



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Διπλωματική εργασία

Φυλοειδική διάγνωση στο δάκο της ελιάς

Bactrocera oleae



ΑΛΕΞΑΝΔΡΗ ΧΡΥΣΑΝΘΗ

Λάρισα 2012

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- **ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

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

- **ΜΑΜΟΥΡΗΣ ΖΗΣΗΣ**

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

- **ΑΥΓΟΥΣΤΙΝΟΣ ΑΝΤΩΝΙΟΣ**

Διδάσκων ΠΔ407/80

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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 κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο για την ανάθεση του θέματος αυτής της προπτυχιακής διατριβής, τη συνεχή καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές του στον προγραμματισμό και την εκτέλεση των πειραμάτων.

Ευχαριστίες εκφράζονται επίσης προς την υποψήφια διδάκτορα κ. Σαγρή Έφη και την μεταπτυχιακή φοιτήτρια κ. Γρηγορίου Μαριαλένα για την υποστήριξη και βοήθειά τους σε όλη τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς επίσης και για τις χρήσιμες και παραγωγικές συζητήσεις για θέματα της διατριβής.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τους σπουδαστές κ. Κοσκινιώτη Γιώτα, κ. Μανούση Αναστασία, κ. Παπακρίβου Βάσω, κ. Mitra Moezour, και κ. Σταυρόπουλο Κώστα για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τη φίλη μου Αναστασία Μανούση για την πολύτιμη ηθική της υποστήριξη για την ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Τέλος ένα ευχαριστώ αξίζει στην οικογένειά μου για την υποστήριξη και συμπαράσταση που μου προσφέρουν.

Περιεχόμενα

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1. Μοριακοί δείκτες	7
1.1 Κατηγορίες μοριακών δεικτών.....	7
1.2 Χρονολογική εξέλιξη των μοριακών δεικτών σε επίπεδο DNA.....	8
1.3 Χαρακτηριστικά των μοριακών δεικτών	10
1.4 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)	11
1.5 Πλεονεκτήματα & Μειονεκτήματα των δεικτών RAPDs.....	12
1.6 Εφαρμογές της τεχνικής RAPD στα έντομα	13
1.7 Sequence Characterized Amplified Region (SCAR).....	13
2. Φυλοειδική διάγνωση στα έντομα	14
2.1 Φυλοειδική διάγνωση στο δάκο της ελιάς	15
3. Συμβατικές και Μη μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου της ελιάς	15
4. Συμβιωτικές σχέσεις.....	17
4.1 Συμβιωτικές σχέσεις εντόμων με βακτήρια.....	17
4.2 Συμβιωτικά βακτήρια του δάκου της ελιάς, <i>Bactrocera oleae</i>	18
4.3 Παραλλαγές στις συμβιωτικές σχέσεις μέσα στο είδος <i>Bactrocera oleae</i>	19
Σκοπός.....	22
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
1. Πέψη πλασμιδιακού DNA	23
2. Απομόνωση DNA.....	25
2.1 Απομόνωση DNA με υγρό άζωτο	25
2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα <i>Bactrocera oleae</i> (Fly preps)	26
Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini Prep)	27
Απομόνωση DNA από πήκτωμα ηλεκτροφόρησης (Gel Extraction).....	28
3. Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων	29
3.1 Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο Σφάλμα! Δεν έχει οριστεί σελιδοδείκτης.	30
3.2 Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με ισοπροπανόλη	30
3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).....	31

RAPDs -PCR	33
re-PCR	35
SCAR- PCR	35
3.7 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς	36
4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων	42
4.1 Με χρήση φασματοφωτόμετρου	42
4.2 Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης	42
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	45
Απομόνωση γονιδιωματικού DNA	46
PCR-RAPDs	46
re-PCR	49
Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation)	51
Κλωνοποίηση	53
Αποτελέσματα αλληλούχισης	54
Δημιουργία δείκτη SCAR	55
Συζήτηση	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	59

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.Μοριακοί δείκτες

Η μελέτη των φαινοτυπικών (μορφολογικών) χαρακτηριστικών δεν είναι ικανή από μόνη της να διαμορφώσει μία αξιόπιστη και σφαιρική εικόνα για τις φυλογεντικές, βιογεωγραφικές και ταξινομικές σχέσεις μεταξύ των διαφόρων ειδών και πληθυσμών. Επίσης ο φαινότυπος ενός ατόμου δεν αποτελεί μόνιμο χαρακτήρα του οργανισμού καθώς εξαρτάται από το φύλο, την ηλικία και από ποικίλους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Η φαινοτυπική ποικιλότητα δεν αντικατοπτρίζει τη γονοτυπική ποικιλομορφία (Daniel L. Hartl, 2011; Milee Agarwal et al. 2007). Για τους λόγους αυτούς το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στους μοριακούς δείκτες, οι οποίοι, έχουν τη δυνατότητα να απαντούν σε βιολογικά ερωτήματα που δύσκολα αντιμετωπίζονται με άλλες μεθόδους.

Αρκετοί ορισμοί έχουν δοθεί προκειμένου να περιγράψουν με όσο το δυνατό μεγαλύτερη ακρίβεια τους μοριακούς δείκτες. Σύμφωνα με τον Paul Sunnucks (2000), οι μοριακοί δείκτες είναι τμήματα DNA που παρουσιάζουν συγκεκριμένο πρότυπο κληρονόμησης και απαντώνται σε διαφορετικές μορφές ο καθένας. Σε ένα διπλοειδή οργανισμό υπάρχουν δυο διαφορετικές μορφές (αλληλόμορφα) για κάθε χαρακτήρα (γενετικό τόπο). Όλοι οι μοριακοί δείκτες ισοδυναμούν με διαφορές στην αλληλουχία του DNA (Sunnucks Paul, 2000).

1.1 Κατηγορίες μοριακών δεικτών

Οι μοριακοί δείκτες διαχωρίζονται σε δύο κλάσεις, στους βιοχημικούς και στους δείκτες νουκλεϊκών οξέων. Οι βιοχημικοί δείκτες ανιχνεύουν πολυμορφισμούς στο επίπεδο της αμινοξικής αλληλουχίας των πρωτεϊνών. Ο πρώτος βιοχημικός δείκτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν τα αλλοένζυμα (Harris 1966; Lewontin and Hubby 1966). Πρόκειται για διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου που κωδικοποιούνται από διαφορετικά αλληλόμορφα του ίδιου γενετικού τύπου. Αν και τα αλλοένζυμα αποτέλεσαν την απαρχή για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας, ως δείκτες έχουν αρκετά μειονεκτήματα. Το κυριότερο σχετίζεται με τον εκφυλισμένο γενετικό κώδικα, όπου η ποικιλότητα σε επίπεδο νουκλεοτιδικών αλληλουχιών δεν αντιστοιχεί με την ποικιλότητα σε επίπεδο αμινοξικών αλληλουχιών. Λαμβάνοντας υπόψη ότι μόνο ένα μικρό ποσοστό του γονιδιώματος κωδικοποιεί πρωτεΐνες, συμπεραίνουμε ότι τα αλλοένζυμα καλύπτουν ένα πολύ μικρό μέρος της γενετικής ποικιλότητας (Schlotterer, 2004). Ωστόσο τα προβλήματα αυτά ξεπεράσθηκαν, καθώς τους βιοχημικούς δείκτες διαδέχθηκαν οι δείκτες νουκλεϊκών οξέων.

Οι δείκτες αυτοί ανιχνεύουν πολυμορφισμούς στο επίπεδο της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ο οποίος οφείλονται σε σημειακές μεταλλάξεις (αντικαταστάσεις

νουκλεοτιδίων, ελλείμματα, προσθήκες) ή σε δομικές αναδιατάξεις. Οι δείκτες νουκλεϊκών οξέων εμφανίζουν αρκετά πλεονεκτήματα και εφαρμογές (Avisé, 1994). Όσον αφορά στον τρόπο της κληρονομής τους, οι μοριακοί δείκτες μπορούν να διακριθούν σε δύο μεγάλες κατηγορίες: οι κυρίαρχοι (dominant) και οι συγκυρίαρχοι (co-dominant). Στους διπλοειδείς οργανισμούς οι συγκυρίαρχοι δείκτες αναγνωρίζουν ένα αλληλόμορφο στα ομόζυγα άτομα και δύο στα ετερόζυγα. Αυτή η δυνατότητα της διάκρισης ανάμεσα σε ομόζυγα και ετερόζυγα άτομα είναι από τις πιο σημαντικές αυτών των δεικτών αφού μας επιτρέπουν να υπολογίσουμε την συχνότητα των αλληλομόρφων μέσα σε ένα δείγμα ατόμων (π.χ. πληθυσμό). Από την άλλη πλευρά οι κυρίαρχοι γενετικοί δείκτες είναι γνωστοί και ως "multi-locus", αφού επιτρέπουν την ταυτόχρονη παραγωγή δεδομένων από πολλούς γενετικούς τόπους. Επειδή οι κυρίαρχοι δείκτες στοχεύουν πολλές και διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος, εμφανίζουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και είναι χρήσιμοι για την διερεύνηση στενά συγγενικών ατόμων. Ωστόσο, το μεγάλο τους μειονέκτημα έγκειται στην ίδια τους τη φύση, αφού δεν μπορούμε να διακρίνουμε τα ετερόζυγα από τα ομόζυγα άτομα. (Maheswaran, 2004).

1.2 Χρονολογική εξέλιξη των μοριακών δεικτών σε επίπεδο DNA

Οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphism) οι οποίοι έθεσαν τα θεμέλια για την μετέπειτα εξέλιξη των μοριακών τεχνικών. Ορόσημο για την ανάπτυξη των περισσότερων μοριακών δεικτών υπήρξε η είσοδος της PCR (Polymerase Chain Reaction) στο πεδίο της έρευνας. Έτσι τη δεκαετία του 1990 χρησιμοποιήθηκαν δεύτερης γενιάς μοριακοί δείκτες μεταξύ των οποίων οι SSRs (Simple Sequence Repeats), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) και μια ποικιλία τροποποιημένων τύπων τους. Στα τέλη της ίδιας δεκαετίας αναπτύχθηκαν και τρίτης γενιάς μοριακοί δείκτες όπως οι SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms). Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται οι μοριακοί δείκτες με χρονολογική σειρά (Maheswaran, 2004).

Μοριακοί Δείκτες Πρώτης Γενιάς

Χρονολογία	Μοριακοί δείκτες	Παραπομπή
1974	RFLP Restriction Fragment Length Polymorphism	Grodzicker et al.(1974)
1985	VNTR Variable Number Tandem Repeats	Jeffreys et al. (1985)
1986	ASO Allele Specific Oligonucleotides	Saiki et al. (1986)
1988	AS-PCR Allele Specific Polymerase Chain Reaction	Landegren et al. (1988)
1988	OP Oligonucleotide Polymorphism	Beckmann (1988)
1989	SSCP Single Stranded Conformational Polymorphism	Orita et al. (1989)

Μοριακοί Δείκτες Δεύτερης Γενιάς

Χρονολογία	Μοριακοί δείκτες	Παραπομπή
1990	RAPD Randomly Amplified Polymorphic DNA	Williams et al. (1990)
1990	AP-PCR Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction	Welsh and McClelland (1990)
1990	STMS Sequence Tagged Micro Satellite Sites	Beckmann and Soller (1990)
1991	RLGS Restriction Landmark Genome Scanning	Hatada et al. (1991)
1992	CAPS Cleaved Amplified Polymorphic Sequence	Akopyanz et al. (1992)
1992	DOP-PCR Degenerate Oligonucleotide Primer - PCR	Telenius (1992)
1992	SSR Simple Sequence Repeats	Akkaya et al. (1992)
1993	MAAP Multiple Arbitrary Amplicon Profiling	Caetano-Anollés et al. (1993)
1993	SCAR Sequence Characterized Amplified Region	Paran and Michelmore (1993)

Μοριακοί δείκτες τρίτης γενιάς

Χρονολογία	Μοριακοί δείκτες	Παραπομπές
1994	ISSR Inter Simple Sequence Repeats	Zietkiewicz et al (1994)
1994	SAMPL Selective Amplification Of Micro Satellite Polymorphic Loci	Morgante and Vogel (1994)
1994	SNP Single Nucleotide Polymorphisms	Jordan and Humphries (1994)
1995	AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism	Vos et al (1995)
1995	ASAP Allele Specific Associated Primers	Gu et al (1995)
1996	CFLP Cleavase Fragment Length Polymorphism	Brow (1996)
1996	ISTR Inverse Sequence-tagged Repeats	Rhode (1996)
1997	DAMD-PCR Directed Amplification Of Mini Satellite DNA-PCR	Bebeli et al (1997)
1997	S-SAP Sequence-specific Amplified Polymorphism	Waugh et al (1997)
1998	RBIP Retrotransposon Based Insertional Polymorphism	Flavell et al (1998)
1999	IRAP Inter-retrotransposon Amplified Polymorphism	Kalendar et al. (1999)
1999	REMAP Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism	Kalendar et al. (1999)
1999	MSAP Methylation Sensitive Amplification Polymorphism	-----
2000	MITE Miniature Inverted-repeat Transposable Element	Casa et al (2000)
2000	TE-AFLP Three-Endonuclease AFLP	van der Wurff et al. (2000)
2001	IMP Inter-MITE Polymorphisms	Chang et al (2001)
2001	SRAP Sequence-related Amplified Polymorphism	Li and Quiros (2001)

1.3 Χαρακτηριστικά των μοριακών δεικτών

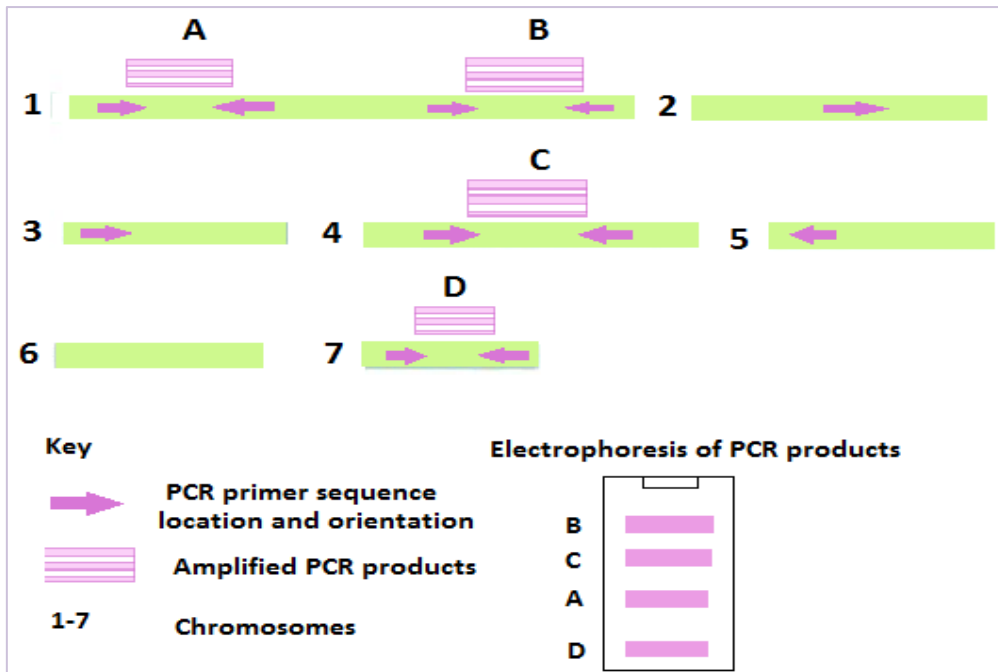
Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα ώστε να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα (Semagn et al., 2006)

- Να παρουσιάζουν έντονο πολυμορφισμό, ώστε να είναι ικανός ο διαχωρισμός των διαφορετικών ατόμων με τη χρήση ενός ή περισσότερων από αυτούς.
- Να ακολουθούν απλό τρόπο κληρονόμησης (μενδελική κληρονόμηση)
- Να αποτελούν συγκυρίαρχους δείκτες ώστε να είναι δυνατή η διάκριση της ομόζυγης από την ετερόζυγη κατάσταση.
- Να παρουσιάζουν επιλεκτικά ουδέτερη συμπεριφορά.
- Να εμφανίζουν διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ομοιόμορφη κατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- Η μεθοδολογία να είναι εύκολη και γρήγορη, να χαρακτηρίζεται από υψηλή απόδοση, επαναληψιμότητα και χαμηλό κόστος.

1.4 Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD)

1.4.1 Η αρχή της μεθόδου

Η τεχνική των RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNAs) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1990 (Williams et al., 1990; Welsh and McClelland, 1990). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση τυχαίων, ολιγονουκλεοτιδικών (10 bp) εκκινητών, οι οποίοι, υβριδοποιούνται σε διάφορα σημεία του γονιδιώματος, ενισχύοντας σε μία αντίδραση PCR πολυάριθμα τμήματα γενετικού υλικού. Η κάθε ζώνη που παρατηρείται στο πήκτωμα αγαρόζης κατά την ηλεκτροφόρηση προκύπτει από την ενίσχυση ενός τμήματος DNA με τη χρήση ενός μόνο εκκινητή ο οποίος υβριδοποιείται σε δύο σημεία του γονιδιώματος με αντίθετο προσανατολισμό (Williams et al., 1990). Το μικρό μήκος των εκκινητών και η χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού, οδηγούν στη λήψη ικανοποιητικών πολυμορφικών προτύπων, που αντανakλούν διαφορές στη νουκλεοτιδική αλληλουχία όπως σημειακές μεταλλάξεις ή δομικές αναδιατάξεις (Welsh and McClelland, 1990) (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Η βασική αρχή της τεχνικής RAPDs

1.5 Πλεονεκτήματα & Μειονεκτήματα των δεικτών RAPDs

Σύμφωνα με τους Benter et al. (1995) η τεχνική RAPDs παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα, τα οποία παρουσιάζονται παρακάτω.

Πλεονεκτήματα

- Είναι ιδανικοί δείκτες για τη μελέτη γονιδιωμάτων χωρίς να χρειάζεται καμία προηγούμενη γνώση της ακολουθίας του DNA ή της οργάνωσης του (μη αλληλουχημένα γονιδιώματα).
- Παρέχουν τη δυνατότητα μελέτης πολλών γενετικών τόπων ταυτόχρονα.
- Μπορούν να εφαρμοσθούν στην περίπτωση που η ποσότητα του προς μελέτη γενετικού υλικού είναι μικρή.
- Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο και δεν απαιτείται σχεδιασμός τους.
- Αποτελούν εύκολη, αποτελεσματική και οικονομική μοριακή τεχνική.

Μειονεκτήματα

- Είναι κυρίαρχοι δείκτες συνεπώς δε διακρίνεται η ομόζυγη από την ετερόζυγη κατάσταση.
- Πρόκειται για ευαίσθητη τεχνική όσον αφορά την επιμόλυνση και την επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

1.6 Εφαρμογές της τεχνικής RAPD στα έντομα

Το βασίλειο των εντόμων περικλείει μία τεράστια γονιδιακή δεξαμενή και μια ανεξερεύνητη γενετική ποικιλότητα οι οποίες μπορούν να μελετηθούν με τη βοήθεια των μοριακών δεικτών. Η έρευνα της μοριακής οικολογίας των εντόμων είναι πολύ σημαντική καθώς μπορεί να αποκαλύψει πληροφορίες σχετικά με την ειδογένεση, τη γονιδιακή ροή, τη δομή και την οργάνωση του γονιδιώματος (gene mapping) (Subodh Kumar Jain et al., 2009).

Ως μοριακοί δείκτες, τα RAPDs είναι ένα χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των ερευνητών για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας, την εύρεση του βαθμού διαφοροποίησης μεταξύ των ειδών, για φυλογενετικές και βιογεωγραφικές μελέτες, για τη δημιουργία γονιδιακών χαρτών (Subodh Kumar Jain et al., 2009) αλλά και για τη φυλοειδική διάγνωση μεταξύ των ατόμων ενός είδους προκειμένου να δημιουργηθούν δείκτες ειδικοί για το κάθε φύλο. Συγκεκριμένα η τεχνική των RAPDs έχει εφαρμοσθεί για τη δημιουργία χάρτη γενετικής σύνδεσης (linkage map) σε έντομα όπως *Apis mellifera* (Hunt G J et al., 1995), *Bombyx mori* (Yasukochi Y et al., 1998) και *Tribolium castaneum* (Beeman R W & Briwn S J, 1999). Επίσης, η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση της γενετικής ποικιλότητας τεσσάρων ειδών αφίδων (*Schizaphis graminum*, *Acyrtosiphon pisum*, *Diuraphis noxia* και *Uroleucon ambrosiae*) (Black W C et. al., 1992). Ακόμα, η γονιδιακή ροή μεταξύ πληθυσμών *Aedes albifasciatus* στην κεντρική Αργεντινή εξετάστηκε με την εφαρμογή των RAPD δεικτών. Υπολογίσθηκαν οι συχνότητες των αλληλομόρφων σε 28 γενετικούς τόπους και εκτιμήθηκε αν ισχύει η ισορροπία Hardy-Weinberg (Gill T K et al., 2006). Τέλος οι δείκτες RAPDs αποδείχθηκαν ικανοποιητικά αποτελεσματικοί για τη φυλοειδική διάκριση σε είδη μεταξοσκώληκα, *Bombyx mori* και wild, *B. mandarina*. Βρέθηκαν τέσσερεις δείκτες, ειδικοί για το φυλετικό χρωμόσωμα W που απαντάται μόνο στα θηλυκά άτομα. (Hiroaki Abe et al., 1998)

1.7 Sequence Characterized Amplified Region (SCAR)

Το 1993 οι Paran και Micheimore, προκειμένου να ξεπεραστούν τα προβλήματα της επαναληψιμότητας της τεχνικής RAPD, εισήγαγαν τη μεθοδολογία των SCAR ως μοριακό δείκτη. Ένας μοριακός δείκτης SCAR είναι ένα τμήμα γενετικού υλικού το οποίο ανιχνεύεται με την εφαρμογή της τεχνικής PCR με τη χρήση ενός ζεύγους εκκινητών, ειδικά σχεδιασμένων γι' αυτό το τμήμα. Συγκεκριμένα, οι δείκτες SCAR προκύπτουν μετά από κλωνοποίηση και αλληλούχηση των RAPD δεικτών που εμφανίζονται να είναι διαγνωστικοί για τον σκοπό που εφαρμόστηκαν. Ουσιαστικά πρόκειται για μια αναγωγή των RAPD δεικτών σε SCAR με τους τελευταίους να υπερτερούν διότι ανιχνεύουν ένα μόνο γενετικό τόπο, η τεχνική είναι λιγότερο ευαίσθητη και δυνητικά αποτελούν συγκυρίαρχους μοριακούς δείκτες. (Paran and Michelmore, 1993).

2. Φυλοειδική διάγνωση στα έντομα

Ο καθορισμός του φύλου, ο μηχανισμός ρύθμισης και εξέλιξης του είναι ένα θέμα που απασχολεί έντονα τον τομέα τόσο της αναπτυξιακής όσο και εξελικτικής βιολογίας (Gemppe and Beye, 2010). Κλασσικές κυτταρογενετικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ένα σύνολο από παράγοντες που οδηγούν στον καθορισμό των δύο φύλων. Στη *D. melanogaster*, η διπλή δόση του X χρωμοσώματος καθορίζει το θηλυκό (XX, XXY, XYY) ενώ η παρουσία ενός μόνο X χρωμοσώματος το αρσενικό (XY και XO) (Erickson JW et al. 2007). Σε άλλα δίπτερα, όπως στις *Musca domestica* και *Ceratitis capitata* το πρότυπο XX καθορίζει το θηλυκό ενώ το XY (Pane A et al. 2002; Dubendorfer et al. 2002) το αρσενικό. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν έντομα όπως *Megaselia scalaris* (Traut W. 1994) και *Chironomus* (Thompson PE, Bowen JS. 1972) τα οποία δεν παρουσιάζουν κάποια ποσοτική ή ποιοτική διαφορά όσον αφορά τα φυλετικά χρωμοσώματα. Σε αυτή την περίπτωση ένας ή περισσότεροι γενετικοί τόποι ή κάποιος μηχανισμός εντυπώματος καθορίζουν το φύλο. Οι παραπάνω αναφορές οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η διάκριση μεταξύ αρσενικού και θηλυκού δεν περιορίζεται μόνο σε χρωμοσωμικές διαφορές αλλά έχει κυρίως μοριακό υπόβαθρο.

Ο γενετικός καθορισμός του φύλου μπορεί να οφείλεται σε ένα μόνο γενετικό τόπο, σε πολλούς, στενά συνδεδεμένους γενετικούς τόπους που εντοπίζονται σε αυτοσωμικά ή μη αυτοσωμικά χρωμοσώματα ή σε γονίδια που εδράζονται στα φυλετικά χρωμοσώματα. (Parrish et al. 2004). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η *D. melanogaster* όπου η παρουσία του Y χρωμοσώματος δεν είναι εκείνη που καθορίζει το αρσενικό φύλο. Η ισορροπία ανάμεσα σε 'θυλεο-καθοριστικούς' μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι κωδικοποιούνται από γονίδια που εδράζονται στο X χρωμόσωμα και σε 'αρρενο-καθοριστικούς' μεταγραφικούς παράγοντες που κωδικοποιούνται από γονίδια που εντοπίζονται σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα δημιουργούν ένα πρότυπο καθορισμού του φύλου (Hake, 2008). Σε αυτή την περίπτωση, δείκτες συνδεδεμένοι με τα φυλετικά χρωμοσώματα δεν είναι επαρκείς από μόνοι τους για τη διάκριση μεταξύ θηλυκού και αρσενικού ατόμου (Griffiths and Tiwari, 1993).

2.1 Φυλοειδική διάγνωση στο δάκο της ελιάς

Ο καρυότυπος του εντόμου αποτελείται από έξι ζεύγη χρωμοσωμάτων, ένα φυλετικό και πέντε αυτοσωμικά, με το αρσενικό να είναι το ετερογαμετικό φύλο (Manragani-Tsipidou et al. 1992, Krimbas 1963). Το Y είναι πολύ μικρό ενώ το X είναι μικρότερο από όλα τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Έχει βρεθεί ότι το Y και το μεγαλύτερο μέρος του X είναι υψηλά ετεροχρωματινικές περιοχές (Manragani-Tsipidou et al. 1992). Τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα του δάκου πολυταινίζονται όχι όμως και τα φυλετικά γεγονός που αποδεικνύει την ετεροχρωματινική φύση τους. Χρωμοσώματα έχουν απομονωθεί από τους σιελογόνους αδένες και από τα μαλπιγγιανά σωληνάκια του είδους. Πέρα όμως από την κυτταρολογική έρευνα, η μελέτη του μοριακού μηχανισμού ρύθμισης του φύλου και των γονιδίων που εμπλέκονται, παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη περίπτωση του *Bactrocera oleae* που είναι έντομο σπουδαίας οικονομικής σημασίας. Άλλωστε το έντομο έχει αποδειχθεί ότι αποτελεί το σημαντικότερο εχθρό της ελιάς και η μελέτη των γονιδίων φυλοκαθορισμού μπορεί να φανεί πολύτιμη για τη βελτίωση των τεχνικών καταπολέμησης του (Lagos et al., 2005).

3. Συμβατικές και Μη μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) (Drew, 1989) είναι ο πιο σημαντικός εχθρός της ελιάς και έχει τεράστια οικονομική σημασία στις χώρες της Μεσογείου, τη Βόρειο Αφρική, τα Κανάκια Νησιά και τη Μέση Ανατολή ενώ τα τελευταία χρόνια η δράση του εντόμου έχει επεκταθεί και στη πολιτεία της Καλιφόρνιας των ΗΠΑ (Augustinos et al. 2002; Rice et al. 2003; Nardi et al. 2005). Σε περιπτώσεις μη ελέγχου του εντόμου, η προσβολή μπορεί να προκαλέσει υποβάθμιση της εμπορικής αξίας της ελαιοποιήσιμης και επιτραπέζιας ελιάς πάνω από 80% (Daane and Johnson, 2010).

Διάφορες στρατηγικές έχουν εφαρμοσθεί για τη καταπολέμηση του δάκου της ελιάς (Daane and Johnson, 2010). Από αυτές οι περισσότερες βασίζονται στη χρήση χημικών εντομοκτόνων όπως τα οργανοφωσφωρικά, τα πυρεθροειδή καθώς και η δραστική ουσία 'spinosad' που έχει απομονωθεί από τον ακτινομύκητα *Saccharopolyspora spinosa* (Collier et al, 2003). Ωστόσο, η αλόγιστη χρήση των εντομοκτόνων μπορεί να έχει δυσμενείς επιπτώσεις όπως είναι η θανάτωση ωφέλιμων εντομοφάγων εντόμων, οι εξάρσεις πληθυσμών δευτερευόντων εχθρών, τα υπολείμματα των χρησιμοποιούμενων ουσιών στα προϊόντα και τέλος η ανάπτυξη ανθεκτικότητας του δάκου στα εντομοκτόνα (Alberola et al., 1999).

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. Μέσα στα πλαίσια της ανεύρεσης ασφαλέστερων μεθόδων, η τεχνική στέρησης των εντόμων αποκτά μεγάλη σημασία (SIT, Sterile Insect Technique). Η τεχνική συνίσταται στη μαζική παραγωγή

ατόμων, στη στειρώσή τους με εφαρμογή ακτινοβολίας γ και στην απελευθέρωσή τους στον αγρό με ελεγχόμενο τρόπο. Στόχος είναι η μείωση του αριθμού των γόνιμων διασταυρώσεων στους φυσικούς πληθυσμούς και η επακόλουθη μείωση του φυσικού πληθυσμού. Η σύζευξη μεταξύ στείρου αρσενικού και ακμαίου θηλυκού οδηγεί σε στείρα ωοτοκία. Ακόμη και αν προκύψουν κάποια άτομα, αυτά πεθαίνουν πρόωρα πριν ολοκληρώσουν την ανάπτυξή τους λόγω δομικών αλλαγών των χρωμοσωμάτων των γαμετών τους από την ακτινοβολία (Economidou, 1977). Ωστόσο, η φυλοειδική διάγνωση στο δάκο της ελιάς μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση και το χαρακτηρισμό φυλοειδικών γονιδίων, με σκοπό τη βελτίωση της μεθόδου SIT (Lagos et. al, 2005). Η δημιουργία διαγονιδιακών σειρών *Bactrocera oleae* μέσω της καταστολής φυλοειδικών γονιδίων θα αποτελέσει σημαντικό βήμα για την καταπολέμηση του εντόμου (Lagos et.al, 2007).

Άλλες μη συμβατικές μέθοδοι καταπολέμησης των εντόμων περιλαμβάνουν τη χρήση παθογόνων μικροοργανισμών. Για παράδειγμα, το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*, είναι ένα Gram θετικό βακτήριο που έχει τη δυνατότητα να σχηματίζει κρυσταλλικά σπόρια που περιέχουν δ-ενδοτοξίνη. Με την κατάποση του βακτηρίου από το δάκο της ελιάς ελευθερώνονται οι δ-ενδογονίες και η διάσπαση τους παράγει επιβλαβή προϊόντα για τα ενήλικα και τις προνύμφες (Karamanlidou et al 1991). Στον αντίποδα, η απουσία μικροοργανισμών μπορεί επίσης να έχει βλαβερές συνέπειες, αφού διάφοροι συμβιωτικοί οργανισμοί είναι απαραίτητοι για τη φυσιολογική ζωή των εντόμων. Ο Hagen (1966), για παράδειγμα βρήκε ότι, η προσθήκη της αντιβιοτικής ουσίας στρεπτομυκίνης στην τροφή των ενήλικων ατόμων, προκάλεσε τον θάνατο του συμβιωτικών βακτηρίων μέσα στο σώμα του θηλυκού και αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τον έμμεσο θάνατο των προνυμφών, λόγω αδυναμίας πέψης των πρωτεϊνών του μεσοκαρπίου. Το ίδιο αποτέλεσμα είχε και η μεταχείριση των καρπών με το ίδιο αντιβιοτικό λίγο πριν ή μετά την ωοτοκία. Δεν συμβαίνει όμως το ίδιο όταν οι ελιές είναι ώριμες και έτσι πλουσιότερες σε ελεύθερα αμινοξέα. (Hagen, 1996; Fytizas and Tzanakakis, 1966).

Σήμερα ο καθηγητής Κ. Μπούρτζης υποστηρίζει ότι το συμβιωτικό βακτήριο *Wolbachia* μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως "Δούρειος Ίππος" για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς. Η *Wolbachia* έχει μια μοναδική ικανότητα να χρησιμοποιεί το αναπαραγωγικό σύστημα των ξενιστών της για το δικό της όφελος, δηλαδή για την εξάπλωση και επικράτησή της σε πληθυσμούς των ξενιστών της. Συγκεκριμένα, το βακτήριο έχει συνδεθεί με μια σειρά αναπαραγωγικών ανωμαλιών όπως η παρθενογένεση, η θηλυκοποίηση, η θανάτωση αρσενικών εμβρύων και κυρίως, η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα είναι ουσιαστικά μια μορφή στειρότητας η οποία εμφανίζεται σε διασταυρώσεις μεταξύ μη μολυσμένων θηλυκών με μολυσμένα αρσενικά (Apostolaki et.al 2010).

Πριν από την ταυτοποίηση της *Wolbachia* ως αίτιου της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας, το βακτήριο είχε χρησιμοποιηθεί για καταπολέμηση κουνουπιών (Laven 1967). Η βασική ιδέα ήταν η απελευθέρωση μολυσμένων αρσενικών,

μέθοδος ανάλογη της τεχνικής στείρων εντόμων (SIT: Sterile Insect Technique), που είχε ως αποτέλεσμα ασύμβατες διασταυρώσεις και μείωση των επιπέδων του πληθυσμού. Λόγω της ικανότητας του βακτηρίου να εξαπλώνεται γρήγορα (Turelli and Hoffmann 1991), θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως φορέας εξάπλωσης επιθυμητών χαρακτηριστικών σε πληθυσμούς εντόμων, σημαντικών στη γεωργία και στην υγεία. (Curtis and Sinkins 1998, Sinkins et al. 1997).

4. Συμβιωτικές σχέσεις

Με τον όρο συμβίωση εκφράζεται η σχέση συνύπαρξης ενός οργανισμού με έναν άλλο. Το 1879 ο Γερμανός επιστήμονας Heinrich Antou de Bary, όρισε τη συμβίωση ως: << το να ζουν μαζί δυο ανόμοιοι οργανισμοί >> (John H. Werren et al. 1997). Ένας οργανισμός που ζει ή συνεργάζεται μαζί με άλλα είδη ονομάζεται συμβιώτης. Με γνώμονα τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών διακρίνουμε τριών ειδών σχέσεις συμβίωσης. Όσον αφορά στις σχέσεις αμοιβαιότητας (mutualism), αναπτύσσονται αλληλεπιδράσεις εξάρτησης μεταξύ των οργανισμών όπου επωφελούνται αμφότεροι σε ένα σχήμα "δούναι και λαβείν". Από την άλλη πλευρά, η συμβίωση μπορεί να χαρακτηρίζεται ως ομοσιτισμός (commercialism), κατά τον οποίο το ένα είδος ωφελείται, ενώ το άλλο δεν αποκομίζει κάποιο όφελος αλλά ούτε βλάπτεται. Αντιδιαμετρικά, υπάρχει ο παρασιτισμός (parasitism), όπου ο ένας συμβιώτης ωφελείται εις βάρος του άλλου. Ο οργανισμός αυτός χαρακτηρίζεται ως παράσιτο (Alvin Silvertin, Virginia Silverstein and Laura Silverstein Nunn 2006). Ωστόσο τα όρια μεταξύ αυτών των τριών ειδών συμβίωσης δεν είναι διακριτά και είναι δυνατή η μετάπτωση από τη μορφή στην άλλη (Paracer and Ahmadjian, 2000).

4.1 Συμβιωτικές σχέσεις εντόμων με βακτήρια

Οι σχέσεις συνύπαρξης μεταξύ των εντόμων και των μικροοργανισμών είναι ευρύτερα διαδομένες (Buchner 1965, Moran & Baumann 2000, Von Dohlen et al., 2001). Οι συμβιώτες μπορεί να είναι προκαρυωτικοί ή ευκαρυωτικοί οργανισμοί όπως πρωτόζωα, μύκητες ή βακτήρια. Αρκετοί από αυτούς όμως, δεν έχουν καλλιεργηθεί σε κάποιο από τα συνήθη θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο (Smith & Douglas, 1987). Σε ορισμένες περιπτώσεις, ο ξενιστής φιλοξενεί τον μικροοργανισμό μέσα σε ειδικές κυτταρικές θέσεις που ονομάζονται βακτηριοκύστες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι σχέσεις αμοιβαιότητας που αναπτύσσονται μεταξύ των αφίδων και βακτηριακών στελεχών του γένους *Buchnera* (Baumann et al., 1995). Τα βακτήρια αυτά κληροδοτούνται από τη μητέρα στον απόγονο (Douglas, 1998) και μπορούν να αποτελέσουν σημαντική πηγή αμινοξέων τα οποία λείπουν από τη δίαιτα του εντόμου. Σε άλλες περιπτώσεις, οι μικροοργανισμοί μπορούν να εντοπίζονται εξωκυτταρικά σε διάφορα όργανα, όπως στη μικροχλωρίδα του εντέρου των τερμιτών (Breznak & Brune, 1994). Οι

συμβιωτικές σχέσεις όμως δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως απόλυτα ωφέλιμες ή επιβλαβείς. Συγκεκριμένα, το *Wolbachia ripientis*, είναι ένα βακτήριο το οποίο αναπτύσσει παρασιτικές σχέσεις με το 66% των αρθροπόδων (Hilgenboecker et al., 2008). Η παρουσία του στο έντομο έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση του αναπαραγωγικού συστήματος του ξενιστή οδηγώντας σε θηλυκοποίηση και κυτταροπλασματική ασυμβατότητα. Σε αντίθεση όμως με αυτό το παρασιτικό είδος συμβίωσης, αποδείχθηκε ότι το βακτήριο *Wolbachia ripientis* μπορεί να παρέχει προστασία στη *Drosophila melanogaster* και στη *Drosophila simulans* έναντι παθογόνων RNA ιών (Hedges et al. 2008, Teixeira et al., 2008).

4.2 Συμβιωτικά βακτήρια του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*

Στις αρχές του προηγούμενου αιώνα (1906-1909), ο Petri, ήταν ο πρώτος που αναφέρθηκε στην ύπαρξη συμβιωτικών βακτηρίων στο δάκο της ελιάς (Petri 1909, Hagen, K. S. 1966). Βασιζόμενος σε παρατηρήσεις στο μικροσκόπιο, διέκρινε βακτηριακούς κόκκους στον οισοφαγικό θύλακα οι οποίοι εξαπλώνονταν μέχρι το έντερο του ενήλικου εντόμου (Εικόνα 2, Εικόνα 3). Θεώρησε ότι επρόκειτο για το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi*, το οποίο προκαλεί την ασθένεια του κορωνοτού κάλλου στην ελιά. Το βακτήριο αυτό κληροδοτείται από τη μητέρα στους απογόνους μέσω της ωτοκίας, με την κύρια βακτηριακή μάζα να εδράζεται στη μικροκύλη του αυγού (Εικόνα 5). Επίσης, επισήμανε την παρουσία του βακτηρίου σε κάθε στάδιο της ανάπτυξης του εντόμου. Στα ενήλικα άτομα εντοπίστηκε κυρίως στον οισοφαγικό θύλακα ενώ στο προνυμφικό στάδιο βρισκόταν μόνο στο έντερο (Petri, 1910) (Εικόνα 4). Αργότερα, οι Buchner (1965) και Hagen (1966) επιβεβαίωσαν τις παρατηρήσεις του Petri, αλλά αμφισβήτησαν την ταυτοποίηση του βακτηρίου ως *Pseudomonas savastanoi*, ενώ πρόσφατες έρευνες αποδεικνύουν ότι όντως δεν πρόκειται για το συγκεκριμένο βακτήριο αλλά για ένα νέο είδος το οποίο ονόμασαν *Erwinia dacicola* (Capuzzo et al 2005).

Έτσι λοιπόν, το ενδιαφέρον των ερευνητών έχει στραφεί στη μελέτη της βακτηριακής χλωρίδας του δάκου της ελιάς, με νέα στοιχεία να δίνουν φως στις ανεξερεύνητες σχέσεις συμβίωσης εντόμου και βακτηρίων (Michael Ben-Yosef et al, 2012). Σύμφωνα με τον Τζανακάκη (1995), η προνύμφη του δάκου έχει ανάγκη την παρουσία συμβιωτικών βακτηρίων στον πεπτικό της σωλήνα για να μπορέσει να διασπάσει τις πρωτεΐνες του μεσοκαρπίου της ελιάς σε αμινοξέα. Επίσης, η διατροφή του ενήλικου, θηλυκού ατόμου πρέπει να είναι πλούσια σε πηγή αζώτου ώστε το έντομο να είναι ικανό για ωογένεση (Tsiropoulos, 1984). Διαπιστώνεται λοιπόν, ότι ο κύκλος ζωής του εντόμου είναι άμεσα συνυφασμένος με την παρουσία των βακτηρίων.

Έχουν ταυτοποιηθεί 16 διαφορετικά βακτηριακά είδη σε άτομα φυσικού πληθυσμού ενώ μόλις 8 διαφορετικά σε άτομα εργαστηριακού μεταξύ των οποίων: *Bacillus*, *Erwinia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*,

Citrobacter, *Proteus*, *Providencia*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Serratia*, and *Xanthomonas* (Tsiropoulos, 1983.)

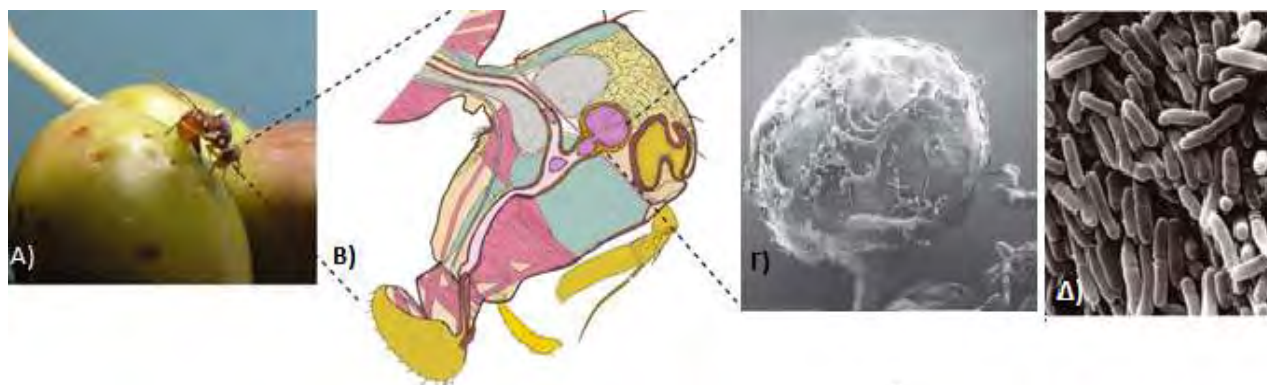
Σύμφωνα με τους Caruzzo et al (2005), το βακτήριο *Erwinia dasicola* είναι ο κυριότερος συμβιώτης του δάκου, ο οποίος φιλοξενείται σε μεγαλύτερο ποσοστό στον οισοφαγικό θύλακα και στο έντερο του ενήλικου εντόμου. Το βακτήριο αυτό απαντάται μόνο στον δάκο της ελιάς και σε κανένα άλλο έντομο της οικογένειας των *Tephritidae*. Η ειδική διαμόρφωση του οισοφαγικού θύλακα του *Bactrocera oleae*, ο οποίος διαφέρει σε μεγάλο βαθμό από τον 'Ceratitis-type' οισοφαγικό θύλακα των υπόλοιπων μελών της οικογένειας *Tephritidae* (*Rhagoletis*, *Ceratitis*, *Anastrepha*) εξηγεί την ιδιαίτερη προτίμηση του βακτηρίου *Erwinia dasicola*, το οποίο φαίνεται να συν-εξελίσσεται μαζί με τον ξενιστή του (Girolami, 1973, C. Caruzzo et al, 2005).

Ωστόσο, τελευταίες μελέτες απέδειξαν ότι μεταξύ των βακτηρίων της εντερικής χλωρίδας του δάκου, κυρίαρχη θέση κατέχει το *Acetobacter tropicalis*. Το βακτήριο αυτό εντοπίστηκε τόσο σε φυσικούς όσο και σε εργαστηριακούς πληθυσμούς σε αντίθεση με το βακτήριο *Erwinia dasicola* που απαντάται μόνο σε φυσικούς πληθυσμούς. Το *Acetobacter tropicalis* ανήκει στην κατηγορία των βακτηρίων του ακετικού οξέος, έχει την ικανότητα να αποικεί στο πεπτικό σύστημα της προνύμφης και του ενήλικου ατόμου καθώς και στα μαλιγγιανά σωληνάκια του ενήλικου. Παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση και στη σωστή λειτουργία του εντέρου του εντόμου ενώ μπορεί να παράγει θρεπτικά στοιχεία (πολυσακχαρίτες) τα οποία είναι σημαντικά για τη διατροφή του (Kounatidis et al 2009).

4.3 Παραλλαγές στις συμβιωτικές σχέσεις μέσα στο είδος *Bactrocera oleae*

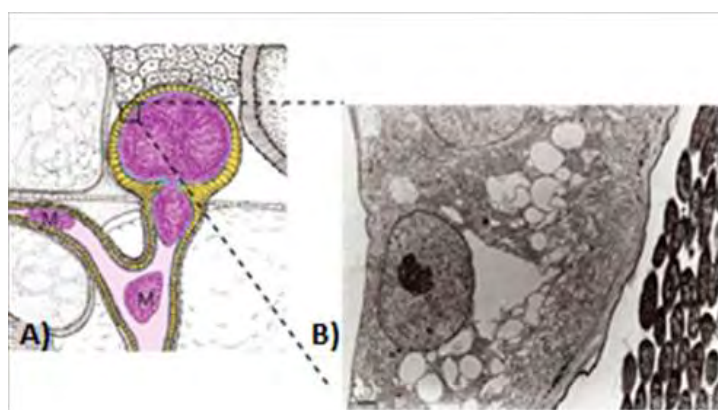
Οι συμβιωτικές σχέσεις μεταξύ του δάκου της ελιάς και των βακτηρίων είναι ιδιαίτερα δυναμικές και ευμετάβλητες. Συγκεκριμένα, η βακτηριακή κοινότητα των φυσικών πληθυσμών διαφέρει από εκείνη των εργαστηριακών με την πρώτη να εμφανίζεται περισσότερο άφθονη και με μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Η διακύμανση αυτή δεν είναι τυχαία και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μέσο διατροφής των εντόμων. Οι εργαστηριακοί πληθυσμοί τρέφονται με τεχνητό θρεπτικό μέσο σε αντίθεση με τους φυσικούς οι οποίοι τρέφονται με τον καρπό της ελιάς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, οι τελευταίοι να προσλαμβάνουν με τη τροφή, βακτήρια που βρίσκονται στην επιφάνεια του καρπού (Drew et al. 1983). Η περιορισμένη βακτηριακή χλωρίδα έχει αρνητικό αντίκτυπο καθώς τα έντομα παρουσιάζουν μειωμένη γονιμότητα και βιωσιμότητα (Girolami & Cavalloro, 1972). Αρκετά συμβιωτικά βακτήρια παρουσιάζουν εξειδίκευση όχι μόνο ως προς το είδος του εντόμου αλλά και ως προς το φύλο του εντόμου με το οποίο διαβιούν. Σύμφωνα με τους Kounatidis et al.(2009) το βακτήριο *Enterococcus faecalis* εντοπίστηκε κυρίως σε αρσενικά άτομα δάκου ενώ το βακτήριο *Paenibacillus glucanolyticus*

περισσότερο σε θηλυκά. Αν και η βιολογία των σχέσεων αυτών αναμένεται να εξερευνηθεί περαιτέρω, τίθεται έντονα το ερώτημα της ύπαρξης φυλοειδικών βακτηρίων και ποιά η σχέση τους με το αναπαραγωγικό σύστημα του εντόμου.



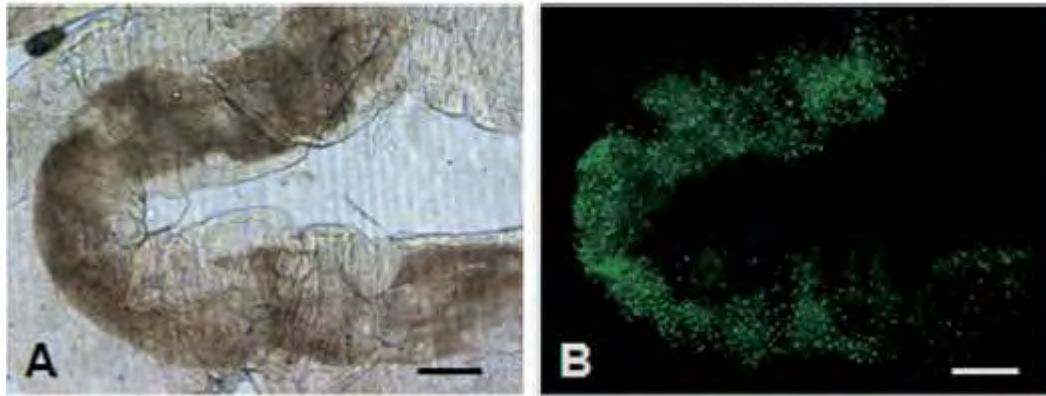
Εικόνα 2.

A) Το θηλυκό έντομο ωτοκεί στον καρπό της ελιάς με τη χαρακτηριστική κύρτωση του ωοθέτη που βρίσκεται στην άκρη της κοιλιάς. Β) Απεικόνιση της ανατομίας του κεφαλιού του δάκου. Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν τη θέση του οισοφαγικού θύλακα. Γ) Απεικόνιση από σάρωση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας του οισοφαγικού θύλακα και Δ) της παρουσίας βακτηρίων στο εσωτερικό του.



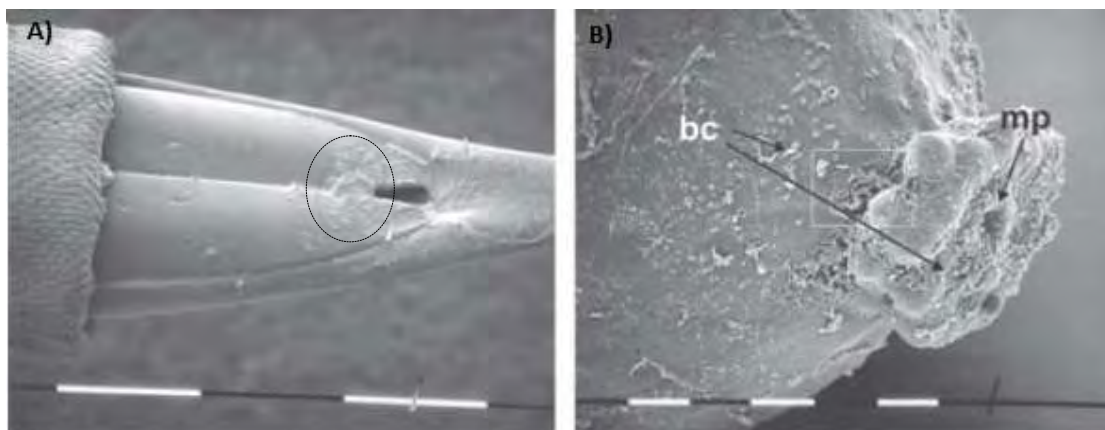
Εικόνα 3.

A) Βακτηριακοί κόκκοι (M) οι οποίοι έχουν μεταναστεύσει από τον οισοφαγικό θύλακα στο έντερο του ενήλικου ατόμου. Β) Απεικόνιση από σάρωση ηλεκτρονικής μικροσκοπίας επιθηλιακού κυττάρου του οισοφάγου με διαμορφωμένες βακτηριοκύστες όπου έχουν αναπτυχθεί βακτηριακές αποικίες.



Εικόνα 4.

A) Απεικόνιση του εντέρου του εντόμου στο στάδιο της προνύμφης και Β) Απεικόνιση των βακτηριακών κόκκων στο εσωτερικό του εντέρου του εντόμου. Οι βακτηριακές αποικίες παρουσιάζουν έντονο φθορισμό λόγω χρήσης της χρωστικής GFP.



Εικόνα 5.

A) Απεικόνιση του ωσθέτη του θηλυκού εντόμου, όπου διακρίνονται βακτηριακές αποικίες (διακεκομμένο περίγραμμα) Β) Απεικόνιση του αυγού του δάκου της ελιάς με τις βακτηριακές αποικίες (bc) να είναι διεσπαρμένες κυρίως στην επιφάνεια της μικροπύλης (mp).

Σκοπός

Στόχος της παρούσα πτυχιακής διατριβής είναι η διερεύνηση της καταλληλότητας των δεικτών RAPD στο φυλοδιαχωρισμό του δάκου της ελιάς. Τέτοιοι μοριακοί δείκτες θα μπορούσαν να δώσουν διαφορετικό πρότυπο ενίσχυσης στα δύο φύλα τόσο λόγω γονιδιωματικών διαφορών ανάμεσα σε θηλυκά και αρσενικά άτομα όσο και λόγω ύπαρξης διαφορετικής συμβιωτικής χλωρίδας στα δύο φύλα. Η μοριακή τεχνική των RAPDs εφαρμόστηκε σε γενετικό υλικό που απομονώθηκε τόσο από θηλυκά όσο και από αρσενικά άτομα εργαστηριακού πληθυσμού. Με τη βοήθεια των RAPD δεικτών είναι δυνατό να αναπτυχθούν οι μοριακοί δείκτες SCAR που παρουσιάζονται να είναι πιο εξειδικευμένοι και αποτελεσματικοί για τη διάκριση μεταξύ θηλυκού και αρσενικού ατόμου. Στην περίπτωση που βρεθεί κάποιος δείκτης να παρουσιάζει διαφοροποίηση μεταξύ των δύο φύλων, μπορεί να εφαρμοσθεί σε γενετικό υλικό μεμονωμένων ατόμων ώστε να αποδειχθεί αν όντως πρόκειται για φυλοειδικό μοριακό δείκτη.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. Πέψη πλασμιδιακού DNA

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες νουκλεοτιδίων και τέμνουν κατά τρόπο καθορισμένο και επαναλαμβανόμενο το δίκλωνο DNA. Η δράση τους εστιάζεται στην αναγνώριση ειδικών παλίνδρομων αλληλουχιών τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας (Watson 2007)

Σκοπός της διαδικασίας είναι η πέψη του πλασμιδιακού DNA με το ένζυμο περιορισμού PvuII προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι του επιθυμητού ενθέματος. Ο πλασμιδιακός φορέας pBlueScript II έχει μέγεθος 3.000 bp και το ένζυμο περιορισμού αναγνωρίζει και πέπτει το φορέα στις θέσεις 427 και 927.

Υλικά

Η αντίδραση πέψης πραγματοποιήθηκε με βάση το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στον πίνακα

Αντίδραση πέψης	
DNA	2,5 μl
Buffer (10x→1x)	1,50 μl
PvuII (10u/μl: 3u)	0,3 μl
ddH ₂ O	10,7 μl
V _{Final}	15,00 μl

Πίνακας 1. Πρωτόκολλο πέψης

Μεθοδολογία

1. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε σωληνάκια όγκου 200 μl του τύπου eppendorf.
2. Τα υλικά αναμιγνύονται ομοιόμορφα και επωάζονται για 1 h στους 37° C. Μετά το πέρας της επώασης η αντίδραση μπορεί να αποθηκευτεί στους -20° C.
3. Στη συνέχεια, το προϊόν της αντίδρασης ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και παρατηρείται το χαρακτηριστικό πρότυπο της πέψης.

2. Απομόνωση DNA

2.1 Απομόνωση DNA με υγρό άζωτο

Υλικά

Υγρό άζωτο

Διάλυμα I : EDTA (100 mM), Tris (5 mM 7,5 pH)

Διάλυμα II : EDTA (100 mM), Tris (5 mM 7,5 pH) , 1% SDS.

Proteinase K (50 mg/ml)

TE buffer

Μεθοδολογία

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του DNA αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο που προτείνεται από τον Ashburner (1989). Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση DNA από ενήλικα θηλυκά και αρσενικά άτομα δάκου φυσικού πληθυσμού. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τη μηχανική λύση των κυττάρων με υγρό άζωτο για την ανάκτηση του γενετικού υλικού. Το υγρό άζωτο χρησιμοποιείται προκειμένου να αφυδατωθούν οι ιστοί των εντόμων, γεγονός που καθιστά πιο εύκολη την ομογενοποίηση και τη μετατροπή των ιστών σε σκόνη. Έπειτα γίνεται χρήση του Διαλύματος I και διαδοχικά του Διαλύματος II. Η σύσταση αυτών των διαλυμάτων επιτρέπει την ρήξη των κυτταρικών / πυρηνικών μεμβρανών και την απελευθέρωση του DNA. Συγκεκριμένα, το EDTA είναι ένας χηλικός υποκαταστάτης, που έχει την ικανότητα να δεσμεύει μεταλλικά ιόντα. Στην παρούσα διαδικασία χρησιμοποιήθηκε για τη δέσμευση των κατιόντων Mg^{2+} . Τα ιόντα Mg^{2+} αποτελούν συμπαραγόντα για τη δράση των δεσόξυριβονουκλεασών, οπότε η δέσμευσή τους προστατεύει το DNA από την αποικοδόμηση. Επίσης η παρουσία του ρυθμιστικού διαλύματος, Tris, διατηρεί το pH σε ουδέτερη περιοχή (~7,5). Τέλος το SDS χρησιμοποιείται ως ανιονικό απορρυπαντικό για τη διάσπαση των κυτταρικών τοιχωμάτων και την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Αντίστοιχη δράση παρουσιάζει και η Proteinase K, η οποία προκαλεί την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Όμως, η πλήρης απομάκρυνση των πρωτεϊνών και των κυτταρικών υπολειμμάτων πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης με φαινόλη / χλωροφόρμιο ενώ το DNA ανακτάται μετά από κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη.

1. Ζυγίζεται 1 gr θηλυκών ατόμων και αντίστοιχη ποσότητα αρσενικών τα οποία ομογενοποιούνται ξεχωριστά με μηχανική λύση, χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο.
2. Στη συνέχεια σε δοχείο τύπου falcon, που περιέχει τους θρυμματισμένους ιστούς των εντόμων προστίθενται τα διαλύματα I και II, όγκου 12,5 ml το καθένα.
3. Έπειτα γίνεται προσθήκη 50 μl Proteinase K (50 mg/ml).

4. Πραγματοποιείται ήπια ανάδευση του τελικού διαλύματος και επώαση στους 52° C για 2 h περίπου μέχρι να παρατηρηθεί αύξηση του ιξώδους του διαλύματος (ζελατινώδης ροή).
5. Στα επόμενα βήματα πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη / χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και το ίζημα που προκύπτει επαναδιαλύεται σε 3 ml TE buffer. Αφού το ίζημα διαλυτοποιηθεί καλά με τη βοήθεια ανάδευσης φυλάσσεται στους 4° C.

2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα *Bactrocera oleae* (Fly preps)

Υλικά

Grinding Buffer: Tris (100 mM 7,5 pH), NaCl (100 mM), Sucrose (200 mM), SDS 0,5%, EDTA (50 mM)
CH₃COOK (1 M)
TE buffer

Μεθοδολογία

Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε για την απομόνωση του DNA αποτελεί τροποποιημένη μέθοδο που προτείνεται από τον Ashburner (1989). Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση DNA από μεμονωμένα θηλυκά και αρσενικά άτομα δάκου, διαφορετικών φυσικών πληθυσμών. Το πρωτόκολλο περιλαμβάνει τη χρήση διαλύματος ομογενοποίησης, Grinding Buffer, για τη λύση των κυττάρων, την κατακρήμνιση των πρωτεϊνών παρουσία αλάτων και τη χρήση ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση του DNA.

1. Ένα ενήλικο άτομο δάκου τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf, το οποίο περιέχει 100 μl διαλύματος ομογενοποίησης, Grinding Buffer.
2. Το έντομο ομογενοποιείται με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου και το ομογενοποίημα επωάζεται σε θερμοκρασία 65° C για 30 min.
3. Προστίθεται διάλυμα οξικού καλίου (CH₃COOK) τελικής συγκέντρωσης 1 M, ακολουθεί ανάδευση και επώαση στον πάγο για 30 min
4. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 14,000 g για 15 min και το υπερκείμενο εισάγεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.
5. Στη συνέχεια χωρίς να πραγματοποιηθεί εκχύλιση με φαινόλη/ χλωροφόρμιο, γίνεται κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και επαναδιάλυση του ιζήματος σε 100 μl TE buffer. Φυλάσσεται στους 4° C για σύντομο χρονικό διάστημα.

2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (Mini Prep)

Η πλήρης και αποτελεσματική απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακά κύτταρα περιλαμβάνει: α. την ανάπτυξη βακτηριακών κυττάρων, β. τη λύση των κυττάρων και γ. την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Απαιτεί την αποτελεσματική αποδιάταξη του κυτταρικού τοιχώματος, την τήρηση συνθηκών οι οποίες είτε αναστέλλουν είτε καταστρέφουν τα διάφορα αποικοδομητικά ένζυμα που απελευθερώνονται κατά τη λύση των βακτηριακών κυττάρων και το διαχωρισμό του πλασμιδιακού DNA από το χρωμοσωμικό DNA και τις πρωτεΐνες.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ακολουθείται αλκαλική λύση των βακτηριακών κυττάρων που διαλέξαμε από τα τρυβλία Petri και επώασαμε σε υγρή καλλιέργεια. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση τριών διαλυμάτων. Το διάλυμα GET το οποίο περιέχει Tris για τη διατήρηση του pH, EDTA για την αποσταθεροποίηση της κυτταρικής μεμβράνης και την παρεμπόδιση της δράσης νουκλεασών και γλυκόζης για τη διατήρηση της οσμωτικότητας. Η λύση των κυττάρων πραγματοποιείται στο διάλυμα Alkali lysis που περιέχει SDS το οποίο διαλυτοποιεί τα φωσφολιπίδια και τα πρωτεϊνικά συστατικά της μεμβράνης και NaOH, το οποίο καταστρέφει τους δεσμούς H⁺ της δίκλωνης δομής του DNA. Η εξουδετέρωση της αντίδρασης λύσης πραγματοποιείται με την προσθήκη οξικού καλίου. Το πρωτόκολλο που ακολουθείται αποτελεί τροποποίηση των μεθόδων Birnboim & Doly (1979) και Ish-Horowicz & Burke (1981).

Υλικά

GET: 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)

Alkali lysis: 0,2 N NaOH, 1% SDS

5 M potassium acetate (CH₃COOK)

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

TE-RNase: RNάση A σε συγκέντρωση 20 mg/ml.

Μεθοδολογία

1. Ήπια ανάδευση της υγρής καλλιέργειας με τη βοήθεια vortex ώστε να απομακρυνθεί το θρεπτικό μέσο.
2. Στη συνέχεια εισάγεται 1,5 ml κορεσμένης καλλιέργειας σε σωληνάκι τύπου erpendorf.
3. Φυγοκέντρηση για 3 min στις 3.000 rpm. Απόρριψη του υπερκειμένου και 1 min φυγοκέντρηση στις 14.000 rpm για να κολλήσει καλύτερα το ίζημα.
4. Ακολουθεί απόρριψη του υπερκειμένου και εισαγωγή 100 μl παγωμένου GET σε κάθε σωληνάκι. Πραγματοποιείται έντονη ανάδευση (vortex) έτσι

ώστε να διαλυθεί καλά το ίζημα. Έπειτα αφήνεται για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Τα σωληνάκια τοποθετούνται στον πάγο και σε κάθε ένα εισάγονται 200 μl διαλύματος αλκάλι. Ανακινούνται προσεκτικά και παραμένουν στον πάγο για 7-8 min. Με το αλκάλι γίνεται λύση των κυττάρων.
6. Εισάγονται 50μl παγωμένου διαλύματος CH_3COOK (σταματάει η λύση / οξύ και το NaOH βάση οπότε γίνεται εξουδετέρωση) ενώ τα σωληνάκια βρίσκονται ήδη στον πάγο. Ανακινείται καλά το περιεχόμενο και παραμένει για 7-8 min στον πάγο.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 9 min στις 14.000 rpm. Το υπερκείμενο μεταφέρεται προσεκτικά σε νέο σωλήνα.
8. Κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη
9. Επαναδιάλυση ιζήματος σε 50 μl TE RNase
10. Καθαρισμός με φαινόλη χλωροφόρμιο
11. Κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και επαναδιάλυση σε 50 μl ενέσιμου ύδατος.

2.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα ηλεκτροφόρησης (Gel Extraction)

Σκοπός της διαδικασίας είναι η απομόνωση των επιθυμητών ζωνών από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, οι οποίες στη συνέχεια μπορούν να καθαριστούν και να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις πέψης, κλωνοποίησης και αλληλούχισης. Μετά το πέρας της διαδικασίας της ηλεκτροφόρησης παρατηρούμε το πήκτωμα σε UV ακτινοβολία. Η ακτινοβολία απορροφάται από το βρωμιούχο αιθίδιο και εκπέμπεται στα 590 nm στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα να είναι ορατά τα μόρια DNA (Sharp et al., 1973). Με αυτόν τον τρόπο επιλέγουμε τις επιθυμητές ζώνες και τις κόβουμε με ειδικό νυστέρι. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Invisorb Spin DNA Extraction Kit (Invitek). Σύμφωνα με αυτό, η απομόνωση του DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται σε τρία βήματα: την τήξη του πηκτώματος σε ειδικό διάλυμα, τη σύνδεση του DNA σε μεμβράνη παρουσία αλάτων και τέλος την έκλυση του DNA σε ddH₂O.

Υλικά

Gel Solubilization Solution

Binding Enhancer

Wah Buffer

Elution Buffer

Μεθοδολογία

1. Μεταφέρουμε τις μπάντες που κόψαμε από το πήκτωμα αγαρόζης σε σωληνάκια τύπου errendorf, όγκου 1,5 ή 2 ml.
2. Ζυγίζουμε το σωληνάκι και έπειτα το σωληνάκι μαζί με το κομμάτι του πηκτώματος που περιέχει. Με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται το καθαρό βάρος του κομματιού.
3. Για κομμάτια πηκτώματος < 150 mg προσθέτουμε 500 µl Gel Solubilization Solution
Για κομμάτια πηκτώματος > 150 mg προσθέτουμε 1 ml Gel Solubilization Solution
4. Ακολουθεί επώαση σε υδατόλουτρο στους 50° C για περίπου 10 min μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα.
5. Για όγκο 500 µl προσθέτουμε 250 µl Binding Enhancer
Για όγκο 1 ml προσθέτουμε 500 µl Binding Enhancer και αναδεύουμε με τη βοήθεια πιπέτας 2-3 φορές.
6. Μεταφέρουμε τον όγκο που προκύπτει (V=800 µl) σε ένα Spin Filter και φυγοκεντρούμε στις 10.500-11.300 rpm για 1 min . Απορρίπτουμε το υγρό που παραμένει στο σωληνάκι.
7. Προσθέτουμε 500 µl Wash Buffer στο φίλτρο και φυγοκεντρούμε για 30 sec σε 9.000 rpm. Απορρίπτουμε το υγρό που έχει απομείνει στο σωληνάκι. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μία ακόμα φορά.
8. Για να απομακρύνουμε την περίσσεια αιθανόλης φυγοκεντρούμε χωρίς να κλείσουμε τα καπάκια από τα σωληνάκια για 4 min 14,000 rpm
9. Μεταφέρουμε το φίλτρο σε νέα σωληνάκια όγκου 1,5 ml και προσθέτουμε προσεκτικά στο κέντρο του φίλτρου 20 µl Elution Buffer. Αφήνουμε για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρούμε στις 9,000 rpm για 1 min. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μία ακόμα φορά.
10. Ο τελικός όγκος του διαλύματος είναι 40 µl το οποίο φυλάσσεται στο 4° C για σύντομο χρονικό διάστημα.

3. Χειρισμοί νουκλεϊκών οξέων

3.1 Εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Υλικά

Φαινόλη
Χλωροφόρμιο

Μεθοδολογία

Η εκχύλιση των νουκλεϊκών οξέων με φαινόλη / χλωροφόρμιο πραγματοποιείται για την απομάκρυνση των λιπιδίων και των πρωτεϊνών ώστε το DNA να είναι υψηλής καθαρότητας. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται φαινόλη για τον διαχωρισμό του DNA από τα λιπίδια και τις πρωτεΐνες με τη δημιουργία δυο διακριτών φάσεων, της υδατικής φάσης που βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα και της οργανικής φάσης που βρίσκονται τα λιπίδια και οι πρωτεΐνες. Η παρουσία του χλωροφορμίου έχει ως αποτέλεσμα τον καλύτερο διαχωρισμό των δύο φάσεων, προσδίδοντας μεγαλύτερη πυκνότητα στην οργανική φάση (Kakani, 2009).

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος φαινόλης/χλωροφορμίου (0,5V / 0,5V) και ακολουθεί ανάδευση μέχρι να σχηματιστεί ένα ομοιογενές γαλάκτωμα.
2. Στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 14,000 στροφές για 5 min ώστε να γίνει διαχωρισμός της οργανικής από την υδατική φάση.
3. Η υδατική φάση, στην οποία βρίσκονται τα νουκλεϊκά οξέα, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και προστίθεται ίσος όγκος διαλύματος χλωροφορμίου (1 V), αφού προηγηθεί ανάδευση, φυγοκεντρείται σε 14,000 στροφές για 5 min.
4. Στη συνέχεια η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι και πραγματοποιείται επανάληψη της εκχύλισης με χλωροφόρμιο.
5. Έπειτα, γίνεται μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο σωληνάκι και το DNA επανακτάται με κατακρήμνιση με αιθανόλη.

3.2 Κατακρήμνιση νουκλεϊκών οξέων με ισοπροπανόλη

Υλικά

CH₃COONa (0,3 M)
Ισοπροπανόλη
Αιθανόλη

Μεθοδολογία

Η κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη χρησιμοποιείται για τη συμπύκνωση, αφαλάτωση και επανάκτηση των νουκλεϊκών οξέων και πραγματοποιείται παρουσία συγκεκριμένων συγκεντρώσεων μονοσθενών κατιόντων. Η αιθανόλη αφαιρεί το ενυδατωμένο περίβλημα των νουκλεϊκών οξέων και εκθέτει τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες στα μονοσθενή κατιόντα όπως τα Na^+ , τα οποία συνδέονται με αυτές. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται οι απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των πολυνουκλεοτιδικών αλυσίδων σε τέτοιο βαθμό ώστε να σχηματίζεται ίζημα. Η κατακρήμνιση μπορεί να επιτευχθεί μόνο παρουσία επαρκούς ποσότητας κατιόντων ώστε να εξουδετερωθεί το αρνητικό φορτίο των φωσφορικών ομάδων. Η διαδικασία μπορεί να ποικίλει στη θερμοκρασία που χρησιμοποιείται για να σχηματιστεί το ίζημα, στον τύπο και στη συγκέντρωση των μονοσθενών κατιόντων που προστίθενται, στη χρήση αιθανόλης αντί ισοπροπανόλης καθώς και στο χρόνο και την ταχύτητα της φυγοκέντρησης (Kakani, 2009).

1. Σε διάλυμα DNA όγκου V προστίθεται διάλυμα οξικού νατρίου CH_3COONa τελικής συγκέντρωσης 0,3 M και ισοπροπανόλης όγκου V
2. Το μείγμα ύστερα από σχετικά ήπια ανάδευση τοποθετείται -20°C για 10 min και έπειτα φυγοκεντρείται στις 14,000 στροφές για 15 min.
3. Στη συνέχεια απομακρύνεται προσεκτικά το υπερκείμενο υγρό και προστίθεται μισός όγκος αιθανόλης 70%
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14,000 στροφές για 5 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Το ίζημα ξεραίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και επαναδιαλύεται σε υδατικό διάλυμα.

3.3 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

3.3.1 Αρχή της μεθόδου

Η τεχνική της PCR ή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από την ομάδα των ερευνητών Mullis, Faloona και Saiki της εταιρείας Cetus και αποτελεί αναμφίβολα επανάσταση στην βιοϊατρική έρευνα με ευρύτατο φάσμα εφαρμογών (Saiki et al., 1985). Το 1993 απενεμήθη στον Δρ K.Mullis το βραβείο Νόμπελ Χημείας για την καθοριστική του συμβολή στην ανακάλυψη και ανάπτυξη της τεχνικής PCR.

Η PCR αποτελεί μια γρήγορη και εύκολη διαδικασία που επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών DNA. Η μέθοδος βασίζεται σε συνεχείς κύκλους πολυμερισμού της επιλεγμένης αλληλουχίας με τη βοήθεια μίας DNA πολυμεράσης και δύο ειδικών μονόκλωνων ολιγονουκλεοτιδίων.

3.3.2 Στάδια της αντίδρασης

Κάθε κύκλος πολυμερισμού αποτελείται από τα εξής βήματα:

1. Την αποδιάταξη του DNA που πραγματοποιείται συνήθως σε θερμοκρασία 94° C για 30 sec.
2. Την υβριδοποίηση των αλυσίδων του DNA με τους αντίστοιχους συμπληρωματικούς εκκινητές. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για να γίνει η υβριδοποίηση των εκκινητών εξαρτάται από τη συγκέντρωση τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδραση για την υβριδοποίηση (Ta) ρυθμίζεται περίπου 5° C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (Tm).
3. Την επιμήκυνση από κάθε εκκινητή μιας συμπληρωματικής αλυσίδας. Ο χρόνος για την επιμήκυνση εξαρτάται από το μήκος και τη συγκέντρωση της αλληλουχίας του στόχου και από τη θερμοκρασία της αντίδρασης. Συνήθως, η επιμήκυνση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 72° C, στην οποία η Taq πολυμεράση προσθέτει 35-100 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο.

3.3.3 Συστατικά της αντίδρασης

Μια αντίδραση PCR πρέπει να περιέχει τα εξής συστατικά:

1. Τον στόχο (μήτρα) DNA, η ποσότητα του οποίου εξαρτάται από τον αριθμό των αντιγράφων του. Στις βέλτιστες συνθήκες, η τεχνική PCR μπορεί θεωρητικά να ενισχύσει την αλληλουχία στόχο από ένα μόνο αντίγραφο DNA. Ωστόσο για την κάθε αντίδραση απαιτείται συγκεκριμένης ποσότητας και ποιότητας DNA.
2. Την Taq DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοανθεκτικό βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al.1988) και επιτρέπει τη χρήση υψηλών θερμοκρασιών στα βήματα υβριδισμού και επιμήκυνσης.
3. Ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης, τα οποία παρέχονται από την παρουσία Tris-HCl και NaCl ή KCl, αντίστοιχα.
4. Κατάλληλη συγκέντρωση διαλύματος MgCl₂. Η παρουσία των Mg⁺² είναι απαραίτητη για τη δράση της πολυμεράσης. Τα ιόντα σχηματίζουν διαλυτά σύμπλοκα με τα dNTPs ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση (Harris S et al. 1997).

5. Κατάλληλο διάλυμα ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs: dATP, dTTP, dCTP, dGTP) σε συγκέντρωση 0,2 mM το καθένα, ώστε να περιοριστεί η πιθανότητα εισαγωγής λανθασμένου νουκλεοτιδίου.
6. Ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τα οποία αποκαλούνται εκκινητές και καθορίζουν τα όρια του τμήματος DNA που θα ενισχυθεί. Τα ολιγονουκλεοτίδια πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού και καθένα συμπληρωματικό προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA.

3.4. RAPDs –PCR

Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη χρήση τυχαίων εκκινητών μικρού μήκους (10 bp) οι οποίοι με την εφαρμογή της PCR ενισχύουν τμήματα της αλληλουχίας του DNA. Το μικρό μήκος των εκκινητών σε συνδυασμό με τη χαμηλή θερμοκρασία υβριδοποίησης και την αυξημένη συγκέντρωση χλωριούχου μαγνησίου MgCl₂ οδηγούν στη λήψη ικανοποιητικών πολυμορφικών προτύπων.

Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν 30 δεκαμερείς εκκινητές, τυχαίας νουκλεοτιδικής ακολουθίας, των σειρών OPA, OPB και OPP της εταιρείας Operon Technologies Inc., U.S.A. (Πίνακες 2.4.1-2).

Αλληλουχίες εκκινητών OPA (Operon Technologies)	
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'
OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA-12	5'-TCGCCGATAG-3'
OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA-17	5'-GACCCCTTGT-3'
OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA-19	5'-CAAACGTCCG-3'
OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'

Αλληλουχίες εκκινητών OPB & OPP (Operon Technologies)	
OPB-03	5'-CATCCCCCTG-3'
OPB-05	5'-TGCGCCCTTC-3'
OPB-08	5'-GTCCACACGG-3'
OPB-12	5'-CCTTGACGCA-3'
OPB-13	5'-TTCCCCCGCT-3'
OPB-19	5'-ACCCCCGAAG-3'
OPB-20	5'-GGACCCCTTAC-3'
OPP-01	5'-GTAGCACTCC-3'
OPP-02	5'-TCGGCACGCA-3'
OPP-03	5'-CTGATACGCC-3'
OPP-04	5'-GTGTCTCAGG-3'
OPP-07	5'-GTCCATGCCA-3'

Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε σωληνάκια τύπου errendorf σε τελικό όγκο 20 μl. Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε παρουσιάζεται παρακάτω (Πίνακας 3.4.3).

Πρωτόκολλο PCR-RAPDs	
DNA	40-50 ng/μl
Buffer (10x→1x)	2,00 μl
MgCl ₂ (50 mM→ 20mM)	1,00 μl
dNTPs (10 mM→ 0,2 mM)	0,4 μl
Primer (100 pmol/ul)	2,00 μl
Taq (5 u/μl: 0,2 u)	0,04 μl
ddH ₂ O	Εως τα 20 μl
V _{Final}	20,00 μl

Πίνακας 3.4.3. Πρωτόκολλο PCR-RAPDs

- Το πρωτόκολλο αυτό χρειάστηκε να τροποποιηθεί προκειμένου να παραχθεί το επιθυμητό πρότυπο ζωνώσεων.
- Η ποσότητα του DNA ποικίλει από 40-50 ng/μl με βάση τον εκκινητή που χρησιμοποιείται κάθε φορά.
- Το Buffer της Taq πολυμεράσης περιέχει MgCl₂ όμως ορισμένοι εκκινητές απαιτούν αυξημένη συγκέντρωση MgCl₂ ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα της υβριδοποίησης.

Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στον ίδιο θερμικό κυκλοποιητή. Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε, με τις θερμοκρασίες και τα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 3.4.4).

Πρόγραμμα PCR-RAPDs	
Initial denaturation	94°C, 4 min
Denaturation	94°C, 1min
Primer annealing	35 °C,1 min
Extension	72°C, 90 sec
Final extension	72°C, 5 min

Πίνακας 3.4.4. Πρόγραμμα PCR-RAPDs

3.5 re-PCR

Η re-PCR χρησιμοποιείται για τη σημαντική αύξηση της ευαισθησίας της αντίδρασης PCR, ιδιαίτερα όταν θέλουμε να ενισχύσουμε μία σπάνια αλληλουχία. Στην αντίδραση αυτή, ως μήτρα χρησιμοποιείται το PCR προϊόν που μας ενδιαφέρει. Στην παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της RAPD-PCR και στη συνέχεια επιλέχθηκαν οι επιθυμητές αλληλουχίες. Οι αλληλουχίες αυτές αποτέλεσαν τη μήτρα για την εφαρμογή της re-PCR.

Το πρωτόκολλο και το πρόγραμμα της αντίδρασης re-PCR είναι όμοια με της αντίδρασης RAPD-PCR (Πίνακες 3.4.3-4).

3.6 SCAR- PCR

Η μέθοδος αυτή αποτελεί εφαρμογή της κλασσικής αντίδρασης PCR. Στις αντιδράσεις χρησιμοποιούνται ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές για την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει. Συγκεκριμένα, μετά την ολοκλήρωση της τεχνικής των RAPDs επιλέγονται οι μπάντες που εμφανίστηκαν να είναι πολυμορφικές μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων. Οι μπάντες αυτές είναι δυνατόν να κλωνοποιηθούν και να αλληλουχηθούν. Η αποκάλυψη της αλληλουχίας διευκολύνει στο σχεδιασμό των ειδικών εκκινητών. Όλες οι αντιδράσεις έγιναν σε σωληνάκια τύπου erpendorf σε τελικό όγκο 20 μl. Το πρωτόκολλο και το πρόγραμμα που εφαρμόστηκαν παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 3.6.1-2).

Πρωτόκολλο SCAR- PCR	
DNA	30 ng/μl
Buffer (10x→1x)	2,00 μl
dNTPs (10 mM→ 0,2 mM)	0,04 μl
Primer Forward (100 pmol/ul)	2,00 μl
Primer Reverse (100 pmol/ul)	2,00 μl
Taq (5 u/μl: 0,2 u)	0,2 μl
ddH ₂ O	12 μl
V _{Final}	20,00 μl

Πίνακας 3.6.1. Πρωτόκολλο SCAR-PCR

Πρόγραμμα SCAR- PCR	
Initial denaturation	94°C, 4 min
Denaturation	94°C, 1min
Primer annealing	53°C, 1 min
Extension	72°C, 90 sec
Final extension	72°C, 5 min

Πίνακας 3.6.2. Πρόγραμμα SCAR- PCR

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στη αντίδραση SCAR-PCR φαίνονται παρακάτω.

Αλληλουχία εκκινητών

Forward: 5'-ATCGTATGGGCATCATCGGA-3'

Reverse: 5'-CCTTGACGCACCAGCTAAAA-3'

3.7 Κλωνοποίηση τμημάτων DNA σε πλασμιδιακούς φορείς

3.7.1 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation)

Η κατασκευή ενός ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στην πιο απλή της μορφή περιλαμβάνει μια διαμοριακή αντίδραση στην οποία το ένα άκρο ενός γραμμικού πλασμιδιακού φορέα συνδέεται με το ένα άκρο του ενθέματος με τη δράση της DNA λιγάσης για το σχηματισμό μιας γραμμικής DNA χίμαιρας και ακολουθείται από κυκλοποίηση με την πρόσδεση των δύο εναπομεινάντων άκρων.

Σκοπός της διαδικασίας είναι η σύνδεση των επιθυμητών αλληλουχιών DNA (ένθεμα) με το φορέα κλωνοποίησης pBlueScript II μέσω της δράσης του ενζύμου T4 DNA λιγάσης. Οι αλληλουχίες DNA διαθέτουν προξέχοντα 3' άκρα εξαιτίας της ιδιότητας της Taq Πολυμεράσης να προσθέτει μία αδείνη στο 3' άκρο των προϊόντων PCR. Από την άλλη πλευρά ο φορέας, πέπτεται με ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRV και ακολουθεί μια αντίδραση του τύπου PCR που έχει ως σκοπό να δημιουργήσει προεξέχοντα άκρα θυμίνης. Επομένως, το ένζυμο T4 DNA λιγάση συνδέει τα 3' προεξέχοντα Τ-άκρα του φορέα με τα συμπληρωματικά 3' προεξέχοντα Α-άκρα του ενθέματος (Sgaramella 1978).

Μεθοδολογία

1. Για την ποσοτικοποίηση του ενθέματος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση του δείγματος (5 μl) σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.
2. Σε σωληνάκι προστίθενται η κατάλληλη ποσότητα φορέα συγκέντρωσης (50 ng/μl ή 60 ng/μl), 1μl Buffer T4 λιγάσης, κατάλληλη ποσότητα ενθέματος, ddH₂O ώστε να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης και τέλος 1 μl T4 λιγάσης.
3. Το μείγμα αναδεύεται με πιπέτα και επωάζεται στους 22° C για 2,5 h
4. Το ένζυμο απενεργοποιείται είτε με θέρμανση στους 65° C για 15 min είτε ψύχεται στους -20° C

➤ Η ποσότητα του ενθέματος που απαιτείται σε ng, εξαρτάται από τον τύπο του πλασμιδίου και υπολογίζεται από τον τύπο :

ng ενθέματος= ποσότητα φορέα (ng) x μέγεθος ενθέματος (bp)/ μέγεθος φορέα (bp)

Αυτή η αναλογία κυμαίνεται από 3:1 μέχρι 8:1

Αντίδραση σύνδεσης (Ligation)	
DNA	(...) ng/μl
Buffer (10x→1x)	1,00 μl
Φορέας	(...) μl
T4 DNA λιγάση	0,2 μl
ddH ₂ O	Εως τα 10 μl
V _{Final}	10,00 μl

Πίνακας 3.7.1. Αντίδραση σύνδεσης (Ligation)

3.7.2 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων (Electroporation cells)

Υλικά

Υγρό θρεπτικό υλικό καλλιέργειας, LB-Broth (100 ml) : 0,5 gr NaCl , 1,5 gr LB-Broth, 100ml H₂O

Stock γλυκερόλης κυττάρων *E.coli*

Γλυκερόλη 10 %

ddH₂O

Μεθοδολογία

1. Αποστειρωμένο, υγρό θρεπτικό μέσο LB-broth (1 ml) ενοφθαλμίζεται με βακτηριακή καλλιέργεια *E. coli* από το stock γλυκερόλης που φυλάσσεται στους -80°C και επωάζεται (overnight) στους 37°C, στις 210 rpm.
2. Μετά το πέρας της επώασης η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε κωνική φιάλη η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο LB-Broth (100 ml) και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση.
3. Μετά από χρονικό διάστημα 2 ωρών πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 600 nm. Η οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,46-0,6.
4. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε σωλήνες τύπου falcon και ψύχεται σε πάγο για 10min
5. Τα falcon φυγοκεντρούνται σε 4.200 g στους 4°C για 15 min
6. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα των κυττάρων απαναδιαλύεται με ήπια ανάδευση σε 50ml παγωμένο ddH₂O

7. Επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση, το υπερκείμενο απορρίπτεται άμεσα ώστε να μην αποκολληθεί το ίζημα των κυττάρων, το οποίο επαναδυσάλυεται σε 50ml παγωμένο ddH₂O.
8. Πραγματοποιείται πάλι φυγοκέντρηση, το υπερκείμεο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδυσάλυνονται στο υγρό που απέμεινε.
9. Γίνεται προσθήκη διαλύματος γλυκερόλης 10% (4ml/ falcon) και ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4.200 g στους 2°C για 10min.
10. Το υπερκείμεο απομακρύνεται, στο ίζημα προστίθεται γλυκερόλη 10% (250μl/ falcon) και μοιράζεται σε κλάσματα (40μl) σε παγωμένα σωληνάκια τύπου erpendorf.
11. Τα κλάσματα αποθηκεύονται στους -80° C

-
- Είναι πολύ σημαντικό κατά την πραγματοποίηση της διαδικασίας, η μετάβαση στις διαφορετικές θερμοκρασίες να μην είναι απότομη αλλά να γίνεται ομαλά και διαδοχικά έτσι ώστε τα βακτηριακά κύτταρα να μην υποστούν θερμικό σοκ και καταστραφούν.
 - Η επώαση στο στάδιο (2) μπορεί να ξεπεράσει τις 2 ώρες μέχρις ότου τα κύτταρα να φθάσουν στο επιθυμητό στάδιο ωρίμανσης με την οπτική απορρόφηση της καλλιέργειας να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,46-0,6.

3.7.3 Τιτλοδότηση δεκτικών κυττάρων

Σκοπός της διαδικασίας είναι να υπολογιστεί πόσα βακτηριακά κύτταρα είναι ικανοποιητικά δεκτικά. Γίνεται καταμέτρηση των αποικιών και έπειτα αναγωγή σε μονάδες rfu / μl. Ο αριθμός των δεκτικών βακτηριακών κυττάρων κρίνεται ικανοποιητικός όταν κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 10⁸-10¹⁰ rfu / μl.

Υλικά

SOC medium (1 L) : 950 ml H₂O, 20 g bacto-tryptone, 5 g bacto-yeast extract, 0,5 g NaCl, 10ml KCl solution (250 mM pH 7,2), 5 ml MgCl₂ (2 M), 20 ml glucose (1 M)
X-gal (20 mg/ml)
IPTG (200 mg/ml)

Μεθοδολογία

1. Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων (40 μ l) με 2 μ l φορέα.
2. Προσθήκη 700 μ l SOC.
3. Σε 5 μ l, 10 μ l και 15 μ l από τα μετασχηματισμένα βακτήρια προστίθενται 95 μ l, 90 μ l, 85 μ l H₂O (τελικός όγκος 100 μ l), X-gal (30 μ l) και IPTG (3 μ l).
4. Οι παραπάνω αραιώσεις επιστρώνονται σε τρυβλία και επωάζονται στους 37°C για 14-16 ώρες.
5. Μετά το πέρας της επώασης καταμετρούνται οι αποικίες των μετασχηματισμένων βακτηρίων.

3.7.4 Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων (Electroporation)

Κατά την ηλεκτροδιάτρηση τα κύτταρα-δέκτες αναμειγνύονται με εξωγενές DNA σε ειδικές κυψελίδες που φέρουν μεταλλικό έλασμα. Το μεταλλικό έλασμα έρχεται σε επαφή με τροφοδοτική συσκευή μέσω ηλεκτροδίων. Από την συσκευή διοχετεύεται ένας σύντομος ηλεκτρικός παλμός (msec) πολύ υψηλής τάσης (kV), προκαλώντας παροδικούς πόρους στην κυτταρική μεμβράνη των κυττάρων (Wirth et al, 1989). Μέσω των πόρων εισέρχεται το εξωγενές DNA στα κύτταρα που μεταφέρονται στην συνέχεια σε θρεπτικό μέσο. Το εισερχόμενο DNA στα περισσότερα κύτταρα υφίσταται ως εξωχρωμοσωμικό γενετικό υλικό ενώ σε ένα μικρό ποσοστό κυττάρων εισέρχεται στον πυρήνα και ενσωματώνεται στο γονιδίωμα μέσω ανασυνδυασμού (Watson 2007).

Υλικά

Κλάσμα δεκτικών κυττάρων E.coli (40 μ l)

Ανασυνδυασμένα πλασμίδια (αντίδραση σύνδεσης ligation)

Στερεό θρεπτικό υλικό LB-άγαρ: 10 gr Bactrotryptone, 5 gr Bacto-yeast extract, 15 gr Arg και 5 gr NaCl ανά λίτρο.

LB-αμπικιλίνης: Αποστειρώνεται LB-agar και όταν η θερμοκρασία πέσει στους 55°C προστίθεται 1 μ l για κάθε 1 ml LB agar.

Θρεπτικό υλικό SOC: 20 gr Tryptone, 5 gr Yeast extract, 0,5 gr NaCl, 20 ml glycose 1 M ανά λίτρο

X-gal 20 mg/ml

IPTG 200 mg/ml

Μεθοδολογία

1. Κλάσματα (40 μl) παρασκευασμένων για ηλεκτροδιάτρηση δεκτικών κυττάρων E.coli τήκονται από τους -80° C σε πάγο.
2. Σε σωληνάκι το οποίο περιέχει δεκτικά κύτταρα E.coli προσθέτουμε 2 μl ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (ligation), το αναδεύουμε ελαφρά και το αφήνουμε στον πάγο για 1 min.
3. Στη συνέχεια μεταφέρουμε τα κύτταρα που έχουν αναμειχθεί με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο σε κυψελίδα ηλεκτροδιάτρησης. Το μείγμα προστίθεται με τη βοήθεια πιπέτας πολύ προσεκτικά στο κέντρο της κυψελίδας.
4. Η κυψελίδα τοποθετείται σε ειδική υποδοχή στο μηχάνημα ηλεκτροδιάτρησης.
5. Αμέσως σε χρονικό διάστημα 1 λεπτού προσθέτουμε 700 μl SOC, αναδεύουμε 2-3 φορές με την πιπέτα και το υλικό μεταφέρεται σωλήνα καλλιέργειας.
6. Στη συνέχεια τοποθετούμε τους σωλήνες καλλιέργειας για 45 min στους 37° C στις 180 rpm.
7. Επιλέγεται η επιθυμητή ποσότητα (150 μl) από το υλικό επώασης και προστίθενται 30 μl X-gal και 3 μl IptG. Έπειτα το μίγμα επιστρώνεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε τρυβλία petri LB-agar-αμπικιλίνη.
8. Ακολουθεί επώαση στους 37° C για 14-16 ώρες.

-
- Όλα τα υλικά που απαιτούνται για να πραγματοποιηθεί η διαδικασία πρέπει να βρίσκονται στον πάγο. Είναι πολύ σημαντικό τα στάδια να πραγματοποιούνται εντός των χρονικών πλαισίων που έχουν ορισθεί.
 - Τα 2μl ανασυνδυασμένου πλασμιδίου αποτελούν το 1 / 10 της αντίδρασης σύνδεσης (1 μl ligation + 9 μl H₂O)
 - Η κυψελίδα πρέπει να βρίσκεται στους -20° C μέχρι να πραγματοποιηθεί η διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης.

3.7.5 Διάκριση ανασυνδυασμένων και μη ανασυνδυασμένων κλώνων

Η επιλογή των μετασηματισμένων κλώνων, αυτών δηλαδή που έχουν προσλάβει το πλασμίδιο ανασυνδυασμένο ή μη, πραγματοποιείται με την παρουσία του αντιβιοτικού που υπάρχει στο θρεπτικό μέσο των τρυβλίων. Η επιλογή των βακτηρίων που έχουν προσλάβει ανασυνδυασμένο πλασμίδιο πραγματοποιείται με τον έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας. Τα πλασμίδια-φορείς που χρησιμοποιούνται στην α-συμπληρωματικότητα φέρουν: 1. Ένα τμήμα του DNA της E.coli που περιέχει τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και την κωδική πληροφορία των πρώτων 146 αμινοξέων του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (lacZ) και 2. Την αλληλουχία του πολυσυνδέτη ενσωματωμένη στο γονίδιο lacZ. Ο πολυσυνδέτης δηλαδή δε διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο αλλά απλώς προσθέτει κάποια αμινοξέα στο προϊόν του γονιδίου. Οι φορείς αυτοί χρησιμοποιούνται σε βακτηριακά στελέχη τα οποία κωδικοποιούν το καρβοξυτελικό τμήμα της β-γαλακτοσιδάσης. Με τον τρόπο αυτό ούτε οι φορείς ούτε τα κύτταρα μπορούν από μόνα τους να δώσουν μία ενεργή μορφή, μπορούν όμως να συνδυαστούν και να δώσουν μια ενζυμικά ενεργή πρωτεΐνη. Τα lac⁺ βακτήρια γίνονται εύκολα αντιληπτά λόγω της δημιουργίας μπλέ αποικιών παρουσία του χρωμογόνου υποστρώματος X-gal. Συνεπώς, εάν το πλασμίδιο δεν έχει ανασυνδυαστεί, το γονίδιο lacZ εκφράζεται κανονικά και σε συνδυασμό με τα γονίδια βακτηρίου-ξενιστή επιτρέπει το μεταβολισμό της ουσίας X-gal και της δημιουργίας μπλέ αποικιών. Αντίθετα, εάν το πλασμίδιο είναι ανασυνδυασμένο το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του γονιδίου lacZ διακόπτεται, το X-gal δεν μεταβολίζεται και ως αποτέλεσμα οι αποικίες που παράγονται έχουν χρώμα λευκό. Έτσι, παρουσία X-gal και IPTG, το οποίο λειτουργεί ως επαγωγέας σε ορισμένα βακτηριακά στελέχη στο θρεπτικό μέσο των τρυβλίων, οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο παρουσιάζουν λευκό χρώμα, ενώ αυτές που περιέχουν το κανονικό πλασμίδιο είναι, κατά κανόνα, μπλέ (Watson, 2007).

4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων

4.1 Με χρήση φασματοφωτόμετρου

Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων μέσω φωτομέτρησης βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA και το RNA απορροφούν εκλεκτικά στα 260 nm του φάσματος της υπεριώδους ακτινοβολίας (UV). Η τιμή της οπτικής απορρόφησης 1 ($OD_{260} = 1$) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ δίκλωνου DNA, 40 $\mu\text{g/ml}$ μονόκλωνου DNA ή και $\sim 20\mu\text{g/ml}$ για μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια. Ο λόγος των τιμών OD στα 260nm και 280nm παρέχει μια εκτίμηση της καθαρότητας του DNA, δηλαδή κατά πόσο αυτό είναι απαλλαγμένο από πρωτεΐνες. Για καθαρά διαλύματα DNA ο λόγος OD_{260}/OD_{280} κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0. Επειδή κατά τη διαδικασία απομόνωσης DNA απομονώνονται όλα τα νουκλεϊκά οξέα του κυττάρου, DNA και RNA, τα οποία απορροφούν στα ίδια μήκη κύματος, πραγματοποιούμε επώαση των δειγμάτων με RNase για την απομάκρυνση τυχόν μορίων RNA από το δείγμα μας, τα οποία θα επηρεάζουν τις μετρήσεις.

4.2 Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Ο ποσοτικός προσδιορισμός του DNA μέσω ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης ενδείκνυται σε περιπτώσεις χαμηλής συγκέντρωσης ή καθαρότητας των προς εξέταση δειγμάτων. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην ιδιότητα του δίκλωνου DNA να συνδέεται με την ένωση βρωμιούχο αιθίδιο, με τα μόρια της οποίας φωσφορίζουν κάτω από το υπεριώδες φως. Η σύνδεση αυτή και η ένταση φθορισμού είναι ανάλογη της ποσότητας DNA. Η εκτίμηση της συγκέντρωσης γίνεται συγκρίνοντας το φθορισμό που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA με το φθορισμό γνωστής συγκέντρωσης και μήκους DNA (μάρτυρας-ladder). Η διακριτική δυνατότητα του πηκτώματος αγαρόζης 1% είναι περίπου 10 ng DNA.

Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον καθορισμό κομματιών DNA. Βασίζεται στην αρχή της μετανάστευσης φορτισμένων μορίων κάτω από την επίδραση ενός εξωτερικού εφαρμοζόμενου ηλεκτρικού πεδίου. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια του DNA προς την άνοδο. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πηκτώματα αγαρόζης εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

- Το μέγεθος του DNA. Γραμμικά δίκλινα DNA κινούνται σε ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του log του μοριακού βάρους.
- Την συγκέντρωση της αγαρόζης. Η κινητικότητα ενός κομματιού DNA διαφέρει σε πήκτωμα διαφορετικής συγκέντρωσης αγαρόζης. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα διαφορετικών συγκεντρώσεων μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα μεγάλο εύρος μεγεθών DNA.

- Τη στερεοδιάταξη του DNA. Η κλειστή (υπερελικωμένη) κυκλική μορφή (μορφή I), η ανοιχτή κυκλική μορφή (μορφή II) και το 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 αγαρόζης στο πήκτωμα, αλλά επηρεάζονται επίσης από την ένταση του ρεύματος, την ιονική ισχύ του ρυθμιστικού διαλύματος και τον βαθμό υπερελίκωσης της μορφής I του DNA. Κάτω από ορισμένες συνθήκες, η μορφή I κινείται γρηγορότερα από την III. Κάτω από άλλες συνθήκες συμβαίνει το αντίστροφο.
- Την ένταση του ρεύματος. Σε χαμηλή τάση η κινητικότητα των γραμμικών κομματιών DNA είναι ανάλογη με τα volts που χρησιμοποιούνται. Σε υψηλότερη ένταση η κινητικότητα κομματιών DNA μεγάλου μοριακού βάρους αυξάνεται με διαφορετικό συντελεστή σε κάθε κομμάτι DNA.
- Την παρουσία χρωστικών. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, περισσότερη χρωστική δεσμεύεται στο DNA. Έτσι, αναιρούνται προοδευτικά οι αρνητικές στροφές υπερέλικας της μορφής I και η κινητικότητά της. Στο σημείο συγκέντρωσης ελεύθερου βρωμιούχου αιθιδίου, όταν δεν υπάρχουν πλέον στροφές υπερέλικας, η μορφή I αποκτά την ελάχιστη κινητικότητά της. Αν αυξηθεί ακόμα περισσότερο η συγκέντρωση βρωμιούχου αιθιδίου, δημιουργούνται θετικές στροφές υπερέλικας και η κινητικότητα της μορφής I αυξάνεται γρήγορα. Οι κινητικότητες των μορφών II και III μειώνονται με διαφορετικό βαθμό η καθεμία.
- Τη σύσταση και την ιοντική ισχύς του διαλύματος ηλεκτροφόρησης. Απουσία ιόντων η ηλεκτρική αγωγιμότητα είναι ελάχιστη και το DNA μετακινείται με πολύ αργό ρυθμό ή καθόλου. Διαλύματα με υψηλό βαθμό ιοντισμού δημιουργούν υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα που σαν αποτέλεσμα έχει την ανάπτυξη θερμότητας στη συσκευή. Στη χειρότερη περίπτωση, το πήκτωμα λειώνει και το DNA αποδιατάσσεται (Kakani, 2009).

Υλικά

Loading Buffer: 0,25% μπλέ της βρωμοφαινόλης, 0,25% κυανό της ξυλόλης, 15% φικόλη (type 400, Pharmacia)

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

Αγαρόζη

Βρωμιούχο αιθίδιο

Ladder

Μεθοδολογία

1. Ζυγίζεται η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης η οποία αναμιγνύεται με συγκεκριμένο όγκο ρυθμιστικού διαλύματος ηλεκτροφόρησης συνήθως 0,5 X TBE. Η αγαρόζη διαλύεται με τη βοήθεια βρασμού ώσπου το διάλυμα να γίνει τελείως διαυγές.
2. Στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 0,1 µg/ml.
3. Πριν τη στερεοποίηση του πηκτώματος, το διάλυμα εισάγεται σε ένα γυάλινο καλούπι συγκεκριμένων διαστάσεων (μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής). Οι θέσεις των δειγμάτων DNA (πηγαδάκια) σχηματίζονται με τη βοήθεια ειδικής μήτρας που τοποθετείται στη συσκευή (χτενάκια) πριν τον πολυμερισμό του πηκτώματος.
4. Στα δείγματα DNA που πρόκειται να αναλυθούν προστίθεται διάλυμα χρωστικής Loading buffer.
5. Όταν στερεοποιηθεί το διάλυμα τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (αντίστοιχο με αυτό που έχει κατασκευαστεί το πήκτωμα) τόσο ώστε να επικαλύπτει το πήκτωμα.
6. Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγαδάκια και αναλύονται σε οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης.
7. Προκειμένου να είναι δυνατή η εκτίμηση του μεγέθους των τμημάτων DNA που αναλύονται, ηλεκτροφορείται μαζί με τα δείγματα και ο μάρτυρας μοριακών βαρών (ladder).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA

Το DNA που χρησιμοποιήθηκε για τη διεξαγωγή των πειραμάτων απομονώθηκε από 100 θηλυκά και από 100 αρσενικά άτομα δάκου εργαστηριακού πληθυσμού. Η διαδικασία πραγματοποιήθηκε με ομογενοποίηση των ιστών των εντόμων χρησιμοποιώντας υγρό άζωτο. Η μαζική απομόνωση γενετικού υλικού έχει σκοπό τη μεγιστοποίηση της πιθανότητας ανεύρεσης διαφορών, κάτι που θα μπορούσε να διαφύγει σε περίπτωση σύγκρισης ενός μονάχα αρσενικού και ενός θηλυκού ατόμου. Όμως, σε περίπτωση εντοπισμού κάποιας διαφοράς, αυτή θα πρέπει να επιβεβαιωθεί σε πολλά μεμονωμένα άτομα. Η ποσοτικοποίηση των νουκλεϊκών οξέων έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης αλλά η συγκέντρωση προσδιορίστηκε με μεγαλύτερη ακρίβεια με φωτομέτρηση στα 260nm.

Δεδομένου ότι τιμή της οπτικής απορρόφησης 1 ($OD_{260} = 1$) αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/ml}$ δίκλωνου DNA είναι δυνατό να υπολογιστεί η συγκέντρωση του pool DNA τόσο του θηλυκού όσο και του αρσενικού δείγματος. Οι τιμές της οπτικής απορρόφησης και συγκέντρωσης των δειγμάτων παρουσιάζονται παρακάτω (Πίνακας 1.1)

Δείγματα	OD 260nm	Συγκέντρωση (ng/ μl)
Θηλυκό pool DNA	0,083	300
Αρσενικό Pool DNA	0,046	160

Πίνακας 1.1. Τιμές οπτικής απορρόφησης και συγκεντρώσεις DNA

2. PCR-RAPDs

Στις αντιδράσεις PCR-RAPD, χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο τριάντα εκκινητών (Πίνακες 3.4.1 και 3.4.2), εκ των οποίων μόνο οι τέσσερις έδωσαν προϊόν ενίσχυσης. Εφαρμόστηκαν τόσο σε θηλυκό όσο και σε αρσενικό γενετικό υλικό αλλά μόνο το θηλυκό έδωσε προϊόν. Πραγματοποιήθηκαν αρκετές παραλλαγές στο αρχικό πρωτόκολλο προκειμένου να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες που απαιτούνταν για να είναι αποδοτική η PCR-ενίσχυση. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις γενετικού υλικού (μήτρα), οι οποίες, κυμαίνονταν από 40-75 ng/ μl . Η υπερβολική αύξηση της συγκέντρωσης του γενετικού υλικού οδήγησε σε “smear” μπάντες ενώ σε κάποιες περιπτώσεις ανέστειλε την αντίδραση. Αδυναμία ενίσχυσης παρατηρήθηκε και στην περίπτωση που η συγκέντρωση του γενετικού υλικού είχε μειωθεί αρκετά. Η ιδανική συγκέντρωση υπολογίστηκε στα 40-50 ng γονιδιωματικού DNA ανάλογα με τον εκκινητή που χρησιμοποιούταν κάθε φορά. Επίσης δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις χλωριούχου μαγνησίου (MgCl_2), οι οποίες, κυμαίνονταν από 1,5-4mM. Επειδή το

ρυθμιστικό διάλυμα της Taq πολυμεράσης περιείχε ήδη $MgCl_2$ συγκέντρωσης 1,5 mM στην περίπτωση συγκεκριμένων εκκινητών χρειάστηκε επιπλέον ποσότητα $MgCl_2$. Η επιπλέον ποσότητα των ιόντων μαγνησίου αυξάνει την πιθανότητα υβριδισμού των εκκινητών και την παραγωγή μη ειδικών προϊόντων. Εξαιτίας του γεγονότος ότι οι εκκινητές είναι τυχαίοι, δηλαδή η αλληλουχία τους δεν είναι ακριβώς συμπληρωματική με την αλληλουχία της μήτρας που χρησιμοποιείται, η θερμοκρασία υβριδοποίησης τους μειώθηκε από τους 40° C στους 36° C έτσι ώστε να αυξηθεί η πιθανότητα ενίσχυσης.

Στους παρακάτω πίνακες (Πίνακες 2.1 και 2.2) παρουσιάζονται οι τροποποιημένες εκδοχές του αρχικού πρωτοκόλλου με βάση τον εκκινητή που χρησιμοποιήθηκε κάθε φορά.

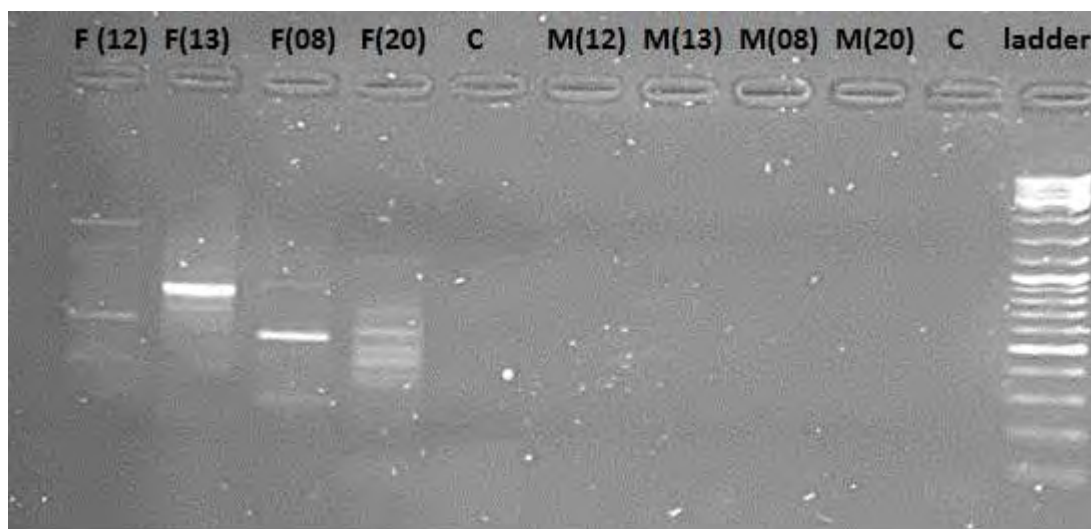
Πρωτόκολλο PCR-RAPDs Primers OPA 12 & OPA 20	
DNA	50 ng/μl
Buffer (10x→1x)	2,00 μl
DNTPs (10 mM→ 0,2 mM)	0,4 μl
Primer	2,00 μl
Taq (5 u/μl: 0,2 u)	0,04 μl
ddH ₂ O	Έως τα 20 μl
V _{Final}	20,00 μl

Πίνακας 2.1. Πρωτόκολλο PCR-RAPDs Primers OPA 08 & OPA 13

Πρωτόκολλο PCR-RAPDs Primers OPA 08 & OPA 13	
DNA	40 ng/μl
Buffer (10x→1x)	2,00 μl
dNTPs (10 mM→ 0,2 mM)	0,4 μl
Primer	2,00 μl
Taq (5 u/μl: 0,2 u)	0,04 μl
ddH ₂ O	Έως τα 20 μl
V _{Final}	20,00 μl

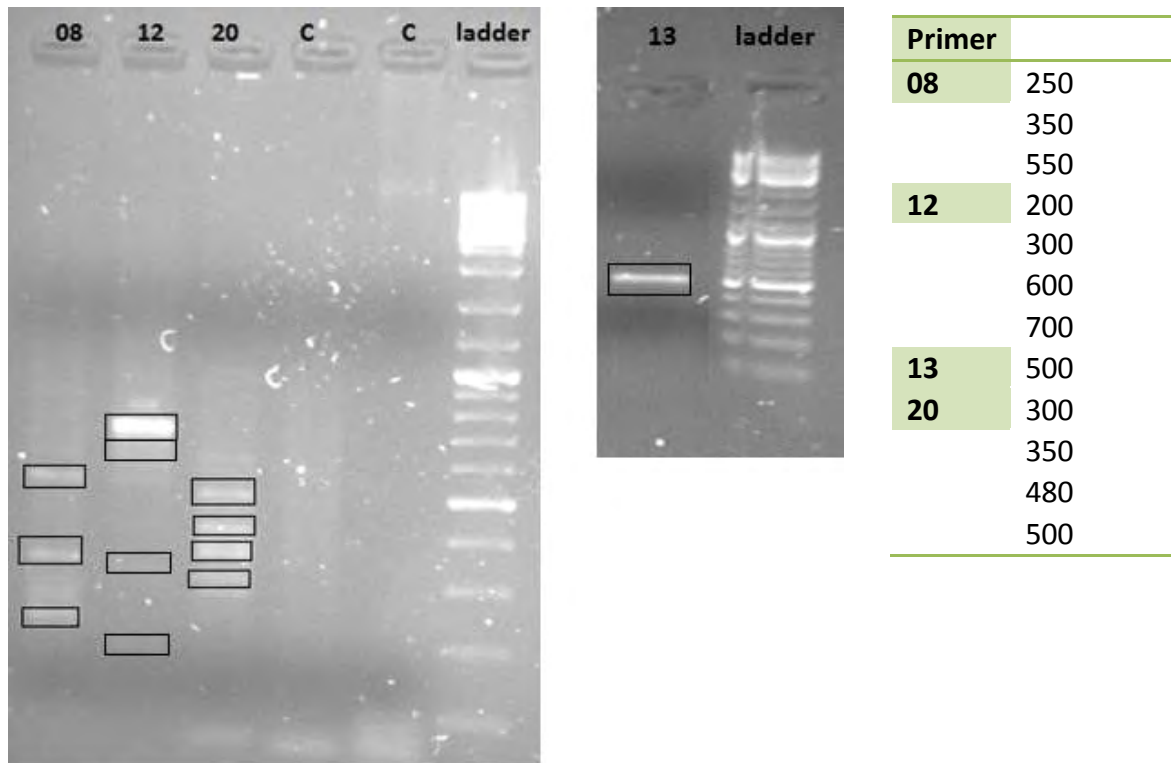
Πίνακας 2.2. Πρωτόκολλο PCR-RAPDs Primers OPA 12 & OPA 20'

Τα προϊόντα ενίσχυσης της αντίδρασης PCR-RAPDs ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 1,5%. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 2.1) παρουσιάζεται το χαρακτηριστικό πρότυπο ζωνώσεων που προέκυψε μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης. Με το γράμμα "F" συμβολίζονται τα θηλυκά άτομα (female), ενώ με το "M" τα αρσενικά (male). Το γράμμα "C" συμβολίζει τον αρνητικό μάρτυρα (control δείγμα). Ο αριθμός δίπλα στο γράμμα συμβολίζει τον εκκινητή που χρησιμοποιείται κάθε φορά.



Εικόνα 2.1. Χαρακτηριστικό πρότυπο ζωνών αντίδρασης PCR-RAPDs

Παρατηρούμε ότι με τη χρήση των επιλεγμένων εκκινητών παράχθηκε προϊόν ενίσχυσης μόνο από το DNA των θηλυκών ατόμων ενώ το DNA των αρσενικών δεν έδωσε κάποιο χαρακτηριστικό πρότυπο ζωνώσεων. Προκειμένου να διερευνηθεί η προέλευση αυτών των ζωνώσεων και να αποδειχθεί αν όντως πρόκειται για φυλοειδικές αλληλουχίες, πραγματοποιήθηκε απομόνωση των επιθυμητών ζωνών (gel extraction). Χρησιμοποιώντας ειδικό νυστέρι απομονώθηκαν οι μπάντες της εικόνας (Εικόνα 2.2) που περιβάλλονται από πλαίσιο.

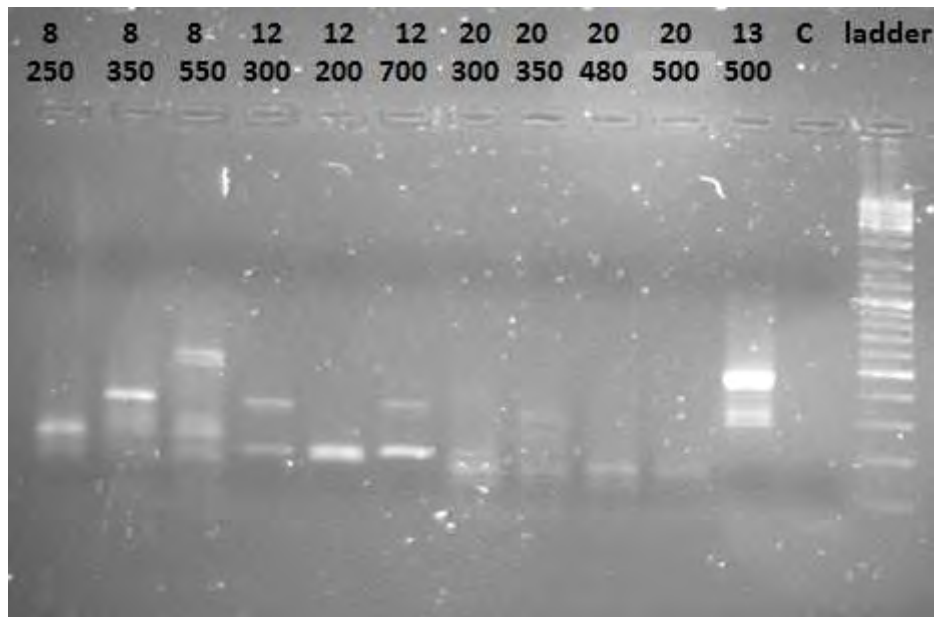


Εικόνα 2.2. Επιλογή ζωνών από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης

3. re-PCR

Μετά την ανάκτηση των ενισχυμένων αλληλουχιών από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, το γενετικό υλικό επαναδιαλύθηκε σε 40μl Elution Buffer και χρησιμοποιήθηκε για την πραγματοποίηση μιας επαναληπτικής αντίδρασης PCR-RAPDs. Σκοπός της διαδικασίας αυτής είναι η αύξηση της ποσότητας του γενετικού υλικού έτσι ώστε να είναι επαρκής για περαιτέρω χειρισμούς. Στην αντίδραση Re-PCR εφαρμόστηκαν τα πρωτόκολλα των πινάκων (Πίνακες 2.1 και 2.2) με τη διαφοροποίηση ότι ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε 1 μl από τον όγκο των 40μl.

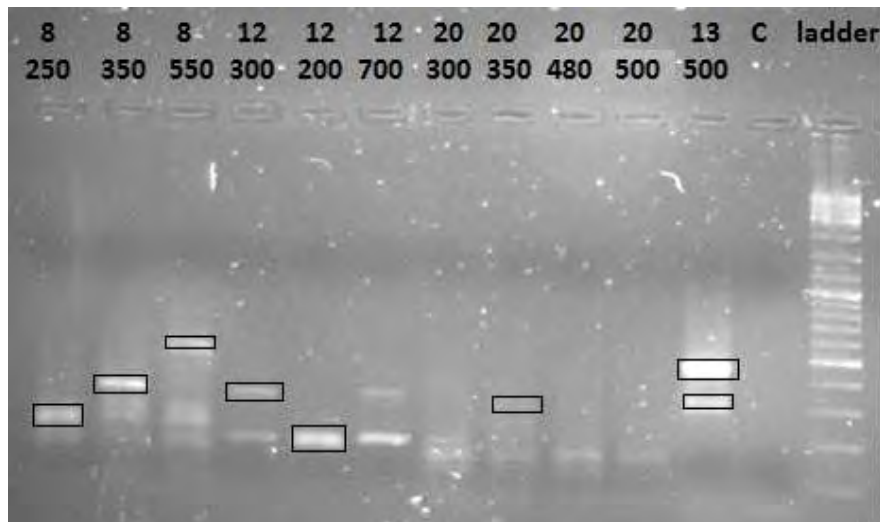
Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, συγκέντρωσης 1,5%. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.1) παρουσιάζεται το χαρακτηριστικό πρότυπο ζωνώσεων που προέκυψε.



Εικόνα 3.1. Χαρακτηριστικό πρότυπο ζωνών αντίδρασης re-PCR

Οι αριθμοί στην εικόνα συμβολίζουν τον εκκινητή (π.χ 8) και το μέγεθος της μπάντας (π.χ 250 bp) που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα για την αντίδραση re-PCR.

Αναμέναμε πιο ειδική ενίσχυση, ωστόσο, η φύση της μεθόδου οδηγεί στη δημιουργία παραπροϊόντων. Στη συνέχεια ακολούθησε ανάκτηση των επιθυμητών ζωνών από το πήκτωμα αγαρόζης. Απομονώθηκαν οι μπάντες της εικόνας (Εικόνα 3.2) που περιβάλλονται από πλαίσιο. Το γενετικό υλικό που απομονώθηκε επαναδιαλύθηκε σε 40μl Elution Buffer προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για τη διαδικασία της κλωνοποίησης.



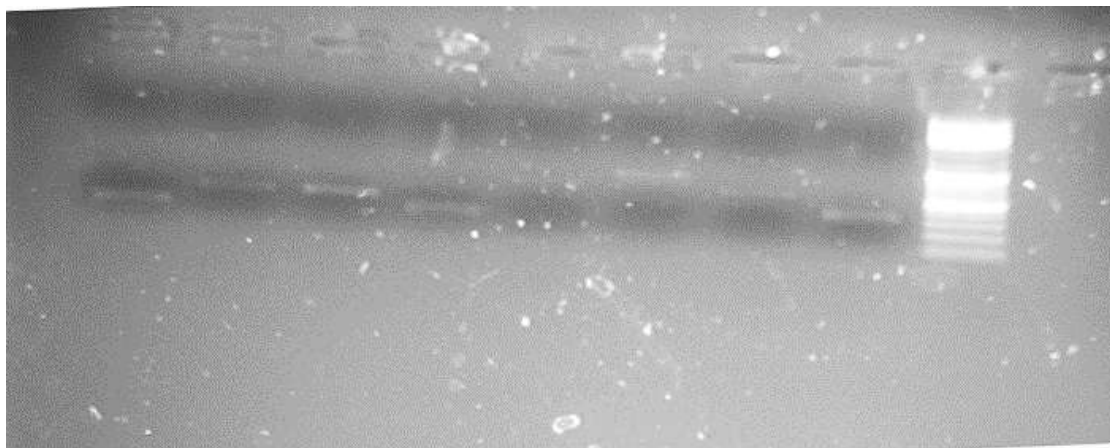
Primer	Size (bp)
08	250
	350
	550
12	200
	300
13	350
	500
20	350

Εικόνα 3.2. Επιλογή ζωνών από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης

4. Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation)

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί η αντίδραση σύνδεσης των επιλεγμένων αλληλουχιών DNA με το φορέα κλωνοποίησης απαιτείται ο προσδιορισμός της ποσότητας του DNA.

Η ποσοτικοποίηση του γενετικού υλικού υπολογίσθηκε μέσω εμπειρικής εκτίμησης της έντασης των ζωνών, δεδομένου ότι η διακριτική ικανότητα του πηκτώματος ηλεκτροφόρησης είναι 10ng. Σε πήκτωμα αγαρόζης 1%, ηλεκτροφορήθηκαν 5μl από το κάθε δείγμα. Στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 4.1) παρουσιάζεται η ποσοτικοποίηση ορισμένων δειγμάτων.



Εικόνα 4.1. Ποσοτικοποίηση δειγμάτων προς κλωνοποίηση

Στον πίνακα (Πίνακας 4.1) παρουσιάζεται η εκτίμηση της ποσότητας του γενετικού υλικού σε 5μl δείγματος.

Primer	Μέγεθος αλληλουχίας (bp)	Ποσοτικοποίηση (ng/μl)
8	250	20
	350	30
	550	10
12	200	20
	300	15
13	350	30
	500	40
20	350	10

Πίνακας 4.1. Προσδιορισμός της ποσότητας του γενετικού υλικού

Στην αντίδραση σύνδεσης χρησιμοποιήθηκε ο φορέας pbluescript T-vector, συγκέντρωσης 20, 50 και 60ng/μl. Μετά τη διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας ιδανική κρίθηκε η συγκέντρωση 60ng/μl.

Η ποσότητα του ενθέματος που απαιτείται σε ng, εξαρτάται από τον τύπο του πλασμιδίου και υπολογίζεται από τον τύπο :

$\text{ng ενθέματος} = \text{ποσότητα φορέα (ng)} \times \frac{\text{μέγεθος ενθέματος (bp)}}{\text{μέγεθος φορέα (bp)}}$

Αυτή η αναλογία κυμαίνεται από 3:1 μέχρι 8:1

Π.χ Ένθεμα (8/250) : $(60\text{ng}/\mu\text{l} \times 250\text{bp}) / 3000\text{bp} \times 5/1 = 25 \text{ ng στα } 5 \mu\text{l}$ ή 5 ng στο 1 μl

Στις περιπτώσεις που η συγκέντρωση του ενθέματος είναι πολύ μικρή και ο όγκος που πρέπει να προστεθεί ξεπερνά τα 7 μl η αντίδραση προσαρμόζεται σε τελικό όγκο 30 μl.

Το πρωτόκολλο που πραγματοποιήθηκε παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 4.2)

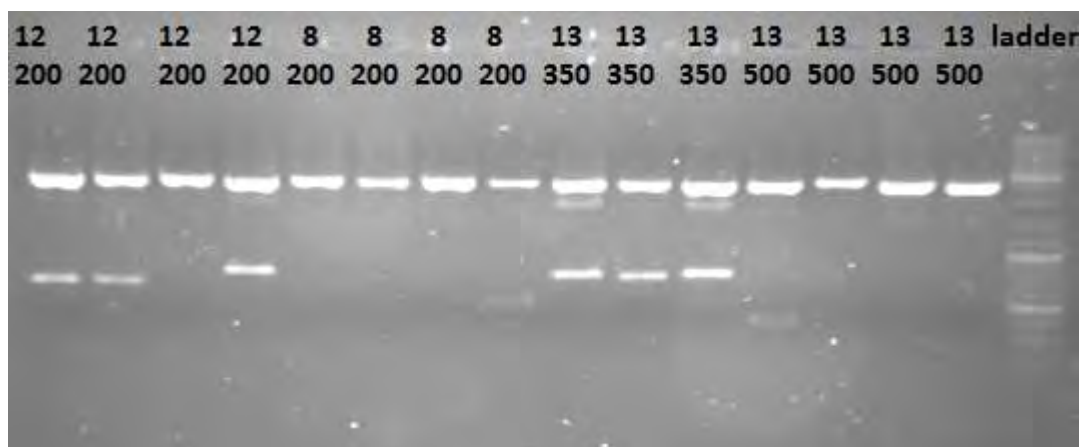
Αντίδραση σύνδεσης (Ligation)	
DNA	(...) ng/μl
Buffer (10x→1x)	1,00 μl
Φορέας	(...) μl
T4 DNA λιγάση	0,2 μl
ddH ₂ O	Έως τα 10 μl
V _{Final}	10,00 μl

Πίνακας 4.2. Πρωτόκολλο αντίδρασης σύνδεσης

Μετά το πέρας της αντίδρασης, τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια χρησιμοποιούνται στη διαδικασία ηλεκτροδιάτρησης των δεκτικών κυττάρων.

5. Κλωνοποίηση

Αφού πραγματοποιήθηκε η διαδικασία της ηλεκτροδιάτρησης των κυττάρων EC ώστε να δεχθούν τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, ακολούθησε επίστρωση των κυττάρων σε τρυβλία Petri που περιείχαν στερεό θρεπτικό υλικό. Μετά το πέρας της διαδικασίας επώασης των τρυβλίων (37° C, ~14 ώρες) έγινε επιλογή των λευκών αποικιών, που περιείχαν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Από το σύνολο των οκτώ διαφορετικών ενθεμάτων μόνο τα τέσσερα έδωσαν ανασυνδυασμένες αποικίες. Με τη χρήση αποστειρωμένης οδοντογλυφίδας επιλέχθηκαν συνολικά δεκαπέντε λευκές αποικίες. Συγκεκριμένα επιλέχθηκαν τρεις αποικίες με το ένθεμα 8/200, τέσσερις με το ένθεμα 12/200, τρεις με το ένθεμα 13/350 και τέσσερις με το ένθεμα 13/500. Στη συνέχεια προκειμένου να διαπιστωθεί αν όντως οι επιλεγμένες μπάντες (ένθεμα) έχουν ενσωματωθεί στο πλασμίδιο (φορέα), πραγματοποιήθηκε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA από τα βακτηριακά κύτταρα και ακολούθησε πέψη με το ένζυμο PvuII. Ο φορέας έχει μήκος 3,000 Kb και δύο θέσεις αναγνώρισης για το ένζυμο PvuII, το οποίο "πέπτει" στις θέσεις 427 και 927. Αν ο φορέας δεν έχει ενσωματώσει το ένθεμα αναμένεται μετά την πέψη να προκύψουν δύο μπάντες μία 2.500 bp και μία 500 bp. Αντίθετα, αν ο φορέας έχει ενσωματώσει το ένθεμα αναμένεται πάλι η μπάντα των 2,500 bp μία μπάντα (500 bp + μήκος ενθέματος). Στην εικόνα (Εικόνα 5.1) παρουσιάζεται το πρότυπο της πέψης μετά την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αгарόζης, συγκέντρωσης 1%.



Εικόνα 5.1. Πρότυπο πέψης πλασμιδιακού DNA

Παρατηρούμε ότι από τις επιλεγμένες αποικίες, ένθεμα περιλαμβάνουν μόνο οι 12/200 και 13/350. Η χαρακτηριστική μπάντα στις 2.500 bp εμφανίζεται σε όλα τα δείγματα. Όμως μόνο το δείγμα 12/200 δίνει μια επιπλέον μπάντα στις 700bp και το δείγμα 13/350 στις 850 bp όπως αναμενόταν.

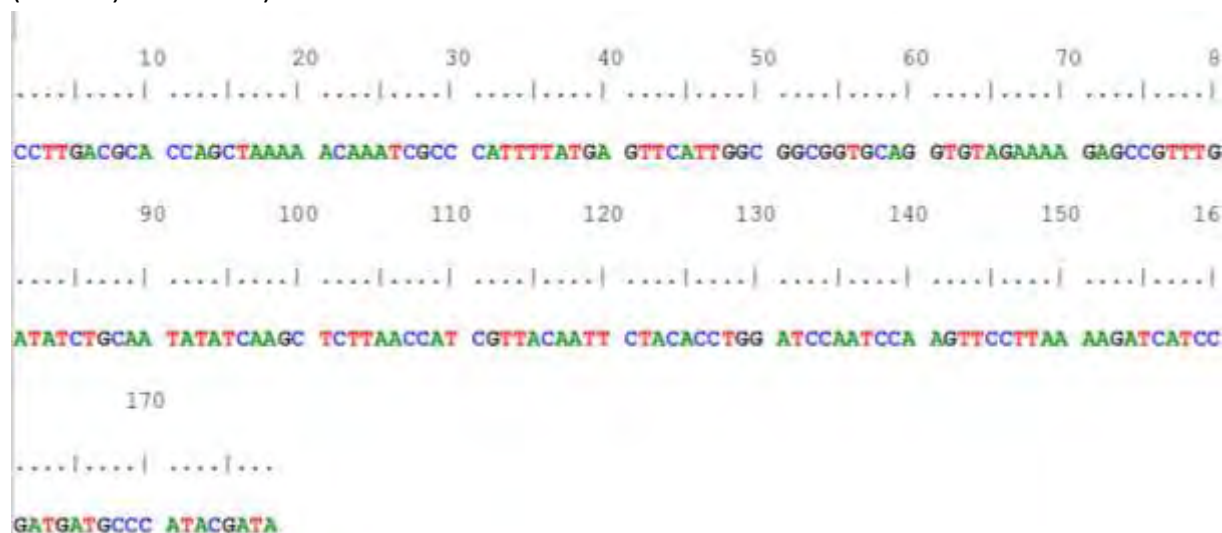
Τα δείγματα 12/200 και 13/350 που τρέχουν στις διαδρομές 1 και 11 του πηκτώματος στάλθηκαν προς αλληλούχιση.

6. Αποτελέσματα αλληλούχισης

Τα αποτελέσματα της αλληλούχισης αξιολογήθηκαν με τη χρήση των υπολογιστικών προγραμμάτων OMIGA και BLAST. Το πρόγραμμα BLAST είναι ένας αλγόριθμος ευθυγράμμισης που βρίσκει τις περιοχές τοπικής ομοιότητας μεταξύ αλληλουχιών. Έχει τη δυνατότητα να συγκρίνει νουκλεοτιδικές ή πρωτεϊνικές αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων και να υπολογίζει τη στατιστική σημαντικότητα των αλληλουχιών που ταίριαξαν. Το BLAST μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συναχθούν λειτουργικές και εξελικτικές σχέσεις μεταξύ ακολουθιών, καθώς επίσης μπορεί να βοηθήσει στην αναγνώριση μελών που ανήκουν σε οικογένειες γονιδίων (Baxevanis D. Andreas, 2003).

Στη συγκεκριμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα blastn για την εύρεση περιοχών ομοιότητας μεταξύ νουκλεοτιδικών αλληλουχιών. Όσον αφορά την ακολουθία των 200 bp, αλληλουχήθηκαν 178 bp αλλά δεν βρέθηκε να παρουσιάζει μεγάλη ομολογία με κάποια δακική ή βακτηριακή αλληλουχία. Από την άλλη πλευρά η ακολουθία των 350 bp δεν αλληλουχήθηκε πλήρως, το τμήμα των 270 bp που αλληλουχήθηκε παρουσιάζει 100% ομοιότητα με νουκλεοτιδική ακολουθία από το βακτήριο *Escherichia coli*. Το γεγονός αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για κάποια επιμόλυνση.

Παρακάτω παρουσιάζονται οι αλληλουχίες των ακολουθιών των 178 bp και 270 bp (Εικόνες 6.1 και 6.2).



Εικόνα 6.1. Αλληλουχία 178 bp

```

      10      20      30      40      50      60      70      8
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
ATATCCTGAT TTGGCGCTAA CAGCGGTACG GCGGTGTCAT CACGACGGCG AATCGTAATG AAGTTGTCCA TAAAGTTCTG

      90     100     110     120     130     140     150     16
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CCAGCTTTT TGCAGATTGA TACGCCATTG GCTGATGGAA CTGGAAAGCT CTTACCGTC TGAATCCATC GGCGAACCAT

      170    180    190    200    210    220    230    24
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CGCTGTCATT ATCGGCCAGA CGCAGGTAT CTACCTGATT TGAAGCTGA TTAAGCTTAA GGATGATGCC GTCATAATCC

      250    260    270
.....|.....| .....|.....|
ACCTGCGATA CTGCAGAAAG GCTGGCGATA

```

Εικόνα 6.2. Αλληλουχία 270 bp

7. Δημιουργία δείκτη SCAR

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν η αλληλουχία των 178 bp ενισχύεται μόνο στα θηλυκά και όχι στα αρσενικά άτομα, πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με ειδικά σχεδιασμένους εκκινητές. Η αλληλουχία των εκκινητών παρουσιάζεται στην εικόνα (Εικόνα 7.1) με κίτρινο χρωματισμό.

```

      10      20      30      40      50      60      70      80
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
CCTTGACGCA CCAGCTAAAA ACAAAATCGCC CRTTTTATGA GTTCATTGGC GGCGGTGCAG GTGTAGAAAA GAGCCGTTTG

      90     100     110     120     130     140     150     160
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
ATATCTGCAA TATATCAAGC TCTTAAACCAT CGTTACAATT CTACACCTGG ATCCAAATCCA AGTTCCTTAA AAGATCATCC

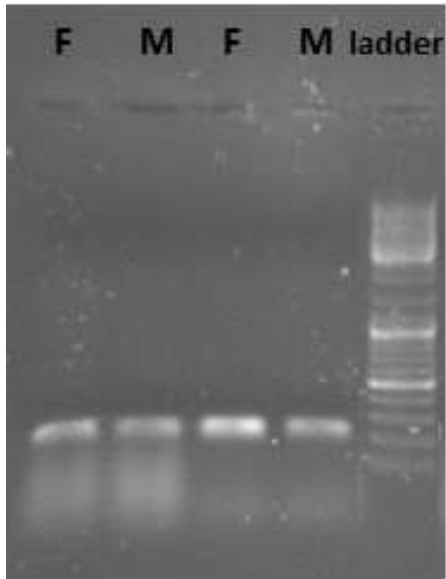
      170
.....|.....| .....|.....|
GATGATGCCC ATACGATA

```

Εικόνα 7.1. Αλληλουχία εκκινητών (forward-reverse)

Πραγματοποιήθηκε αντίδραση SCAR-PCR σύμφωνα με το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται στους πίνακες 3.6.1 και 3.6.2. Ως μήτρα χρησιμοποιήθηκε pool DNA θηλυκών και αρσενικών εντόμων καθώς και DNA που απομονώθηκε από μεμονωμένα έντομα φυσικού πληθυσμού.

Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. Η σειρά ηλεκτροφόρησης έχει ως εξής: DNA θηλυκού εντόμου φυσικού πληθυσμού (Μαρόκο), DNA αρσενικού εντόμου φυσικού πληθυσμού (Μαρόκο), pool DNA θηλυκών εντόμων εργαστηριακού πληθυσμού, pool DNA αρσενικών εντόμων εργαστηριακού πληθυσμού.



Εικόνα 7.2. Πρότυπο ηλεκτροφόρησης προϊόντων SCAR-PCR

Παρατηρούμε προϊόν ενίσχυσης τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα.

Συζήτηση

Η μεγαλύτερη νοητή διάκριση μέσα σε ένα είδος μπορεί να διαμορφωθεί από το φύλο. Η διάκριση αυτή μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων αντανακλά τις διαφορές τους σε επίπεδο φυσιολογίας, συμπεριφοράς και οικολογίας. Προκειμένου να εξερευνηθούν οι διαφορές μεταξύ των δύο φύλων μπορούν να χρησιμοποιηθούν μοριακές τεχνικές ώστε να δημιουργηθούν κατάλληλοι φυλοειδικοί δείκτες. Σε χρωμοσωμικό επίπεδο, η κύρια διαφορά μεταξύ θηλυκών και αρσενικών ατόμων εντοπίζεται στα φυλετικά χρωμοσώματα ενώ σε μοριακό επίπεδο εστιάζεται σε γενετικούς τόπους που εντοπίζονται σε φυλετικά ή σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Στην περίπτωση που το πρότυπο του φυλοκαθορισμού είναι XX για το θηλυκό και XY για το αρσενικό άτομο είναι δυνατό να εντοπισθούν Y-ειδικές ή X-ειδικές αλληλουχίες. Μάλιστα οι γενετικοί τόποι οι οποίοι εδράζονται στο X χρωμόσωμα θα βρίσκονται σε διπλή γονιδιακή δόση στα θηλυκά άτομα. Όσον αφορά στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, είναι δυνατό να εντοπισθούν αλληλόμορφα τα οποία εμπλέκονται στο σύστημα φυλοκαθορισμού και παρουσιάζουν ποιοτικές διαφορές μεταξύ των δύο φύλων. Ωστόσο, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη του προτύπου έκφρασης του γονιδιώματος (τρανσκριπτιωμική) στα δύο φύλα. Η μελέτη του τρανσκριπτώματος αναμένεται να αποτελέσει το συμπληρωματικό κομμάτι της έρευνας αποκαλύπτοντας επιπλέον στοιχεία για το πρότυπο του φυλοκαθορισμού.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ως μοριακή τεχνική εφαρμόσθηκε η μεθοδολογία των RAPDs για τη δημιουργία φυλοειδικών δεικτών στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*. Η συγκεκριμένη τεχνική δεν έχει ευρεία εφαρμογή στον τομέα της φυλοειδικής διάγνωσης στα έντομα όσο σε βιογεωγραφικές και φυλογενετικές μελέτες. Παρόλα αυτά έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία για τη φυλοειδική διάγνωση σε αρκετούς οργανισμούς μεταξύ των οποίων κυρίαρχη θέση κατέχουν τα φυτά όπως *Pistacia* (Yakubov et al. 2005), *Euccommia* (Xu et al. 2004), *Papaya* (Parasnis et al. 2000), *Humulus* (Polly et al. 1997) και *Asparagus* (Bracale et al. 1991), αλλά και ζώα όπως *Great Tit* (*Parus major*), *Zebra Finch* (*Taenopygia guttata*) (Griffiths and Tiwari 1993) και *Chicken* (*Gallus gallus domesticus*) (James N. Petite & A. Elizabeth Kegelmeyer, 1995).

Η επιλογή της συγκεκριμένης μοριακής τεχνικής βασίστηκε στα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει καθώς αποτελεί μία εύκολη, αποτελεσματική και οικονομική μέθοδο. Επίσης, οι εκκινήτες που χρησιμοποιούνται είναι διαθέσιμοι στο εμπόριο και δεν απαιτείται ο σχεδιασμός τους. Τέλος, το βασικό πλεονέκτημα της είναι ότι δεν είναι αναγκαία η γνώση της αλληλουχίας και της οργάνωσης του γονιδιώματος του οργανισμού που εφαρμόζεται, όπως το γονιδίωμα του δάκου της ελιάς η αλληλουχία του οποίου δεν έχει ακόμα αποκαλυφθεί. Ωστόσο, η χρήση των RAPDs εμφανίζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Συγκεκριμένα, το κύριο μειονέκτημα είναι ότι παρουσιάζει μερική επαναληψιμότητα λόγω της υψηλής ευαισθησίας της

μεθόδου. Η διεξαγωγή της αντίδρασης RAPDs-PCR πρέπει να γίνεται στον ίδιο θερμικό κυκλοποιητή ενώ οι συνθήκες της αντίδρασης όπως η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών πρέπει να είναι καθορισμένη. Επιπλέον, ιδιαίτερο ρόλο για την επιτυχία της μεθόδου παίζουν οι συγκεντρώσεις του γενετικού υλικού που χρησιμοποιείται ως μήτρα και του χλωριούχου μαγνησίου καθώς και το είδος του ενζύμου, Taq πολυμεράσης.

Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία, χρησιμοποιήθηκε ένα σύνολο τριάντα εκκινητών εκ των οποίων τέσσερις έδωσαν προϊόν ενίσχυσης αλλά μόνο στα θηλυκά άτομα. Θα αναμέναμε προϊόν ενίσχυσης και στα αρσενικά αλλά με κάποια διαφοροποίηση ή ενίσχυση κάποιας Υ-ειδικής αλληλουχίας μόνο στα αρσενικά άτομα. Ωστόσο, οι μπάντες που εμφανίστηκαν μόνο στα θηλυκά έντομα οδήγησαν στην υπόθεση ότι η προέλευση αυτών των ενισχυμένων τμημάτων ίσως δεν είναι δακική αλλά βακτηριακή.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο δάκος της ελιάς φιλοξενεί στον πεπτικό του σωλήνα, στον οισοφαγικό θύλακα και στον ωοθέτη βακτηριακούς πληθυσμούς. Ιδιαίτερα στα θηλυκά έντομα εντοπίζεται το φαινόμενο της μητρικής κληρονομησης των βακτηρίων από τη μητέρα στο αυγό μέσω του ωοθέτη. Η μελέτη της βακτηριακής κοινότητας του δάκου της ελιάς παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον διότι μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμο όπλο για τη βιολογική καταπολέμηση του εντόμου.

Για την επιβεβαίωση αυτής της υπόθεσης, έγινε μια προσπάθεια κλωνοποίησης και αλληλούχισης των ενισχυμένων προϊόντων που εντοπίστηκαν στα θηλυκά άτομα. Από το σύνολο των οκτώ πολυμορφικών τμημάτων μόνο τέσσερα κλωνοποιήθηκαν ενώ μόνο για ένα από αυτά αποκαλύφθηκε η αλληλουχία του. Με βάση την αλληλουχία του τμήματος των 178 bp σχεδιάστηκαν εκκινητές σε μια προσπάθεια δημιουργίας ενός πιο ειδικού δείκτη SCAR. Η μοριακή τεχνική SCAR εφαρμόστηκε σε pool DNA θηλυκών και αρσενικών εντόμων εργαστηριακού πληθυσμού αλλά και σε μεμονωμένα άτομα φυσικού πληθυσμού. Παρατηρήσαμε προϊόν ενίσχυσης τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά άτομα. Με βάση τα ευρήματα στα προηγούμενα στάδια της πειραματικής διαδικασίας αναμέναμε προϊόν ενίσχυσης μόνο στα θηλυκά άτομα. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει για ακόμη μία φορά πόσο ευαίσθητη είναι η τεχνική των RAPDs και ότι διάφορες παράμετροι μπορούν να επηρεάσουν το τελικό αποτέλεσμα.

Συμπερασματικά, αποδείχθηκε ότι με τη χρήση των συγκεκριμένων τριάντα εκκινητών, του πρωτόκολλου και των συνθηκών της αντίδρασης, δεν ήταν δυνατή η φυλοειδική διάγνωση στο δάκο της ελιάς. Το γεγονός όμως αυτό δεν απορρίπτει την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου για την εύρεση ενός ή περισσότερων φυλοειδικών δεικτών. Επιπλέον, δεδομένου ότι δεν έχουν αλληλουχηθεί τα υπόλοιπα πολυμορφικά τμήματα που εντοπίστηκαν στα θηλυκά άτομα, δεν μπορεί να απορριφθεί το ενδεχόμενο της ύπαρξης συγκεκριμένων συμβιωτικών βακτηρίων στο θηλυκό έντομο.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alberola T.M., S. Aptosoglou, M.Arsenakis, Y.Bel, G. Delrio, D.J. Ellar, J. Ferre, F. Granero, D.M. Guttman, S. Koliais and others. 1999. Insecticidal activity of strains of *Bacillus thuringiensis* on larvae and adults of *Bactrocera oleae* Gmelin (Dipt. Tephritidae). *J. Microbiol. Biotech.* 20Q 749-136.
2. Alvin Silvertein, Virginia Silverstein and Laura Silverstein Nunn 2008. Symbiosis.
3. Apostolaki A, Livadaras I, Saridaki A, Chrysargyris A, Savakis C & Bourtzis K, 2010. Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with *Wolbachia*: towards a symbiont-based population control strategy. *J. Appl. Entomol.*
4. Ashburner M. (1989) *Drosophila. A laboratory handbook.* Cold Spring Harbor Laboratory
5. Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD. 2002. Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol Ecol Notes* 2:278–80.
6. Baumann, P., Baumann, L., Lai, C. Y., Rouhbakhsh, D., Moran, N. A. & Clark, M. A. (1995). Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids. *Annu Rev Microbiol* 49, 55–94.
7. Baxevanis D. Andreas, B.F. Francis Ouellette 2003. Βιοπληροφορική, δεύτερη έκδοση.
8. Beeman R W & Briwn S J, RAPD-based genetic linkage maps of *Tribolium castaneum*, *Genetics*, 153 (1999) 333-338.
9. Benter T, Papadopoulos S, Pape M, Manns M and Poliwoda H (1995). Optimization and Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA in Human. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY* 92-100.
10. Birnboim H.C., Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
11. Black W C, DuTeau N M & Puterka G J, Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids (Homoptera: Aphididae), *Bull Entomol Res*, 82 (1992) 51-159.
12. Bracale M, Caporali E, Galli MG, Longo C, Marziani-Longo G, Tassi F (1991) Sex expression and determination in *Asparagus officinalis*. *Plant Sci* 80: 67-77
13. Breznak, J. A. & Brune, A. (1994). Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites. *Annu Rev Entomol* 39, 453–487.
14. Buchner, P. (1965). *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms.* New York: Interscience.
15. Caterina Capuzzo, Giuseppe Firrao, Luca Mazzon, Andrea Squartini and Vincenzo Girolami (2005). '*Candidatus Erwinia dacicola*', a coevolved

- symbiotic bacterium of the olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 55: 41–47
16. Collier TR and Van Steenwyk R (2003) Olive fruit fly in California: prospects for integrated control. *Calif Agric* 57:28–32
 17. Curtis, C.F. and Sinkins, S.P., 1998. *Wolbachia* as a possible means of driving genes into populations. *Parasitology*, 116 (Suppl. S), S111-S115.
 18. Daane KM, Johnson MW. Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annu Rev Entomol*. 2010. 55:155-69.
 19. Daniel L. Hartl Essential Genetics: A Genomics Perspective, fifth edition, 2011.
 20. Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Annu Rev Entomol* 43, 17–37.
 21. Drew, R. A. I., Courtice, A. C. & Teakle, D. S. 1983 Bacteria as a natural source of food for adult fruit-flies (Diptera, Tephritidae). *Oecologia* 60, 279–284.
 22. Drew, R. A. I. The tropical fruit flies (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the Australasian and Oceanian regions. *Memoirs of the Queensland Museum* 1989 Vol. 26 pp. 521 pp.
 23. Dubendorfer A, Hediger M, Burghardt G, Bopp D. 2002. *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. *Int J Dev Biol* 46: 75–9
 24. Economopoulos, A. P., Avtzis, N., Zervas, G., Tsitsipis, J., Haniotakis, G.,
 25. Erickson JW, Quintero JJ. 2007. Indirect effects of ploidy suggest X chromosome dose, not the X:A ratio, signals sex in *Drosophila*. *PLoS Biol* 5: e332.
 26. Fytizas, E. and Tzanakakis, M.E (1996). Development des larves de *Dacus Oleae* dans des olives lorsque leurs parents ont reçu la streptomycine, incorporée à leur nourriture. *Ann. Epiphyties*. 17: 53-9
 27. Girolami, V. & Cavalloro, R. (1972). Aspetti della simbiosi batterica di *Dacus oleae* (Gmelin) in natura e negli allevamenti di laboratorio. *Ann Soc Entomol Fr* 8, 561–571 (in Italian).
 28. Griffiths R, Tiwari B (1993) The isolation of molecular genetic markers for the identification of sex. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 8324-8326
 29. Gill T K, Kumri S, Sharma V L, Badran A A, Kumari M et al, Genetic Variation in polymorphic males of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) by RAPD-PCR, *Cytologia*, 71 (2006) 57-62.
 30. Hagen, K. S. 1966. Dependence of the olive fly *Dacus oleae* larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. *Nature* 209:423-424
 31. Harris H, 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proc R Soc Lond B* 164:298–310.
 32. Harris S., Jones D.B. (1997) Optimisation of the polymerase chain reaction. *Br J Biomed Sci* 54: 166-173.

33. Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., and Johnson, K.N. (2008). *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322, 702.
34. Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., and Werren, J.H. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*?—A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 215–220.
35. Hiroaki Abe, Mariko Kanehara, Tomoko Terada, Fumi Ohbayashi, Toru Shimada, Shinya kawai, Masataka Suzuki, Toshiyuki Sugasaki and Toshikazu Oshiki. Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the silkworm, *B.mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. *Genes Genet. System.* (1998) 73, 243-254.
36. Hunt G J & Page R E, Linkage map of honeybee, *Apis mellifera*, based on RAPD markers, *Genetics*, 139 (1995) 1371-1382.
37. Ish-Horowicz D., Burke J.F. (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9: 2989-2998
38. John C. Avise, 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution.*
39. John H. Werren and Scott L. O'Neill 1997. The evolution of heritable symbionts.
40. Karamanlidou G, Lambropoulos A. F, Koliais S. I, Manousis T, Ellar D, Kastritsis C. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to Laboratory Populations of the Olive Fruit Fly (*Dacus oleae*). *Applied and environmental microbiology*, Aug. 1991, p. 2277-2282.
41. Kakani Evdoxia 2009. Μοριακή ανάλυση γονιδιακών τόπων που εμπλέκονται στον μηχανισμό ανάπτυξης της ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα του σημαντικότερου παρασίτου της ελιάς, του εντόμου *Bactrocera oleae*. Διδακτορική διατριβή: <http://phdtheses.ekt.gr/eadd/handle/10442/17530>
42. Kounatidis, I. et al. 2009 *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont of the olive fruit fly (*Bactrocera oleae*). *App. Environ. Microbiol.* 75, 3281–3288. (doi:10.1128/AEM.02933-08)
43. Krimbas, C.B 1963. A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Tephritidae) : the salivary gland and mitotic chromosomes. *Caryologia*, 16: 371-376.
44. Lagos D, Koukidou M, Savakis C and Komitopoulou K. *Insect Molecular Biology* (2007),16, 221–230 doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00717.x Blackwell Publishing Ltd The Transformer gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate
45. Lagos D, Ruiz MF, Sánchez L, Komitopoulou K. 2005. Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster*.

46. Lagos D, Ruiz MF, Sánchez L, Komitopoulou K, James N, Petite & A. Elizabeth Kegelmeyer, 1995. Rapid sex determination of chick embryos using the polymerase chain reaction.
47. Laura Hake, Ph.D. (Biology Department, Boston College) & Clare O'Connor, Ph.D. (Biology Department, Boston College) 2008 Nature Education Citation: Hake, L. & O'Connor, C. (2008) Genetic mechanisms of sex determination. Nature Education
48. Laven, H. 1967b. A possible model for speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. Bull. W.H.O. 37: 263-266
49. Lewontin RC and Hubby JL, 1966. A molecular approach to the study of genetic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. Genetics 54:595–609
50. Maheswaran M (2004) Molecular Markers: History Features and Applications. Advanced Biotech.
51. Mavragani-Tsipidou, P., G. Karamanlidou, A. Zacharopoulou, S. Koliais and C.D. Kastritsis. 2002. Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). Genome, 35: 373-378.
52. Michael Ben-Yosef, Yael Aharon, Edouard Jurkevitch and Boaz Yuval. Give us the tools and we will do the job: symbiotic bacteria affect olive fly fitness in a diet-dependent fashion.
53. Milee Agarwal, Neeta Shrivastava, Harish Padh, 2007. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. Plant Cell Rep (2008) 27:617–631.
54. Moran, N. A. & Baumann, P. (2000). Bacterial endosymbionts in animals. Curr Opin Microbiol 3, 270–275.
55. Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, GK., Frati, F., 2005. Population structure and colonizations history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). Mol. Ecol. 14, 2729–2738.
56. Pane A, Salvemini M, Bovi PD, Polito C, et al. 2002. The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. Development 129: 3715–25.
57. Paran, I. and R. W. Michelmore, 1993. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor. Appl. Genet. 85: 985-993.
58. Parasnis AS, Gupta VS, Tamhankar SA, Ranjekar PK (2000) A highly reliable sex diagnostic PCR assay for mass screening of papaya seedlings. Mol Breed 6: 337-344
59. Parrish TL, Koelewijn HP, vanDijk PJ (2004) Identification of a male-specific AFLP marker in a functionally dioecious fig, *Ficus fulwa* Reinw. Ex Bl. (Moraceae). Sex Plant Reprod 17: 17-22

60. Petri, L., (1909)., Ricerche sopra I batteri intestinali della *mosca olearia*, Mem.R.Staz.Patol.agr.Roma
61. Petri,L., (1910). Untersuchung uber die Daembakterium der Oliven Fliege. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. 26:357-67
62. Polley A, Seigner E, Ganal WM (1997) Identification of sex in hop (*Humulus lupulus*) using molecular markers. Genome 40: 357-361
63. Rice RE, Phillips PA, Stewart-Leslie J, Sibbett GS. 2003. Olive fruit fly populations measured in Central and Southern California. Cal Ag 57(4):122–7.
64. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.
65. Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354.
66. Schlötterer Christian 2004. The evolution of molecular markers — just a matter of fashion? Nature Reviews Genetics 5, 63-69.
67. Semagn K, Bjørnstad Å and Ndjiondjop M. N. 2006. Review: An overview of molecular marker methods for plants. African Journal of Biotechnology Vol. 5 (25), pp. 2540-2568.
68. Sgaramella V., Ehrlich S.D. (1978) Use of T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. Eur J Biochem 86: 531-537
69. Sharp P.A., Sugden B., Sambrook J. (1973) Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry 12: 3055-3063
70. Sinkins, S. P., Curtis, C. F. and O'Neill, S. L. (1997). The potential application of inherited symbiont systems to pest control. In: O'Neill, S. L., Hoffmann, A. A. and Werren, J. H. (eds) Influential Passengers: Inherited Microorganisms and Arthropod Reproduction, pp. 165–175. Oxford University Press, Oxford.
71. Smith, D. C. & Douglas, A. E. (1987). The Biology of Symbiosis. London: Edward Arnold.
72. Subodh Kumar Jain, Bharat Neekhra, Divya Pandey and Kalpana Jain Department of Biotechnology, Dr H S Gour University, Sagar 470 003, India. RAPD marker system in insect study: A review
73. Sunnucks Paul (2000) Efficient genetic markers for population biology.
74. Surindar Paracer, Vernon Ahmadjian 2000. Symbiosis: An Introduction to Biological Associations.
75. Tanja Gempe and Martin Beye 2010. Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects

76. Thompson PE, Bowen JS. 1972. Interactions of differentiated primary sex factors in *Chironomus tentans*. *Genetics* 70: 491–3.
77. Teixeira, L., Ferreira, A., and Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 6, e2.
78. Traut W. 1994. Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. *Genetics* 136: 1097–1104
79. Tsiropoulos, G. J. 1984. Amino-acid synthesis in adult *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera–Tephritidae) determined with glucose.
80. Tsiropoulos, G. J. 1983. Microflora associated with wild and laboratory reared olive fruit flies. *Dacus oleae* (Gmel). *Z. Angew. Entomol.* 96:337-340)
81. Tsiropoulos, G. and Manoukas, A. (1977), Experiments on the control of the olive fly, *Dacus oleae* (Gmel.), by the combined effect of insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects.
82. Turelli M, Hoffmann AA (1991). Rapid spread of an inherited incompatibility factor in California *Drosophila*. *Nature* 353: 440–442.
83. Τζανακάκης, Μ., 1995. Εντομολογία. University Studio Press. Θεσσαλονίκη.
84. Von Dohlen, C. D., Kohler, S., Alsop, S. T. & McManus, W. R. (2001). Mealybug b-proteobacterial endosymbionts contain c-proteobacterial symbionts. *Nature* 412, 433–436.
85. Watson James, Myers Richard M., Caudy Amy A., Witkowski Ja A., Ανασυνδυασμένο DNA. Πρώτη ελληνική έκδοση. 2007 Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ Ο.Ε
86. Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213–7218.
87. Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetics markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531–6535.
88. Wirth Reinhard, Friesenegger Anita, Fiedler Stehan, 1989. Transformation of various species of gram-negative bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. *Mol Gen Genet.*
89. Xu W, Wang B, Cui K (2004) RAPD and SCAR marker linked to sex determination in *Eucosmommia ulmoides* Oliv. *Euphytica* 136: 233-228
90. Yakubov B, Barazani O, Golan-Goldfish A (2005) Combination of SCAR primers and touch down PCR for sex determination in *Pistacia vera* L. *Scientia Hort* 103: 473-478
91. Yasukochi Y, A dense genetic map of the silkworm, *Bombyx mori*, covering all chromosomes based on 1018 molecular markers, *Genetics*, 150 (1998) 1513-1525.

