μονάδες.
- 4) Τα κύτταρα αποθηκεύονται σε θερμοκρασία 4 °C.

#### Σημειώσεις:

- ❖ Τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασία 4 °C για περίπου μία εβδομάδα.

### **3.3.2 Τιτλοδότηση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης**

Κάθε εναιώρημα φάγων παρουσιάζει έναν «τίτλο» που εκφράζει τον αριθμό των φαγικών σωματίων που περιέχει ανά ml (pfu/ml).

#### Διαδικασία:

- 1) Παρασκευάζονται 6 διαδοχικές αραιώσεις (των τάξεων 10<sup>-1</sup> – 10<sup>-6</sup>) της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε διάλυμα SM ώστε να χρησιμοποιηθούν στην τιτλοδότηση.
- 2) Ποσότητα των αραιώσεων αυτών (2 μl) αναμιγνύεται με βακτήρια ξενιστές (plating cells) του στελέχους XL1-Blue MRA' (200μl από το απόθεμα με OD<sub>600</sub> = 0,4 – 0,6) σε σωληνάκια τύπου erpendorf και επωάζονται, υπό ανακίνηση, σε θερμοκρασία 37 °C για 20 λεπτά.
- 3) Το μείγμα βακτηρίων/φάγων μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 15ml, ο οποίος περιέχει Top agar (3ml) και διατηρείται σε θερμοκρασία 47 – 50 °C (όχι μεγαλύτερη από 50 °C, διότι θα καταστραφούν τα κύτταρα).
- 4) Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε προθερμασμένο (37 °C) τρυβλίο NZY agar διαμέτρου 90mm. Το τρυβλίο ανακινείται ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος.
- 5) Αφού στερεοποιηθεί η υπερκείμενη αγαρόζη, τα τρυβλία επωάζονται σε θερμοκρασία 37 °C για 12 ώρες.

**Σημειώσεις:**

- ❖ Ο προσδιορισμός του τίτλου πραγματοποιείται σύμφωνα με τη σχέση: [(αριθμός πλακών (pfu) x συντελεστής αραιώσης) / όγκος που επιστρώθηκε (μl)] x 1000 μl/ml.
- ❖ Ο όγκος που επιστρώθηκε (μl) αναφέρεται στον όγκο του διαλύματος των βακτηριοφάγων που αναμίχθηκε με τα βακτήρια-ξενιστές.

**3.3.3 Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε τρυβλίο**

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη αποτελεί ένα τυχαίο άθροισμα τμημάτων DNA κλωνοποιημένων σε κατάλληλους φορείς, που αντιπροσωπεύουν το γονιδίωμα ενός συγκεκριμένου οργανισμού. Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη παρέχει τη δυνατότητα επιλογής συγκεκριμένων κλώνων μέσω υβριδοποίησης με κατάλληλους ανιχνευτές (Clarke and Carbon, 1976).

**Διαδικασία:**

- 1) Η επιθυμητή ποσότητα ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων αναμιγνύεται με βακτήρια ξενιστές του στελέχους XL1-Blue MRA' (500μl από το απόθεμα με OD<sub>600</sub> = 0,4 – 0,6) σε σωληνάκι τύπου erppendorf και επωάζονται σε θερμοκρασία 37 °C για 20 λεπτά.
- 2) Το μείγμα βακτηρίων και φάγων μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου falcon (50ml), ο οποίος περιέχει Top agar (7ml) και διατηρείται σε θερμοκρασία 47 – 50 °C.
- 3) Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε τρυβλίο NZY agar διαμέτρου 90mm. Το τρυβλίο ανακινείται ώστε να γίνει ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος. Αφού στερεοποιηθεί η υπερκείμενη αγαρόζη, το τρυβλίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37 °C για 12 ώρες.

**3.3.4 Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ**

**Διαδικασία:**

- 1) Με τη χρήση υάλινης πιπέτας Pasteur απομονώνεται η επιθυμητή βακτηριοφαγική πλάκα μαζί με το άγαρ και την υπερκείμενη αγαρόζη και τοποθετείται σε διάλυμα SM (500μl).
- 2) Το διάλυμα διατηρείται σε θερμοκρασία 4 °C για 12 ώρες ώστε να επιτευχθεί η διάχυση των φαγικών σωματιδίων στο διάλυμα.

**Σημειώσεις:**

- ❖ Μία πλάκα περιέχει περίπου 10<sup>-6</sup> – 10<sup>-7</sup> φαγικά σωματίδια, τα οποία μπορούν να αποθηκευτούν σε διάλυμα SM σε θερμοκρασία 4 °C για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσουν τη βιωσιμότητά τους.

- ❖ Οι βακτηριοφάγοι λ διαχέονται σε μεγάλες αποστάσεις γι' αυτό συνίσταται η επιλογή απομονωμένων πλακών καθώς και η σύντομη απομόνωση τους μετά την εμφάνιση τους.
- ❖ Η διαλογή της βιβλιοθήκης γίνεται σε δύο φάσεις. Η πρώτη διαλογή γίνεται σε μεγάλο τρυβλίο (διάμετρο 140mm), με την πλευρά της πιπέτας με τη μεγάλη διάμετρο, και οι πλάκες που απομονώνονται μένουν για 12 – 16 ώρες σε SM buffer, και έπειτα επιστρώνονται σε μικρά τρυβλία (διάμετρο 90mm) όπου και γίνεται η δεύτερη διαλογή. Η δεύτερη διαλογή, η οποία γίνεται με την πλευρά της πιπέτας με τη μικρή διάμετρο, έχει στόχο την απομόνωση της μοναδικής πλάκας που δίνει σήμα.

### **3.3.5 Απομόνωση DNA βακτηριοφάγου λ**

#### **Διαδικασία:**

- 1) Βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA' καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5ml) εμπλουτισμένο με 10mM MgSO<sub>4</sub> και 0,2% μαλτόζη.
- 2) Ποσότητα (500μl) της βακτηριακής καλλιέργειας αναμιγνύεται με τη διαχυμένη φαγική πλάκα (40μl) σε σωληνάκι τύπου erpendorf και επωάζεται σε θερμοκρασία 37 °C για 20 λεπτά.
- 3) Μέρος (300μl) του μείγματος μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όγκου 250ml, η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο LB (20ml) εμπλουτισμένο με 10mM MgSO<sub>4</sub>.
- 4) Η καλλιέργεια επωάζεται σε θερμοκρασία 37 °C έως ότου πραγματοποιηθεί η λύση των βακτηριακών κυττάρων (6 – 7 ώρες) και όταν αυτή επιτευχθεί προστίθεται χλωροφόρμιο (100μl).
- 5) Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 50ml και φυγοκεντρείται σε 8.000g για 10 λεπτά, ώστε να ιζηματοποιηθούν τα βακτηριακά υπολείμματα.
- 6) Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τα φαγικά σωματίδια, μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50ml και επωάζεται με DNάση και RNάση σε συγκέντρωση 1 μg/ml σε θερμοκρασία 37 °C για 30 λεπτά, υπό ανάδευση.
- 7) Προστίθεται στερεό NaCl σε συγκέντρωση 1M, επωάζεται σε πάγο για τουλάχιστον 1 - 2 ώρες και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 11.000g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C.
- 8) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50ml, προστίθεται PEG 8000 σε συγκέντρωση 10% w/v και επωάζεται σε πάγο για περίπου 2 ώρες.
- 9) Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 11.000g για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 4 °C, ώστε να συλλεχθούν τα φαγικά σωματίδια.
- 10) Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ο σωλήνας τύπου falcon αναστρέφεται για 2 sec προκειμένου να απομακρυνθούν και τα τελευταία υπολείμματα του υπερκείμενου.

- 11) Το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα SM (1ml), μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου eppendorf όγκου 2ml και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ήπια ανάδευση για 30 λεπτά.
- 12) Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφορμίου (1ml), ανακινείται ισχυρά και φυγοκεντρείται σε 3000g για 15 λεπτά, ώστε να απομακρυνθούν η πολυαιθυλενογλυκόλη και κυτταρικά υπολείμματα από το εναιώρημα των βακτηριοφάγων.
- 13) Το αιώρημα των βακτηριοφάγων (υδατική φάση) μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf.
- 14) Έπειτα, προστίθεται EDTA σε τελική συγκέντρωση 20 mM, SDS σε τελική 0,5% και πρωτεΐνάση K σε τελική 50 µg/ml.
- 15) Το διάλυμα επωάζεται στους 56 °C για 1 ώρα, υπό ανάδευση.
- 16) Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο.
- 17) Το φαγικό DNA κατακρημνίζεται με ισοπροπανόλη και το ίζημα αναδιαλύεται σε διάλυμα TE (200µl), που περιέχει RNάση σε συγκέντρωση 20 µg/ml.
- 18) Τέλος, αποθηκεύεται στους 4 °C.

#### Σημειώσεις:

- ❖ Η επώαση του εναιωρήματος με τις νουκλεάσες απαιτείται για την αποδόμηση των νουκλεϊκών οξέων που ελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων, ώστε να αποφευχθεί η παγίδευση των φαγικών σωματιδίων σε αυτά.
- ❖ Η προσθήκη NaCl προάγει το διαχωρισμό των φαγικών σωματιδίων από τα βακτηριακά υπολείμματα.
- ❖ Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 8000) προκαλεί την κατακρήμνιση των φαγικών σωματιδίων.

### **3.4 Υβριδοποίηση**

#### **3.4.1 Σήμανση ανιχνευτών**

Οι ανιχνευτές είναι μονόκλιωνα μόρια τα οποία έχουν καθορισμένη αλληλουχία νουκλεοτιδίων και είναι σημασμένα ώστε να μπορούν να εντοπίζονται. Η σήμανση των διάφορων τύπων ανιχνευτών (DNA, RNA ανιχνευτών) πραγματοποιείται με την προσθήκη σημασμένων δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ή ριβονουκλεοτιδίων (NTPs), εάν πρόκειται για DNA ή RNA ανιχνευτές αντίστοιχα. Τα βασικά στάδια της σήμανσης των ανιχνευτών περιλαμβάνουν την αρχική αποδιάταξη του δίκλωνου τμήματος και την επακόλουθη βαθμιαία αναδιάταξη κάθε αλυσίδας με τη βοήθεια τυχαίων εκκινητών (random primers) και την πολυμεριστική δράση του ενζυμικού κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I. Η σήμανση των μορίων DNA γίνεται με



τη συμπλήρωση των 3' υπολειμματικών άκρων του με βιοτυνιλωμένο δεοξυνουκλεοτίδιο (Biotin-11-dUTP) και με εκκινητές τυχαία δεκανουκλεοτίδια.

**Διαδικασία:**

- 1) Το DNA (100ng – 1μg) που θα σημειωθεί τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf και προστίθενται το ρυθμιστικό διάλυμα της πολυμεράσης που περιέχει τυχαία δεκανουκλεοτίδια ως εκκινητές (1x) και η ποσότητα του ddH<sub>2</sub>O που αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης (50μl).
- 2) Το μείγμα αποδιατάσσεται με θέρμανση σε θερμοκρασία 100 °C για 10 λεπτά και αμέσως τοποθετείται σε πάγο.
- 3) Προστίθενται Biotin-11-dUTP (0,035mM), μείγμα με σημασμένων νουκλεοτιδίων (dGTP, dATP, dCTP, dTTP) και η DNA Klenow πολυμεράση (5u).
- 4) Το μείγμα αναδεύεται ήπια με πιπέτα και επωάζεται σε θερμοκρασία 37 °C για 12 – 16 ώρες.
- 5) Ακολουθεί κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος σε ddH<sub>2</sub>O (50μl).

**Σημειώσεις:**

❖ Για την επαλήθευση της σήμανσης των ανιχνευτών, πραγματοποιήθηκε, πριν τη χρήση τους, spotting (δοκιμή υβριδοποίησης ανιχνευτών, σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε νάιλον μεμβράνη, χωρίς DNA και εμφάνιση της μεμβράνης, βλέπε: 3.4.4 και 3.4.5) (Εικόνα 3.2).



**Εικόνα 3.2:** Μεμβράνη από spotting δύο ανιχνευτών (18S, 28S) σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις (1μl, 3μl, 6μl).

### **3.4.2 Μεταφορά DNA σε νάιλον μεμβράνη**

Με τον όρο μεταφορά εννοούμε την ακινητοποίηση των νουκλεϊκών οξέων, αφού προηγηθεί η αποδιάταξη τους ώστε να καταστούν μονόκλινα, σε στερεό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως είναι μεμβράνες. Τα ακινητοποιημένα νουκλεϊκά οξέα, στη συνέχεια, χρησιμοποιούνται

ως «στόχοι» σε πειράματα υβριδοποίησης με τη χρήση των κατάλληλων κατά περίπτωση ανιχνευτών (Chomczynski, 1992).

**Διαδικασία:**

- 1) Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται, αφού έχει τοποθετηθεί κατά μήκος του χάρακα, ώστε να είναι δυνατή η σύγκριση του σήματος της μεμβράνης με τη φωτογραφία του πηκτώματος και κατά συνέπεια ο προσδιορισμός του τμήματος που υβριδοποιήθηκε.
- 2) Το πήκτωμα τοποθετείται σε ειδικό δοχείο και επειδή το τμήμα του DNA που εξετάζεται υπερβαίνει τις 15kb επωάζεται για 10 λεπτά υπό ανάδευση σε 0,2N HCl.
- 3) Το διάλυμα, έπειτα, αποχύνεται και το πήκτωμα ξεπλένεται με απιονισμένο H<sub>2</sub>O.
- 4) Επωάζεται σε διάλυμα αποδιάταξης σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 15 λεπτά.
- 5) Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
- 6) Προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης και το πήκτωμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανακίνηση για 20 λεπτά.
- 7) Το διάλυμα αποχύνεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 6.
- 8) Το πήκτωμα επωάζεται σε διάλυμα 6x SSC σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση για 5 λεπτά.
- 9) Η μεμβράνη με διαστάσεις λίγο μικρότερες από το πήκτωμα διαβρέχεται με απιονισμένο H<sub>2</sub>O και στη συνέχεια με διάλυμα 6x SSC και τοποθετείται πάνω από το πήκτωμα χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
- 10) Δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman διαβρέχονται με διάλυμα 6x SSC και τοποθετούνται πάνω στη μεμβράνη. Ακολουθούν ακόμη δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman (στεγνά) και τέλος απορροφητικά χαρτιά, μικρότερων διαστάσεων της μεμβράνης κατά 10mm. Στην κορυφή τοποθετείται βάρος περίπου 500gr για να εξασφαλιστεί η επαφή μεταξύ πηκτώματος και μεμβράνης.
- 11) Η μεταφορά του DNA ολοκληρώνεται μετά από 2 ώρες, οπότε αφαιρούνται τα απορροφητικά χαρτιά και τα φύλλα Whatman και σημαδεύεται η μεμβράνη ώστε να είναι γνωστός ο προσανατολισμός της και η θέση των πηγαδιών.
- 12) Η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80 °C για 2 ώρες για να σταθεροποιηθεί το DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

### **3.4.3 Μεταφορά φαγικών πλακών σε νάιλον μεμβράνη**

Η διαδικασία αποσκοπεί στη δημιουργία ενός αντιγράφου της επίστρωσης των βακτηριοφάγων.

#### **Διαδικασία:**

- 1) Το τρυβλίο που θα χρησιμοποιηθεί για τη μεταφορά των πλακών σε μεμβράνη πρέπει να παραμείνει σε θερμοκρασία 4 °C για τουλάχιστον 2 ώρες, ώστε να αποφευχθεί η μεταφορά τμημάτων της υπερκείμενης αγαρόζης στη μεμβράνη.
- 2) Η μεμβράνη, με διαστάσεις σχεδόν όσο και το τρυβλίο, τοποθετείται στην επιφάνεια του τρυβλίου κατά τέτοιο τρόπο ώστε να διαβραχεί από το κέντρο προς την περιφέρεια και χωρίς να δημιουργηθεί κενό μεταξύ υπερκείμενης αγαρόζης και μεμβράνης.
- 3) Όταν η μεμβράνη διαβραχεί πλήρως, προσανατολίζεται ως προς το τρυβλίο με τρυπήματα σε αντίστοιχα ασύμμετρα περιφερειακά σημεία της με αποστειρωμένη βελόνα ανατομίας.
- 4) Η μεμβράνη παραμένει πάνω στο τρυβλίο για 2 λεπτά και στη συνέχεια μεταφέρεται ανεστραμμένη, ώστε να μην έρθουν οι φάγοι σε άμεση επαφή, στην επιφάνεια διαλύματος αποδιάταξης για 2 λεπτά.
- 5) Ακολουθεί μεταφορά της μεμβράνης κατά τον ίδιο τρόπο σε διάλυμα εξουδετέρωσης για 5 λεπτά.
- 6) Η μεμβράνη ξεπλένεται σε διάλυμα Buffer για λιγότερο από 30 δευτερόλεπτα και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
- 7) Τέλος, η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80 °C για 2 ώρες, ώστε να σταθεροποιηθεί η πρόσδεση του DNA και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

### **3.4.4 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνη**

Η διαδικασία υβριδοποίησης των νουκλεϊκών οξέων αποτελείται από τα στάδια της προϋβριδοποίησης και της υβριδοποίησης. Το στάδιο της προϋβριδοποίησης πραγματοποιείται για την μείωση του background με την κάλυψη των ελεύθερων θέσεων της μεμβράνης (θέσεις όπου δεν υπάρχει DNA), οι οποίες θα μπορούσαν να προκαλέσουν μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή. Κατά το στάδιο της υβριδοποίησης, επιτυγχάνεται ο σχηματισμός των υβριδίων μεταξύ των νουκλεοτιδικών αλυσίδων. Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Church and Gilbert (1984).

**Διαδικασία:**

- 1) Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης, ο οποίος περιέχει ποσότητα διαλύματος υβριδοποίησης ανάλογα με το εμβαδό της (εμβαδό x 0,2 = ml διαλύματος υβριδοποίησης).
- 2) Επιπλέον, προστίθεται DNA από σπέρμα σολομού (ssDNA) σε συγκέντρωση 100μg/ml διαλύματος υβριδοποίησης, το οποίο προηγουμένως έχει θερμανθεί σε 100 °C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
- 3) Ο σωλήνας τοποθετείται σε θάλαμο υβριδοποίησης και επωάζεται περιστρεφόμενος για 2 ώρες στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή (60 °C).
- 4) Το διάλυμα υβριδοποίησης αποχύνεται και προστίθεται νέο διάλυμα υβριδοποίησης και ο ανιχνευτής (100 – 200 ng/ml διαλύματος), ο οποίος έχει πρώτα θερμανθεί σε 100 °C για 10 λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί.
- 5) Ο σωλήνας μεταφέρεται σε θάλαμο υβριδοποίησης και η υβριδοποίηση πραγματοποιείται για 14 – 16 ώρες στην ίδια θερμοκρασία με την προϋβριδοποίηση (60 °C).

**3.4.5 Εμφάνιση σήματος**

**Διαδικασία:**

- 1) Το διάλυμα υβριδοποίησης που περιέχει τον ανιχνευτή συλλέγεται σε σωλήνα τύπου falcon και διατηρείται σε θερμοκρασία -20 °C, έως ότου επαναχρησιμοποιηθεί.
- 2) Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό δοχείο, το οποίο περιέχει διάλυμα πλύσης 1 και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου, υπό ανάδευση, για 5 λεπτά.
- 3) Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 2.
- 4) Ακολουθεί επώαση σε διάλυμα πλύσης 2 υπό ανάδευση στη θερμοκρασία όπου πραγματοποιήθηκε η υβριδοποίηση (60 °C) για 20 λεπτά.
- 5) Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το βήμα 4.
- 6) Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα A για 1 λεπτό και στη συνέχεια επωάζεται σε διάλυμα B για τουλάχιστον 30 λεπτά, υπό ανάδευση.
- 7) Το διάλυμα B απορρίπτεται και προστίθεται διάλυμα B, το οποίο περιέχει 5μl συμπλόκου στρεπταβιδίνης – αλκαλικής φωσφατάσης ανά 10ml, και επωάζεται για 30 λεπτά υπό ανάδευση.
- 8) Η μεμβράνη ξεπλένεται με διάλυμα A για 15 λεπτά, υπό κίνηση, και επαναλαμβάνεται το βήμα.
- 9) Η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα C για 2 λεπτά.

- 10) Η ανίχνευση του σήματος πραγματοποιείται με κάλυψη της μεμβράνης με διάλυμα C το οποίο περιέχει 50μl NBT και 37,5μl BCIP ανά 10ml διαλύματος.
- 11) Η εμφάνιση διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με απιονισμένο H<sub>2</sub>O.

**Σημειώσεις:**

❖ Το SSC στο διάλυμα πλύσης 2 βρίσκεται σε μικρότερη συγκέντρωση σε σύγκριση με το διάλυμα πλύσης 1, διότι όσο πιο αραιή η συγκέντρωση τόσο πιο πολύ μειώνεται η ιοντική ισχύς. Όσο μειώνεται η ιοντική ισχύς τόσο πιο εύκολα αποσυνδέονται τα μόρια. Στο διάλυμα πλύσης 1 επικρατούν ήπιες συνθήκες, ώστε να συμβαίνει ελαφριά απομάκρυνση. Στο διάλυμα πλύσης 2 οι συνθήκες είναι πιο αυστηρές, ώστε η απομάκρυνση να είναι πιο «αυστηρή», δηλαδή περισσότερα μόρια αποκολλούνται από τον ανιχνευτή (μη ειδικά συνδεδεμένα).

### **3.5 Κλωνοποίηση**

Κλωνοποίηση είναι η διαδικασία δημιουργίας ενός ή περισσότερων ακριβών αντιγράφων από ένα πρότυπο. Αυτό το πρότυπο μπορεί να αντιπροσωπεύει ένα μόριο (π.χ. DNA ή RNA) ή ένα γονίδιο, ένα κύτταρο (π.χ. βακτήριο), ή ακόμη και έναν πολυκύτταρο οργανισμό. Η κλωνοποίηση αποτελείται από τη διαδικασία της σύνδεσης (ligation) και τη διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation).

#### **3.5.1 Αντίδραση σύνδεσης και Ηλεκτροδιάτρηση**

Η αντίδραση σύνδεσης πραγματοποιείται μέσω μιας διαμοριακής αντίδρασης στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού πλασμιδιακού φορέα συνδέεται με το ένα άκρο του ενθέματος με την δράση του ενζύμου DNA λιγάσης ώστε να πραγματοποιηθεί κυκλοποίηση και σχηματισμός ενός ανασυνδιασμένου πλασμιδίου (Sgaramella and Elrich, 1978). Η ηλεκτροδιάτρηση είναι μια μηχανική μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για την εισαγωγή DNA σε δεκτικά κύτταρα μέσω της κυτταρικής μεμβράνης. Κατά τη μέθοδο αυτή ηλεκτρικοί παλμοί αποδιοργανώνουν τη φωσφολιπιδιακή στοιβάδα προκαλώντας το σχηματισμό πόρων επιτρέποντας το DNA να εισέλθει στο εσωτερικό του κυττάρου (Neuman et al, 1982).

**Διαδικασία:**

- 1) Αντίδραση ligation: DNA, φορέας (50ng), buffer (1x), Ligase T<sub>4</sub> (1u) και συμπλήρωση με απιονισμένο H<sub>2</sub>O μέχρι τελικό όγκο 10μl.
- 2) Η αντίδραση τοποθετείται στη συσκευή της PCR στους 22 °C για 2,5 ώρες.

- 3) Έπειτα, γίνεται αραίωση 1/10 στην αντίδραση ligation και τοποθετούνται 2μl από την αραίωση σε erppendorf, το οποίο περιέχει κύτταρα EC.
- 4) Ακολουθεί ελαφριά ανάδευση και αφήνεται στον πάγο για 1 λεπτό.
- 5) Έπειτα, το περιεχόμενο του erppendorf το τοποθετούμε στην κυψελίδα στο κέντρο της σχισμής της και την τοποθετούμε στο μηχάνημα ηλεκτροδιάτρησης (η κυψελίδα ήταν στους -20 °C).
- 6) Ακολούθως, προστίθενται 700μl SOC, γίνεται ήπια ανάδευση και το περιεχόμενο μεταφέρεται σε αποστειρωμένο σωλήνα.
- 7) Ο σωλήνας τοποθετείται στους 37 °C για 45 λεπτά (180rpm).
- 8) Μετά την επώαση τοποθετούνται σε νέο σωληνάκι τύπου erppendorf 30μl Xgal, 3μl IptG και 150μl από το περιεχόμενο του σωλήνα που επώασαμε.
- 9) Το μείγμα αυτό τοποθετείται σε τρυβλία, τα οποία περιέχουν στερεό θρεπτικό υλικό (25-30ml σε κάθε τρυβλίο), και επωάζεται στους 37 °C για 12 ώρες.

#### Σημειώσεις:

- ❖ Ο φορέας είναι ο pbluescript T vector 60ng/μl.
- ❖ Για τον υπολογισμό των ng του ενθέματος του DNA για την αντίδραση χρησιμοποιείται η παρακάτω εξίσωση:

$$\text{ng φορέα} \times \text{kb ενθέματος} \times 3 / \text{kb φορέα (3kb)} = \text{ng ενθέματος}$$

- ❖ Όλα τα υλικά βρίσκονται στον πάγο και το SOC (θρεπτικό υλικό) ζεσταίνεται σε υδατόλουτρο πριν τη χρήση του.
- ❖ Τα βήματα 8 και 9 διεξάγονται υπό αποστειρωμένες συνθήκες.

### **3.5.2 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA**

Σκοπός αυτής της μεθόδου είναι η απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση και περιλαμβάνει: α) την ανάπτυξη βακτηριακών μακρομορίων, β) την τήρηση συνθηκών οι οποίες καταστρέφουν τα διάφορα αποικοδομητικά ένζυμα που απελευθερώνονται κατά την λύση των βακτηριακών κυττάρων και γ) το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες (Birnboim and Doly, 1979).

#### Διαδικασία:

- 1) Παρασκευή υγρού θρεπτικού υλικού και απομόνωση αποικιών από τα τρυβλία.
- 2) Διαλογή άσπρων αποικιών και τοποθέτηση τους σε σωλήνες, οι οποίοι περιέχουν υγρό θρεπτικό υλικό (3ml ο κάθε ένας), και επώαση τους στους 37 °C για 12 ώρες (180rpm).

## Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

- 3) Μετά την επώαση γίνεται ήπια ανάδευση της καλλιέργειας.
- 4) Εισαγωγή 1,5ml κορεσμένης καλλιέργειας σε σωληνάκι τύπου erpendorf.
- 5) Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 3.000rpm, απόρριψη υπερκείμενου και ξανά φυγοκέντρηση για 1 λεπτό full speed, ώστε να στερεοποιηθεί και να κολλήσει καλύτερα το ίζημα στα τοιχώματα.
- 6) Εισαγωγή 100μl παγωμένου GET σε κάθε erpendorf, ισχυρό vortex για διάλυση του ιζήματος και αφήνονται ύστερα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 7) Στη συνέχεια, τοποθετούνται στον πάγο οι σωλήνες erpendorf και σε κάθε έναν εισάγονται 200μl διαλύματος alkali, ήπια ανακίνηση και αφήνονται για 7-8 λεπτά στον πάγο.
- 8) Ακολουθεί εισαγωγή 150μl παγωμένου διαλύματος  $\text{CH}_3\text{COOK}$ , ενώ τα erpendorf βρίσκονται στον πάγο, ισχυρή ανάδευση και αφήνονται για 7-8 λεπτά στον πάγο.
- 9) Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά full speed και μεταφορά του υπερκείμενου με πιπέτα σε καθαρό σημασμένο erpendorf.
- 10) Ακολουθεί κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και αναδιάλυση σε 50μl TE-RNάση.

### Σημειώσεις:

- ❖ Για κάθε τρυβλίο επιλέγονται 3-4 αποικίες, επομένως 3-4 σωλήνες αντιστοιχούν στο κάθε ένα.
- ❖ Το διάλυμα alkali χρησιμοποιείται το πολύ για 1 μήνα μετά την αναγραφόμενη ημερομηνία παραλαβής του και προκαλεί λύση των κυττάρων.
- ❖ Το διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COOK}$  σταματά τη λύση των κυττάρων και βρίσκεται στον πάγο, όπως και τα GET και alkali.
- ❖ Από το υπόλοιπο της καλλιέργειας του βήματος 4, 850μl μαζί με 150μl γλυκερόλης (διατηρεί τα κύτταρα) τοποθετούνται σε σωληνάκια τύπου erpendorf και αποθηκεύονται στους  $-80^\circ\text{C}$ , ως stock.

## 4. ΥΛΙΚΑ

### 4.1 *PCR*

	<u>Εκκινητής</u>	<u>Αλληλουγία</u>
1	18S-5'-Rspace	5'-TAGCTCTAGAATTACCACAG-3'
2	28Sw-I.II-F	5'-AACGCCTCTAAGGTCGTATCCG-3'
3	18S (R1)	5'-CTGTCGTCGGTACGAGACCATACGATCTGC-3'
4	28S (F1)	5'-ATGCTACGTCCGTTGGATTATGCCTGAACG-3'
5	18S (R2)	5'-CTTAGATGTGGTAGCCGTTTCTCAGGCTCC-3'
6	28S (F2)	5'-AGTTACCACAGGGATAACTGGCTTGTGG-3'
7	18S (R3)	5'-TTCGTCACTACCTCCCCGAACCTGGGAGTGG-3'
8	28S (F3)	5'-TGCACAGCATTTCCTGCGTAGTACGAGAGG-3'
9	28Sw-2.1-F	5'-ACAACATCATGCAGATACC-3'
10	28Sw-2.2-R	5'-TCTTCACTTTGACATTCAGAGC-3'
11	18S-Fw	5'-GTAATTCCAGCTCCAATAGCG-3'
12	18S-Rw	5'-CAGACAAATCACTCCACGAAC-3'
13	IGS F2	5'-GTGCTGGACTGCAATGATAAATAAGG-3'
14	IGS R1	5'-AAGCATATAACTACTGGCAGGATCAACC-3'

### 4.2 *Ηλεκτροφόρηση*

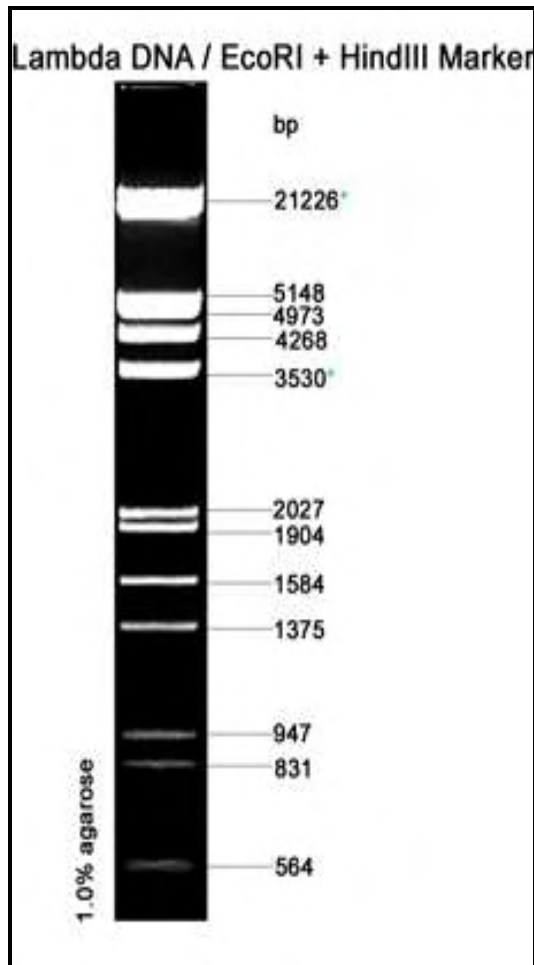
**Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5x TBE (1L):** Tris-base (54g), boric acid (27,5g), 0,5M EDTA pH 8.0 (20ml).

**Διάλυμα χρωστικής 6x:** 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικόλλη σε ddH<sub>2</sub>O.

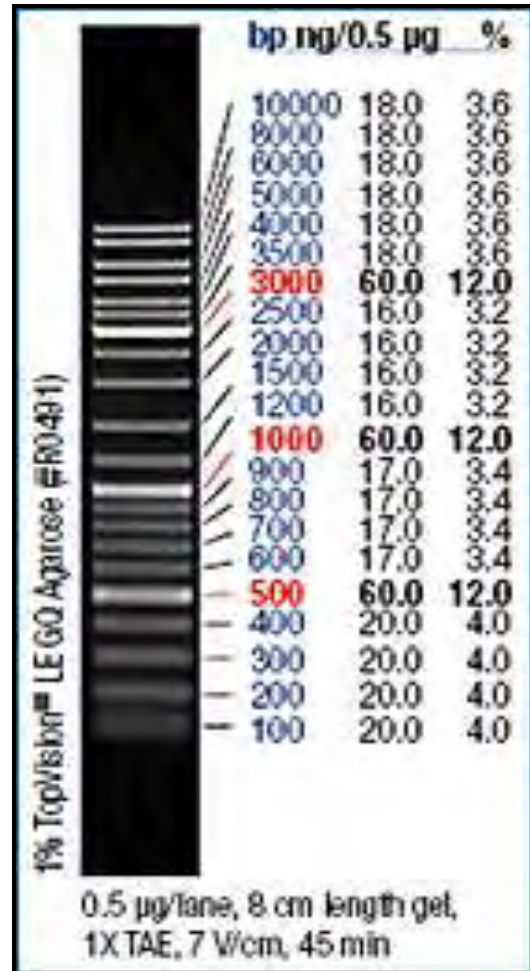
**λ ladder:** loading dye orange (1μl), lambda DNA/EcoRI + HindIII (promega) (1μl), H<sub>2</sub>O (4μl). [και χρησιμοποιώ κάθε φορά 6μl]

**ladder Generuler 333**





Εικόνα 4.1: λ ladder



Εικόνα 4.2: ladder Generuler 333

### 4.3 Βακτηριοφάγος λ

**Υγρό θρεπτικό υλικό LB:** LB Broth (0,15g/10ml), NaCl (0,05g/10ml). + Αποστείρωση

**NZY agar (1L):** NaCl (5g), MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (2g), Yeast Extract (5g), NZ amine (10g), agar (15g). + Αποστείρωση

**Top agar (1L):** NaCl (5g), MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (2g), Yeast Extract (5g), NZ amine (10g), αγαρόζη (7g). + Αποστείρωση

**SM Buffer (1L):** NaCl (5,8g), MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O (2g), Tris-HCl pH 7,5 (50ml), gelatin 2% (5ml). + Αποστείρωση

#### 4.4 Υβριδοποίηση

**Διάλυμα Buffer:** 0,2M Tris-HCl pH 7,5, 2x SSC.

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

**Διάλυμα Εξουδετέρωσης:** 0,5M Tris-HCl pH 7,5, 1,5M NaCl.

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

**Διάλυμα 50x Denhardt's:** 1% φικόλλη, 1% PVP, 1% BSA.

**Διάλυμα 20x SSC:** 0,3M κιτρικό νάτριο pH 7, 3M NaCl.

**Διάλυμα πλύσης 1:** 2x SSC, 0,1% SDS.

**Διάλυμα πλύσης 2:** 0,2x SSC, 0,1% SDS.

**Διάλυμα A:** 100mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl.

**Διάλυμα B:** Διάλυμα A, 1% Διάλυμα Blocking.

**Διάλυμα Blocking (10%):** Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη (10g) σε 100ml Διαλύματος A.

**Διάλυμα C:** 100mM Tris-HCl pH 9,5, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>.

#### 4.5 Κλωνοποίηση

**Στερεό θρεπτικό υλικό:** LB Agar (40g/1L H<sub>2</sub>O) + Αποστείρωση + Αμπικιλίνη (1μg/ml)

**Υγρό θρεπτικό υλικό:** LB Broth (15g/1L H<sub>2</sub>O), NaCl (5g/1L H<sub>2</sub>O) + Αποστείρωση + Αμπικιλίνη (1μg/ml)

**Διάλυμα GET:** 50mM glucose, 25mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA pH 8.0.

**Διάλυμα alkali:** 0,2N NaOH, 1% SDS.

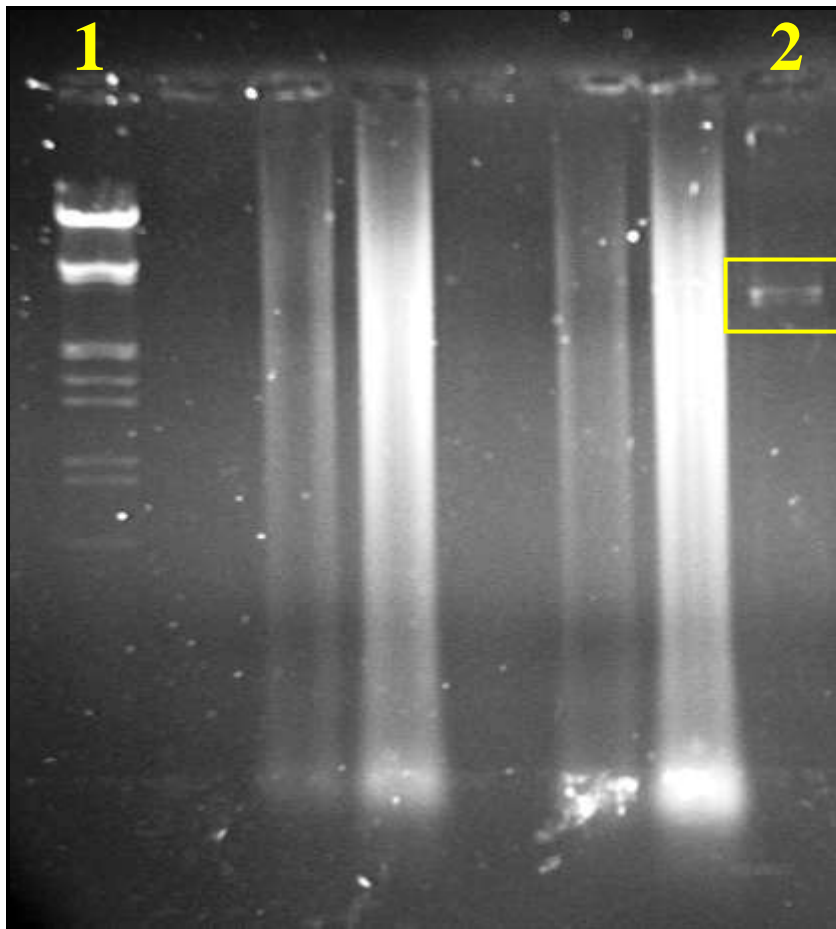
**Διάλυμα CH<sub>3</sub>COOK:** 5M potassium acetate (60ml), glacial acetic acid (11,5ml)

Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 5.1 *Ενίσχυση του IGS σε γονιδιωματικό DNA δάκου με PCR*

Για την ενίσχυση του IGS, πραγματοποιήθηκαν πολλές long PCR και απλές PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα γονιδιωματικό DNA, απομονωμένο από πολλά ενήλικα άτομα δάκου. Χρησιμοποιήθηκαν 5 ζεύγη εκκινητών (1-8, 13-14, βλέπε Υλικά), έγιναν αρκετές μετατροπές στο αρχικό πρόγραμμα της PCR (βλέπε Μέθοδοι 3.1.1 και 3.1.2) και ελέγχθηκαν 5 διαφορετικά ένζυμα (Fermentas, Biolabs, Ranger, High Fidelity και Phusion). Η PCR που πραγματοποιήθηκε με το ζεύγος εκκινητών 18S (R2) / 28S (F2) και με την Taq πολυμεράση της Biolabs, έδωσε μία ζώνη η οποία, με βάση τη σύγκριση με το ladder, έχει μέγεθος ~4kb (Εικόνα 5.1). Αυτό το μέγεθος του IGS, είναι αναμενόμενο σύμφωνα με τις βάσεις δεδομένων συγγενικών αρθροπόδων (π.χ. *Drosophila melanogaster*: 3,3 – 11,6 kb).



Εικόνα 5.1: Διαδρομές: 1. λ ladder, 2. PCR product-γονιδιωματικό DNA δάκου.

Στη συνέχεια ακολούθησε απομόνωση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης, κλωνοποίηση και αλληλούχηση του τμήματος που ενισχύσαμε, χωρίς όμως κάποιο επιθυμητό αποτέλεσμα.

## **5.2 Απομόνωση και επεξεργασία της δομής του rDNA**

### **5.2.1 Δημιουργία ανιχνευτών**

Για τη δημιουργία ανιχνευτών, πραγματοποιήθηκε PCR με τα ζεύγη εκκινητών 18S-Fw / 18S-Rw και 28Sw-2.1-F / 28Sw-2.2-R των οποίων τα προϊόντα αποτελούν τις περιοχές 18S και 28S αντίστοιχα. Στη συνέχεια, τα προϊόντα αυτά σημάνθηκαν με τη μέθοδο που προαναφέρθηκε (Μέθοδος 3.4.1).

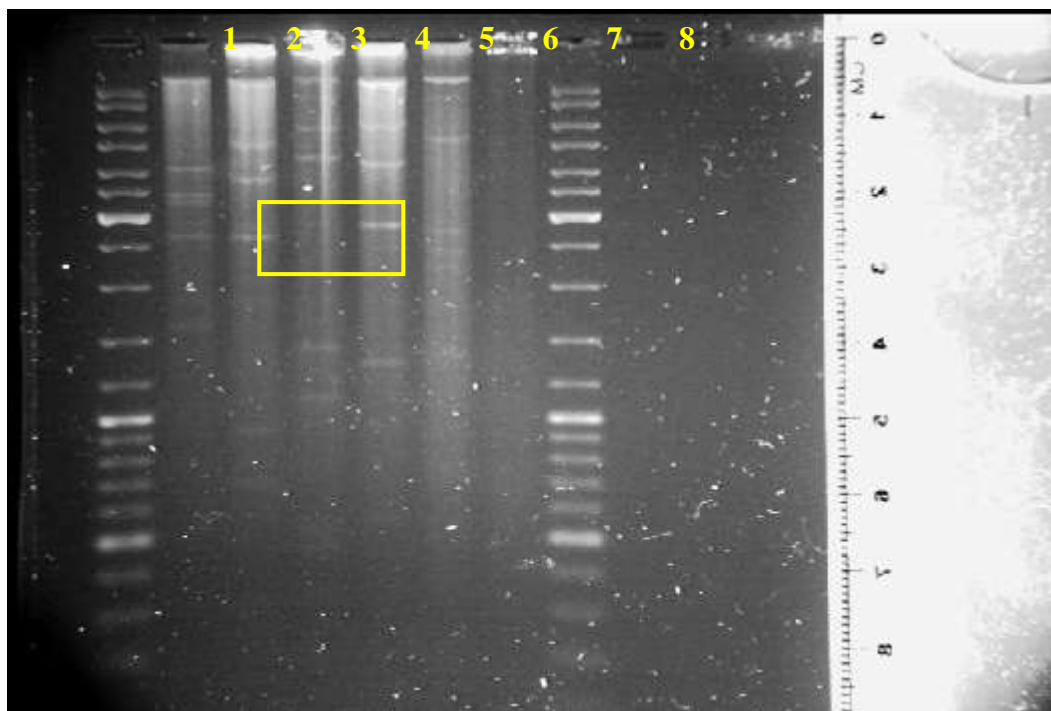
### **5.2.2 Διαλογή φαγικής βιβλιοθήκης**

Η τιτλοδότηση της φαγικής βιβλιοθήκης έδωσε ως αποτέλεσμα  $2,4 \times 10^5$  rfu/ml. Σε τρυβλίο επιστρώθηκαν 2 μl από την αραιώση  $10^{-1}$  της αρχικής συγκέντρωσης, επομένως η διαλογή διεξάχθηκε σε 4.800-5.200 ανασυνδυασμένους φάγους. Τα αποτελέσματα της πρώτης διαλογής ήταν: 6 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 18S και 5 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 28S. Τα αποτελέσματα της δεύτερης διαλογής ήταν: 4 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 18S και 10 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 28S. Οι πλάκες επεξεργάστηκαν καταλλήλως και έγινε εξαγωγή DNA από τους φάγους.

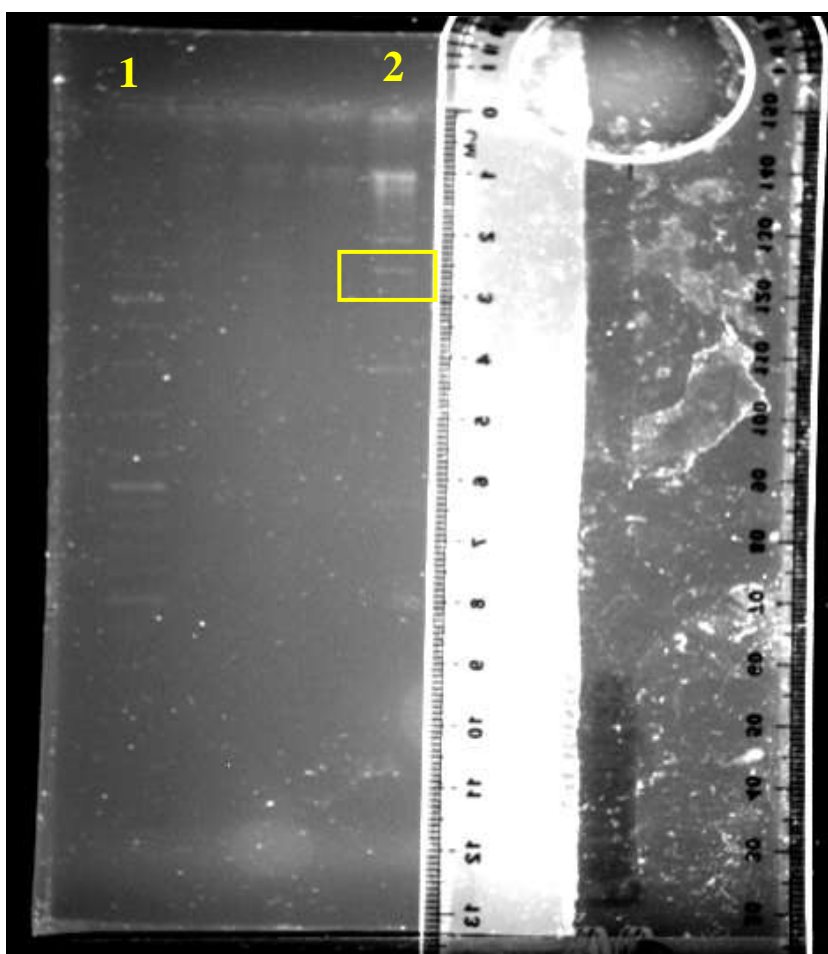
### **5.2.3 Επεξεργασία της δομής του rDNA**

Για την επεξεργασία και την ανάλυση του περιεχομένου των φάγων που απομονώθηκαν και τον εντοπισμό του IGS, έγιναν διπλές πέψεις με τα ένζυμα περιορισμού EcoRI και HindIII. Τα προϊόντα των πέψεων ηλεκτροφορήθηκαν (overnight στα 20V) (Εικόνα 5.2α, 5.2β) και μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη, η οποία υβριδοποιήθηκε με τους ανιχνευτές 18S και 28S (Εικόνα 5.3α, 5.3β). Κατά την υβριδοποίηση με τους ανιχνευτές, σήμα εμφανίστηκε μόνο στις διαδρομές 2 και 3 (Εικόνα 5.2α) από τον 18S ανιχνευτή, και στη διαδρομή 2 (Εικόνα 5.2β) από τον 28S ανιχνευτή. Έπειτα, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από το πήκτωμα της αγαρόζης, κλωνοποίηση των τμημάτων και ξανά υβριδοποίηση για επαλήθευση της κλωνοποίησης, η οποία όμως ήταν ανεπιτυχής.

Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς



**Εικόνα 5.2α:** Προϊόντα διπλής πέψης. Διαδρομές: 2, 3, 4, 5, 6, 7 φαγικά DNA και 1, 8 ladder *Generuler 333*.

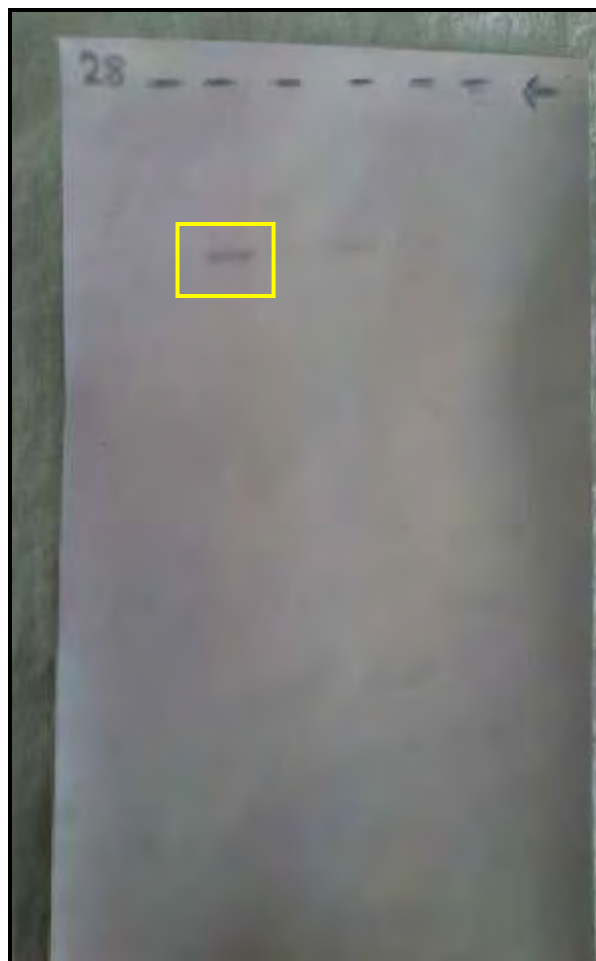


**Εικόνα 5.2β:** Προϊόντα διπλής πέψης. Διαδρομές: 1 ladder *Generuler 333* και 2 φαγικό DNA.

Ανάλυση της οργάνωσης του ριβοσωμικού RNA του δάκου της ελιάς



Εικόνα 5.3α: Μembrάνη με 18S.



Εικόνα 5.3β: Μembrάνη με 28S.

<u>Αιγνευτής</u>	<u>Σήμα σε φάγους</u>
18S	18S <sub>1</sub> , 18S <sub>2</sub>
28S	28S <sub>3</sub> , 5

## 6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος (*Bactocera oleae*) είναι ο κυριότερος εχθρός της ελιάς. Προσβάλλει αποκλειστικά τους καρπούς της ελιάς και προκαλεί απώλεια στη συγκομιδή ~ 30%. Εμφανίζεται σε όλη την περιοχή της Μεσογειακής λεκάνης, εκτείνεται ανατολικά της Μέσης Ανατολής μέχρι τις περιοχές του Πακιστάν, καθώς επίσης και στη νότια Αφρική, τα Κανάρια νησιά και την Καλιφόρνια, όπου υπάρχουν ελαιόδεντρα. Η καταπολέμηση του δάκου, μέχρι σήμερα, δεν έχει καταστεί εφικτή αφού οι μέθοδοι που ακολουθούνται είναι επιβλαβείς και αναποτελεσματικές. Έχει γίνει προσπάθεια για μοριακή προσέγγιση της καταπολέμησής του, αλλά ακόμη δεν υπάρχει κάποια εφικτή και επιτυχής μέθοδος.

Η κατανόηση της προέλευσης των πληθυσμιακά διακριτών ομάδων *B. oleae*, αλλά και υποειδών του είδους, η σύγκριση αυτών μεταξύ τους και οι φυλογενετικές συγκρίσεις με άλλα συγγενικά είδη, είναι απαραίτητες προϋποθέσεις για την ανάπτυξη ενός πλάνου καταπολέμησης του εντόμου. Για να είναι αυτή η μέθοδος εφικτή, απαιτείται η εύρεση διαγνωστικών δεικτών, ως εργαλεία για τη γρήγορη και εύκολη ταυτοποίηση των υποειδών.

Το IGS φαίνεται να είναι μία κατάλληλη περιοχή για την εξαγωγή διαγνωστικών δεικτών. Η περιοχή αυτή εκτείνεται από το 3' άκρο του 28S rRNA γονιδίου έως την αρχή του ETS και αποτελείται κυρίως από μοναδικές αλληλουχίες, στα 5' και 3' άκρα του, και από μία ή περισσότερες ομάδες εσωτερικών επαναλήψεων, στο εσωτερικό του. Αυτές οι εσωτερικές επαναλήψεις μπορούν να κυμαίνονται, σε μήκος, από μερικές δεκάδες σε πολλές εκατοντάδες bp, δημιουργώντας, έτσι, πολυμορφισμούς μήκους. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και οι πολυμορφισμοί μήκους, σε συνδυασμό με το γρήγορο ρυθμό εξέλιξής του, καθιστούν το IGS άριστο υποψήφιο για την αναζήτηση διαγνωστικών δεικτών στο δάκο.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, έγινε PCR μεγάλου μήκους για την ενίσχυση του διαγονιδιακού διαστήματος (IGS) με εκκινητές εκατέρωθεν αυτού και εντός των 18S και 28S περιοχών. Ακολούθησε απομόνωση DNA από το πήκτωμα αγαρόζης και κλωνοποίηση του τμήματος που ενισχύθηκε. Στη συνέχεια, έγινε προσπάθεια αλληλούχησης του κομματιού, όμως πραγματοποιήθηκε μόνο για τις αλληλουχίες των εκκινητών. Η αδυναμία αλληλούχησης του τμήματος που ενισχύθηκε με την PCR οφείλεται πιθανότατα στην αδυναμία κλωνοποίησης του. Κατά τη διαδικασία της κλωνοποίησης είναι πιθανό να μην έγινε η ένθεση της αλληλουχίας στον πλασμιδιακό φορέα λόγω μεγάλου μήκους αυτής ή να κλωνοποιήθηκαν μη ειδικές (non specific) αλληλουχίες.

Λόγω της αδυναμίας εμφάνισης αποτελεσμάτων, πραγματοποιήθηκε διαλογή φαγικής γονιδιοματικής βιβλιοθήκης με στόχο τον εντοπισμό του IGS. Η διαλογή έδωσε 4 πλάκες που έδωσαν



σήμα με τον ανιχνευτή 18S και 10 πλάκες που έδωσαν σήμα με τον ανιχνευτή 28S. Από αυτές επιλέχθηκαν και οι 4 με το 18S και 3 με το 28S και έγινε απομόνωση DNA. Ακολούθησαν διπλές πέψεις και μεταφορά σε μεμβράνη του προτύπου της ηλεκτροφόρησης, έτσι ώστε να υβριδοποιηθεί με τους αντίστοιχους ανιχνευτές 18S και 28S. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε κλωνοποίηση των τμημάτων που έδωσαν σήμα κατά την υβριδοποίηση. Για τον έλεγχο των κομματιών που κλωνοποιήθηκαν έγιναν διπλές πέψεις και ξανά υβριδοποίηση με τους αντίστοιχους ανιχνευτές. Το αποτέλεσμα της υβριδοποίησης ήταν αρνητικό, δηλαδή δεν εμφανίστηκε σήμα. Ως απόρροια αυτού του αποτελέσματος, συμπεραίνεται ότι δεν πραγματοποιήθηκε η κλωνοποίηση των τμημάτων, όπως ακριβώς έγινε και με τα αποτελέσματα της PCR μεθόδου.

Επομένως, η απομόνωση, η αλληλούχηση και η ανάλυση του IGS προ εύρεση διαγνωστικών δεικτών είναι τα επόμενα βήματα που πρέπει να επαναληφθούν, ώστε να γίνει κατανοητή η προέλευση και ο τρόπος εξάπλωσης των πληθυσμών του *Bactocera oleae* και των υποειδών του. Το IGS είναι ίσως η πιο κατάλληλη περιοχή όσον αφορά την πληροφορία που μπορεί να παρέχει για τη δημιουργία αυτών των διαγνωστικών δεικτών.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- **Appel DJ, Gordon TR. (1996).** Relationships among pathogenic and non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* based on the partial sequence of the intergenic spacer region of the ribosomal DNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 9:125-138.
- **Baura G, Szaro TM, Bruns TD. (1992).** *Gastrosuillus laricinus* is a recent derivative of *Suillus grevillei*: molecular evidence. *Mycologia*, 84:592-597.
- **Bavykin G. Sergei, Lysov P. Yuri, Zakhariyev Vladimir, Kelly J. John, Jackman Joany, Stahl A. David, Cherni Alexey. (2004).** Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and gyrB Gene Sequence Analysis to Determine Phylogenetic Relationships of Bacillus cereus Group Microorganisms. *Journal of Clinical Microbiology*, p.3711-3730.
- **Berg D. E., Howe M. M. (1989).** Mobile DNA (Am. Soc. Microbiol., Washington).
- **Bigot Yves, Lutcher Françoise, Hamelin Marie-Hélène, Périquet Georges. (1992).** The 28S ribosomal RNA-encoding gene of Hymenoptera: inserted sequences in the retrotransposon-rich regions. *Gene*, 121:347-352.
- **Black C. William IV, Denson K. McLain and Karamjit S. Rai. (1989).** Patterns of Variation in the rDNA Cistron Within and Among World Populations of a Mosquito, *Aedes albopictus* (Skuse). *Genetics*, 121:539-550.
- **Boeke J. D., Corces V. G. (1989).** Transcription and Reverse Transcription of Retrotransposons. *Annu. Rev. Microbiol.*, 43:403-434.
- **Brown W. James, NC State University.** Molecular phylogenetic analysis using ribosomal RNA (rRNA). 1-14.
- **Browne M. J., Read C. A., Roiha H., Glover, D. M. (1984).** *Nucleic Acids Research*, 12:9111-9122.
- **Bruns TD, White TJ, Taylor JW. (1991).** Fungal molecular systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 22:525-564.
- **Caputo B., Santolamazza F., Vicente J. L., Nwakanma D. C., Jawara M., Palsson K., Jaenson T., White B. J., Manchini E., Petrarca V., Conway D. J., Besansky N. J., Pinto J., della Torre A. (2011).** The “Far-West” of *Anopheles gambiae* Molecular Forms. *PLoS ONE*, 6(2):e16415.
- **Chen Y. C., Eisner J. D., Kattar M. M., Rassouljian-Barrett S. L., LaFe K., Yarfitz S. L., Limaye A. P., Cookson B. T. (2000).** Identification of Medically Important Yeasts

Using PCR-Based Detection of DNA Sequence Polymorphisms in the Internal Transcribed Spacer 2 Region of the rRNA Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, 6:2302-2310.

- **Chomczynski P. (1992).** Solubilization of formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Sciences*, 81:1991-3792.
- **Church G. M., Gilbert W. (1984).** Genomic sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81:1991-1995.
- **Ciaro D. E., Schär G., Böttger E. C., Altwegg M., Bosshard P. P.** [http://jcm.asm.org/content/44/1/77.abstract?ijkey=d4ac999dc9c11813f0c0e4a13079ec248bc9d3cc&keytype2=tf\\_ipsecsha-aff-1](http://jcm.asm.org/content/44/1/77.abstract?ijkey=d4ac999dc9c11813f0c0e4a13079ec248bc9d3cc&keytype2=tf_ipsecsha-aff-1). (2006). Internal Transcribed Spacer Sequencing versus Biochemical Profiling for Identification of Medically Important Yeasts. *Journal of Clinical Microbiology*, 1:77-84.
- **Ciganda Martin, Noreen Williams. (2011).** Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. 2 (4):523-533.
- **Cluster PD, Marinkovic D, Allard RW, Ayala FJ. (1987).** Correlations between development rates, enzyme activities, ribosomal DNA spacer-length phenotypes, and adaptation in *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 84:610-614.
- **Coen, E. S., T. Strachan, G. A. Dover. (1982a).** Dynamics of concerted evolution of ribosomal DNA and histone gene families in the melanogaster species subgroup of *Drosophila*. *J. Mol. Biol*, 158:17–35.
- **Coen, E. S., J. M. Thoday, G. A. Dover. (1982b).** Rate of turnover of structural variants in the rDNA gene family of *Drosophila melanogaster*. *Nature*, 295:564–568.
- **Coen, E. S., G. A. Dover. (1983).** Unequal exchanges and the coevolution of X and Y rDNA arrays in *D. melanogaster*. *Cell*, 73:849–855.
- **Cullings KW, Szaro T, Bruns TD. (1996).** Evolution of extreme specialization within a lineage of ectomycorrhizal epiparasites. *Nature*, 379:63-66.
- **Cullings KW. (1994).** Molecular phylogeny of the Monotropeoideae (Ericaceae) with a note on the placement of the Pyroloideae. *Journal of Evolutionary Biology*, 7:501-516.
- **Dawid I. B., Rebbert M. L. (1981).** *Nucleic Acids Research*, 9:5011-5020.
- **Delanversin G., Jacq B. (1983).** C. R. Acad. Sc. Paris 296, Série III, 1041-1044.
- **Dover G. A. (1993).** The evolution of genetic redundancy for advanced players. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 3:902–910.
- **Drancourt Michel, Bollet Claude, Carliz Antoine, Martelin Rolland, Gayral Jean-Pierre, Raoult Didier. (2000).** 16S Ribosomal DNA Sequence Analysis of a Large Collection of

Environmental and Clinical Unidentifiable Bacterial Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 10:3623-3630.

- **Evrard, J. L., Kuntz, M., Weil, J. H. (1990).** The nucleotide sequence of five ribosomal protein genes from the *Cyanophora paradoxa*: implications concerning the phylogenetic relationship between Cyanelles and chloroplasts. *Journal of Molecular Evolution*, 30:16-25.
- **Fujiwara Haruhiko, Ishikawa Hajime. (1986).** Molecular mechanism of introduction of the hidden break into the 28S rRNA of insects: implication based on structural studies. *Nucleic Acids Research*, 16:6393-6401.
- **Gillespie J. J., Johnston J. S., Cannone J. J. and Gutell R. R.. (2006).** Characteristics of the nuclear (18S, 5.8S, 28S and 5S) and mitochondrial (12S and 16S) rRNA genes of *Apis mellifera* (Insecta: Hymenoptera): structure, organization, and retrotransposable elements. *Insect Molecular Biology*, 15(5):657-686.
- **Gillings M. R., R. Frankham, J. Speirs, M. Whalley. (1987).** X-Y exchange and the coevolution of the X and Y rDNA arrays in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 116:241–251.
- **Gonzalez-Barrera S., Garcia-Rubio M., Aguilera A. (2002).** Transcription and double-strand breaks induce similar mitotic recombination events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 162:603-614.
- **Gorokhova E, Dowling TA, Crease T, Weider LJ, Elser JJ. (2002).** Functional and ecological significance of rDNA IGS variation in a clonal organism under divergent selection for production rate. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 269: 2373-2379.
- **Grimaldi G, Di Nocera PP. (1988).** Multiple repeated units in *Drosophila melanogaster* ribosomal DNA spacer stimulate rRNA precursor transcription. *PNAS*, 85:5502-5506.
- **Grimaldi G, Fiorentini P, Di Nocera PP. (1990).** Spacer promoters are orientation-dependent activators of pre-rRNA transcription in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol*, 10:4667-4677.
- **Hall Leslie, Wohlfiel Sherri, Roberts D. Glenn**  
[http://jcm.asm.org/content/42/2/622.abstract?ijk ey=2fbde5266eba507bb43d2df385b2dc6169fd4a5c&keytype2=tf\\_ipsecsha - aff-1](http://jcm.asm.org/content/42/2/622.abstract?ijk ey=2fbde5266eba507bb43d2df385b2dc6169fd4a5c&keytype2=tf_ipsecsha - aff-1). (2004). Experience with the MicroSeq D2 Large-Subunit Ribosomal DNA Sequencing Kit for Identification of Filamentous Fungi Encountered in the Clinical Laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*, 2:622-626.
- **Hershkovitz MA, Lewis LA. (1996).** Deep-level diagnostic value of the rDNA-ITS region. *Molecular Biology and Evolution*, 13:1276-1295.

- **Ishikawa H. (1977).** *Comparative Biochemistry and Physiology* 56B:229-234.
- **Ishikawa H., Newburgh, R. W. (1972).** *Journal of Molecular Biology*, 64:135-144.
- **Ishikawa H. (1977).** Evolution of ribosomal RNA. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 58(1 B):1 -7.
- **Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. (2002).** Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *40(1):87-109.*
- **Jakubczak J.L., Xiong Y., Eickbush T.H. (1990).** Type I (RI) and type II (RII) ribosomal DNA insertions of *Drosophila melanogaster* are retrotransposable elements closely related to those of *Bombyx mori*. *Journal of Molecular Biology*, 212:37-52.
- **Jakubczak J.L., Burke D. W., Eickbush H. T. (1991).** Retrotransposable elements R1 and R2 interrupt the rRNA genes of most insects. *pp. 3295-3299.*
- **Jamrich M., Miller O. L. (1984).** *EMBO J.*, 3:1541-1545.
- **Janda J. Michael <http://jcm.asm.org/content/45/9/2761.full> - aff-1, Sharon L. Abbott. (2007).** 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 9:2761-2764.
- **Jorgenson RD, Cluster PD. (1988).** Modes and tempos in the evolution of nuclear ribosomal DNA: new characters for evolutionary studies and new markers for genetic and population studies. *Annals of the Missouri Garden*, 75:1238-1247.
- **Kerrebrock A. W., Srivastava R., Gerbi S. A. (1989).** *J.Mol. Biol.*, 210:1-13.
- **Kidd S. J., Glover D. M. (1981).** *J. Mol. Biol.*, 151:645-662.
- **Kimihiko Ogino, Hiroko Eda-Fujiwara, Haruhiko Fujiwara, Hajime Ishikawa. (1990).** What causes the aphid 28S rRNA to lack the hidden break? *Journal of Molecular Evolution*, 509-513.
- **Klappenbach A. Joel, Saxman R. Paul, Cole R. James, Schmidt M. Thomas. (2001).** rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Research*, 1:181-184.
- **Kössel H., Natt E., Strittmatter G., Fritzsche E., Gozdizicka-Jozefiak A., Przybyl D. (1985)** in *Molecular Form and Function of the Plant Genome*, van Vioten-Doting, L. Groot, G. S. P., Hall T. C. (Eds), Plenum Publishing Co., pp.183-198.
- **Lieb M. (1953).** Studies on lysogenation in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 18:71-73.
- **Loening UE. (1968).** Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution. *Journal of Molecular Biology*, 38 (3):355-365.

- **Maidak BL, Olsen GJ, Larsen N, Overbeek R, McCaughey MJ, Woese CR. (1997).** The RDP (Ribosomal Database Project). *Nucleic Acids Research*, 25:109-110.
- **Melen GJ, Pesce CG, Rossi MS, Kornblihtt AR. (1999).** Novel processing in a mammalian nuclear 28S pre-rRNA: Tissue-specific elimination of an 'intron' bearing a hidden break site. *EMBO Journal* 18(11):3107-3118.
- **Moss T, Stefanovsky VY. (1995).** Promotion and regulation of ribosomal transcription in eukaryotes by RNA polymerase I. *Nucleic Acids Research*, 50:25-66.
- **Musters Wouter, Boon Kathy, Carine A.F.M. van der Sande, Harm van Heerikhuizen, Planta J. Rubi. (1990).** Functional analysis of transcribed spacers of yeast ribosomal DNA. *EMBO Journal*, 12 pp. 3989-3996.
- **Neuman E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. (1982).** Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO* 1:841-845.
- **Oechsler A. Rafael, Feilmeier R. Michael, Ledee R. Dolena, Miller Darlene, Diaz R. Mara, Fini M. Elizabeth, Fell W. Jack, Alfonso C. Eduardo. (2009).** Utility of Molecular Sequence Analysis of the ITS rRNA Region for Identification of *Fusarium* spp. From Ocular Sources. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 5:2230-2236.
- **Petti C. A., Polage C. R., Schreckenberger P. (2005).** The Role of 16S rRNA Gene Sequencing in Identification of Microorganisms Misidentified by Conventional Methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 12:6123-6125.
- **Polanco Carlos, González I. Ana, Álvaro de la Fuente, Dover A. Gabriel. (1998).** Multigene Family of Ribosomal DNA in *Drosophila melanogaster* Reveals Contrasting Patterns of Homogenization for IGS and ITS Spacer Regions: A Possible Mechanism to Resolve This Paradox. *Genetics*, 149:243-256.
- **Prokopowich D. Cheryl, Gregory T. Ryan, Crease J. Teresa. (2002).** The correlation between rDNA copy number and genome size in eukaryotes. *Genome*, 46: 48-50.
- **Reller L. Barth, Section Editor and Weinstein P. Melvin, Section Editor Petti A. Cathy. (2007).** Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clinical Infectious Diseases*, 44 (8):1108-1114.
- **Roiha H., Miller J. R., Woods L. C., Glover D. M. (1981).** *Nature (London)*, 290:749-753.
- **Schwartz M. (1967).** Sur l'existence chez *Escherichia coli* K12 d'une régulation commune à la biosynthesis des récepteurs du bactériophage  $\lambda$  et au métabolisme du maltose. *Annales de l'Institut Pasteur*, 113:685-704.

- **Schwarz Patrick, Bretagne Stéphane, Gantier Jean-Charles, Garcia-Hermoso Dea, Lortholary Olivier, Dromer Françoise, Dannaoui Eric. (2006).** Molecular Identification of Zygomycetes from Culture and Experimentally Infected Tissues. *Journal of Clinical Microbiology*, 2:340-349.
- **Sgaramella V, Elrich SD. (1978).** Use of T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. *Eur J Biochem* 86:531-537.
- **Shine J., Dalgarno L. (1973).** Occurrence of heat-dissociable ribosomal RNA in insects: The presence of three polynucleotide chains in 26S RNA from cultured *Aedes aegypti* cells. *Journal of Molecular Biology* 75(1):57-72.
- **Smit S., Widmann J., Knight R. (2007).** Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. *Nucleic Acids Research*, 35 (10):3339-3354.
- **Szmelcam S, Hofnung M. (1975).** Maltose transport in *Escherichia coli* K12: Involvement of the bacteriophage lambda receptor. *The Journal of Bacteriology*, 124:112-118.
- **Tautz D., C. Tautz, D. Webb, G. A. Dover. (1987).** Evolutionary divergence of promoters and spacers in the rDNA family of four *Drosophila* species: implications for molecular coevolution in multigene families. *J. Mol. Biol*, 195:525–542.
- **Van Etten RA, Walberg MW, Clayton DA. (1980).** Precise localization and nucleotide sequence of the two mouse mitochondrial rRNA genes and three immediately adjacent novel tRNA genes. *Cell*, 22:157-170.
- **Vogler DR, Bruns TD. (1998).** Phylogenetic relationships among the pine stem rust fungi (*Cronatrium* and *Peridermium* spp.). *Mycologia*, 90:244-257.
- **Ware V. C., Renkawitz R., Gerbi S. A. (1985).** *Nucleic Acids Research*, 13:3581-3597.
- **Weider LJ, Glenn KL, Kyle M, Elser JJ. (2004).** Associations among ribosomal (r)DNA intergenic spacer length, growth rate, and C:N:P stoichiometry in the genus *Daphnia*. *Limnology and Oceanography*, 49:1417-1423.
- **Weisburg G. William, Barns M. Susan, Pelletier A. Dale, Lane J. David. (1991).** 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *Journal of Bacteriology*, p.697-703.
- **Williams S. M., G. R. Furnier, E. Fuog, C. Strobeck. (1987).** Evolution of the ribosomal DNA spacers of *Drosophila melanogaster*: different patterns of variation on X and Y chromosomes. *Genetics*, 116:225–232.
- **Winnebeck C. Eva, Millar D. Craig, Warman R. Guy. (2010).** Why does insect RNA look degraded? *Journal of Insect Science*, 10:159.

- **Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. (2008).** Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (10):908-34.
- **Xiong Y., Eickbush T. H. (1988).** *Mol. Biol. Evol.*, 5:675-690.
- **Xiong Y., Eickbush T. H. (1990).** *EMBO. J.*, 9:3353-3362.
- **Xiong Y., Burke W. D., Jakubczak J. L., Eickbush T. H. (1988).** *Nucleic Acids Research*, 16:10561-10573.
- **Ye J., Pérez-González C. E., Eickbush D.G., Eickbush T.H. (2005).** Competition between R1 and R2 transposable elements in the 28S rRNA genes of insects. *Cytogenet Genome*, 110:299-306.