



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ

ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

ΖΟΡΜΠΑΣ ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΣ
ΛΑΡΙΣΑ - 2018

«ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ Υ-ΕΙΔΙΚΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ
ΣΤΟ ΔΑΚΟ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ»

ZORMPAS ELEΥΘΕΡΙΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝ/ΝΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗΣ

“ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF Y-SPECIFIC
GENES AT THE OLIVE FRUIT FLY *BACTROCERA OLEAE*”

ZORMPAS ELEFTHERIOS

SUPERVISOR: MATHIOPOULOS KOSTAS

LABORATORY OF MOLECULAR BIOLOGY AND GENOMICS

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Καρπούζας Δημήτριος

Αναπληρωτής καθηγητής
Περιβαλλοντικής Μικροβιολογίας και
Βιοτεχνολογίας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σαραφίδου Θεολογία

Επίκουρος Καθηγήτρια
Μοριακής Γενετικής Ζωικών
Οργανισμών
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα νέα εργαλεία γονιδιωματικής, και κυρίως οι νέες τεχνολογίες αλληλούχησης, μας παρέχουν μεγάλο όγκο πληροφοριών σχετικά με την αλληλουχία του γονιδιώματος ενός οργανισμού. Επιπλέον η μεγάλη υπολογιστική δύναμη μας παρέχει την δυνατότητα βιοπληροφορικής ανάλυσης των τεράστιων όγκων δεδομένων. Ο συνδυασμός της γονιδιωματικής και της βιοπληροφορικής ανάλυσης θα βοηθήσουν σημαντικά προς την κατεύθυνση της ανακάλυψης νέων γονιδίων στον δάκο της ελιάς μεταξύ των οποίων βρίσκεται και ο παράγοντας αρρενοποίησης στον δάκο της ελιάς.

Από την αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου, με την αξιοποίηση των τεχνικών Next Generation Sequencing και τη χρήση της μεθόδου Chromosome Quotient, προέκυψε μια βάση δεδομένων με 85 αρρενοειδικές αλληλουχίες. Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η διάκριση και ο διαχωρισμός, ανάμεσα σε αυτές, των πραγματικά αρρενοειδικών αλληλουχιών με την αξιοποίηση των μεθόδων Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) και της ποσοτικής PCR (quantitative PCR, qPCR). Η PCR αξιοποιήθηκε για να διαχωριστούν οι αλληλουχίες που υπάρχουν στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα από αυτές που υπάρχουν μόνο στο X ή μόνο στο Y χρωμόσωμα. Επιπλέον έγινε χρήση της qPCR με σκοπό την ανίχνευση και τον διαχωρισμό των αλληλουχιών που εκτός από τα αυτοσωμικά είχαν αντίγραφο και στο Y χρωμόσωμα.

Ο επόμενος στόχος μας ήταν η αξιοποίηση των προγραμμάτων βιοπληροφορικής ανάλυσης Blastn, Blastx, tBlastx και πρόβλεψης δομής InterPro για την ανάλυση των αρρενοειδικών αλληλουχιών του δάκου της ελιάς. Η βιοπληροφορική ανάλυση που διενεργήσαμε είχε ως σκοπό την ανεύρεση πιθανών γονιδίων, μεταξύ των οποίων πιστεύεται ότι εντοπίζεται και ο παράγοντας αρρενοποίησης του δάκου. Πιστεύουμε ότι η παρούσα εργασία θα αποτελέσει το πρώτο βήμα προς την ανεύρεση του παράγοντα αρρενοποίησης.

Λέξεις Κλειδιά: δάκος, Y-χρωμόσωμα, γονιδιακό περιεχόμενο, αρρενοειδικότητα, παράγοντας αρρενοποίησης

Abstract

The new genomics tools, and especially the new generation sequencing technologies, lead to the assembly of the entire genome sequence. The combination of many such technologies has led to the determination of the genome sequence of the olive fly, the most important parasite of the olive tree. Indeed, with the use of the Chromosome Quotient approach, a database of 84 male-specific sequences, that is 84 scaffolds of the Y chromosome of the insect, has emerged. This chromosome is extremely difficult to sequence and assemble because of its heterochromatin nature and its high content of repetition sequences and transposable elements. But it is also of particular interest because among the few genes it contains is the male factor, a genetic site responsible for determining the male sex in the insects of the Tephritidae family.

The aim of this work was the experimental confirmation of the male specificity of these 84 scaffolds, using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and the quantitative PCR (qPCR) methods. Our simple PCR indicated which of these scaffolds contained predominantly Y-specific sequences (since only the male individuals gave the amplification zone). qPCR, on the contrary, suggested Y-specific scaffolds whose sequences, however, had a similar copy in autosomal regions (since male insects contained 3 copies, while females 2).

Our next goal was to exploit the Blastn, Blastx, tBlastx bioassay analysis programs and the InterPro structure prediction for the analysis of the 84 male-specific scaffolds of the olive fly. The bioinformatics analysis we performed was aimed at finding possible genes, among which the masculinizing factor is believed to be found. We believe that this work will be the first step towards finding the masculinizing factor.

Key Words: Olive fly, Y-chromosome, gene content, male-specificity, masculinizing factor

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1. Εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων.....	11
1.1. Θεωρία προέλευσης των X και Y	11
1.1.1. Νέο-X και νέο-Y χρωμοσώματα	12
1.1.2. Το πρόβλημα των X και Y χρωμοσωμάτων	13
1.2. Φυλετικά χρωμοσώματα στα έντομα	13
1.2.1. <i>Drosophila melanogaster</i>	14
1.2.2. Άλλα δίπτερα.....	16
1.2.3. Άλλα έντομα	19
1.3. Εκφυλισμός των Y και W χρωμοσωμάτων	20
1.3.1. Μοριακοί μηχανισμοί εκφυλισμού	21
1.3.2. Εξελκτικές διεργασίες που οδηγούν στον εκφυλισμό	21
1.4. Γονιδιακό περιεχόμενο στο Y χρωμόσωμα.....	22
1.4.1. Γονίδια.....	23
1.4.1.1. Γονίδια στο Y της <i>Drosophila</i>	23
1.4.1.2. Γονίδια στο Y των <i>Anopheles</i>	26
1.1.1. DNA μεταθετά στοιχεία	26
2. Το μονοπάτι του φυλοκαθορισμού στα είδη του γένους <i>Bactrocera</i>	27
2.1. Το μονοπάτι <i>tra/tra2-dsx</i>	28
2.2. Έκφραση γονιδίων σχετικών με τον φυλοκαθορισμό	29
3. Παράγοντες αρρενοποίησης στα έντομα.....	29
3.1. Παράγοντας αρρενοποίησης στην οικιακή μύγα (<i>M. domestica</i>) <i>Mdmd</i> (<i>Musca domestica male determiner</i>)	30
3.2. Παράγοντας αρρενοποίησης στο κουνούπι της ελονοσίας (<i>Anopheles gambiae</i>) <i>Yob</i>	31
3.3. Παράγοντας αρρενοποίησης στο κουνούπι τίγρης (<i>Aedes aegypti</i>)	32
4. Παράγοντας αρρενοποίησης στο δάκο της ελιάς: ένα μυστήριο.....	33
4.1. Ενεργοποίηση του παράγοντα αρρενοποίησης.....	33
4.2. Ο παράγοντας αρρενοποίησης στο δάκο της ελιάς	36
4.2.1. Έλεγχος πληθυσμού μέσω SIT στο παρόν και το μέλλον.....	38
4.3. Αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου και επιλογή Y ειδικών αλληλουχιών	40
5. Σκοπός.....	41
ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ.....	42

1.	Έλεγχος αρρενοειδικότητας ικριωμάτων αλληλούχισης.....	43
1.1.	Προέλευση ικριωμάτων αλληλούχισης.....	43
1.2.	Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA ενήλικων ατόμων.....	43
1.3.	Ποσοτικοποίηση DNA	45
1.4.	Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR).....	46
1.5.	Ποσοτική PCR (quantitative PCR, qPCR)	47
2.	Βιοπληροφορική ανάλυση αρρενοειδικών αλληλουχιών.....	49
2.1.	OMIGA®.....	49
2.2.	Αλγόριθμοι Blast.....	49
2.3.	Πρόβλεψη πρωτεϊνικών δομών InterProScan®.....	50
2.4.	Λογική πορεία ανάλυσης.....	50
3.	Δημιουργία προφίλ έκφρασης.....	51
3.1.	Απομόνωση ιστών.....	52
3.1.1.	Απομόνωση RNA	52
3.1.2.	Καθαρισμός με DNase	53
3.1.3.	Απομόνωση DNA	53
3.1.4.	Έλεγχος φύλου εντόμου	54
3.2.	Σύνθεση cDNA	54
3.3.	Έλεγχος των Housekeeping γονιδίων (HKG)	55
3.4.	Προφίλ έκφρασης.....	56
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	57
1.	Επιβεβαίωση αρρενοειδικότητας ικριωμάτων αλληλούχισης.....	58
1.1.	Ποσοτικοποίηση του DNA.....	58
1.2.	Επιβεβαίωση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	58
1.3.	Με quantitative PCR (qPCR)	61
1.4.	Συνολικά αποτελέσματα.....	64
2.	Βιοπληροφορική ανάλυση ικριωμάτων αλληλούχισης.....	65
3.	Δημιουργία προφίλ έκφρασης των πιθανών γονιδίων.....	67
3.1.	Απομόνωση ιστών και σύνθεση cDNA.....	68
3.2.	Έλεγχος cDNA μέσω real time PCR Housekeeping γονιδίων.....	68
3.3.	Προφίλ έκφρασης.....	68
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	70
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	74
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	88
	ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	101

Περιεχόμενα εικόνων

Εικόνα 1. Το μοντέλο της εξέλιξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων.....	11
Εικόνα 2. Το μοντέλο της δημιουργίας νέο-Χ και νέο-Υ χρωμοσωμάτων.	12
Εικόνα 3. Α) Τα χρωμοσώματα τις <i>D. mel</i> . Φαίνονται τα στοιχεία Muller. Β) Η διαφορά στον καρύοτυπο θηλυκού με αρσενικό στα φυλετικά χρωμοσώματα (στοιχείο Muller A).....	14
Εικόνα 4. Το φυλογενετικό της οικογένειας των <i>Drosophilidae</i>	14
Εικόνα 5. Τα φυλετικά χρωμοσώματα στα Δίπτερα χαρτογραφημένα στο φυλογενετικό τους δέντρο	19
Εικόνα 6. Φυλογενετικό δέντρο του γένους των <i>Drosophila</i> . Με κόκκινα βέλη φαίνονται οι μεταφορές γονιδίων στο Υ. Με γαλάζια βέλη φαίνονται οι απομακρύνσεις γονιδίων από το Υ. 25	
Εικόνα 7. Το μονοπάτι φυλοκαθορισμού στην <i>C. capitata</i> . Α: σε ΧΧ έμβρυα. Β: σε ΧΥ έμβρυα. ($Cc=C. capitata$)	28
Εικόνα 8. Το Μονοπάτι φυλοκαθορισμού και ο παράγοντας Μ στην οικιακή μύγα <i>Musca domestica</i> . Α: μονοπάτι προς ανάπτυξη αρσενικού. Β: μονοπάτι προς ανάπτυξη θηλυκού. C: Ποσοστά αρσενικών που φέρουν τον παράγοντα Μ σε κάθε ένα από τα χρωμοσώματα.	30
Εικόνα 9. Τα μετάγραφα των γονιδίων <i>Mdmd</i> και <i>Md-nct</i> . Στο ενδιάμεσο φαίνονται τα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ τους.	31
Εικόνα 10. Το μοντέλο λειτουργίας του <i>Yob</i> . Α, Β: μονοπάτι φυλοκαθορισμού σε θηλυκά και αρσενικά αντίστοιχα. Γ: Εκτοπική έκφραση του <i>Yob</i> σε θηλυκά. Δ: Αποσιώπηση του <i>Yob</i> σε αρσενικά.....	32
Εικόνα 11. Τα δύο μοτίβα αναγνώρισης μονόκλωνου RNA (<i>RNA recognition motif</i> , <i>RRM</i>) κατά μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης <i>NIX</i>	33
Εικόνα 12. Αντιστοίχιση χρωμοσωμάτων των ειδών (1-6) με τα στοιχεία του Muller (A-F, X). Στην τελευταία στήλη του πίνακα φαίνεται πιο είναι το αρχικό σήμα για το μονοπάτι φυλοκαθορισμού σε κάθε ένα από τα είδη της πρώτης στήλης.	34
Εικόνα 13. Πως ο λόγος X:A καθορίζει την πορεία του μονοπατιού φυλοκαθορισμού.....	35
Εικόνα 14. Το πρωταρχικό σήμα βασίζεται στη διαφορά ανάμεσα στα αλληλόμορφα μιας συγκεκριμένης περιοχής. Στο εν λόγω μοντέλο το αρσενικό φύλο καθορίζεται από την ύπαρξη επικρατούς αλληλόμορφου Μ.	35
Εικόνα 15. Το πρωταρχικό σήμα βασίζεται στη διαφορά ανάμεσα στα αλληλόμορφα μιας συγκεκριμένης περιοχής. Στο εν λόγω μοντέλο το θηλυκό φύλο καθορίζεται από την ύπαρξη επικρατούς αλληλόμορφου Α σε ομοζυγωτία.	36
Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας απομόνωσης DNA από ζωικό ιστό.	44
Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση των τριών πρώτων κύκλων της PCR.	46
Εικόνα 18. Η χρωστική SYBR Green I (μπλε χρώμα) που προσδέεται στη μικρή αύλακα του DNA και χρησιμεύει ως ανιχνευτής των προϊόντων PCR.....	47
Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης RT-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I :	48
Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση ενός εκ των τρόπων σύνθεσης cDNA με τη χρήση <i>oligo(dt)</i> εκκινητών.	54
Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. ♂: Αρσενικό, ♀: Θηλυκό, C-: Αρνητικό control, L: Δείκτης μεγεθών.....	58
Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών E10. Μέγεθος προϊόντος 102bp. Α: Αρσενικό, Θ: θηλυκό, N.C.: Αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας μεγεθών.	59

Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών F08. Μέγεθος προϊόντος 120bp. Παρατηρούμε την απουσία αυτού του προϊόντος. A: Αρσενικό, Θ: θηλυκό, N.C.: Αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας μεγεθών.	59
Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών F02. Παρατηρούμε τα πολλαπλά προϊόντα και την απουσία του ειδικού προϊόντος στα 117bp. A: Αρσενικό, Θ: θηλυκό, N.C.: Αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας μεγεθών.	59
Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών F11. Μέγεθος προϊόντος 104bp. Παρατηρούμε την ενίσχυση του ίδιου προϊόντος σε αρσενικά και θηλυκά. A: Αρσενικό, Θ: θηλυκό, N.C.: Αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας μεγεθών.	59
Εικόνα 28. Αποτέλεσμα qPCR για το ζεύγος εκκινητών C7. Στο αρσενικό DNA υπάρχει τουλάχιστον ένα επιπλέον αντίγραφο της εν λόγω αλληλουχίας με $\Delta Cq = -3$. Μπλε: αρσενικό γενωμικό DNA, Ροζ: θηλυκό γενωμικό DNA, Τirkouάζ: αρνητικός μάρτυρας.	62
Εικόνα 28. Αποτέλεσμα qPCR για το ζεύγος εκκινητών D10. Ίδιος αριθμός αντιγράφων σε αρσενικά και θηλυκά με $\Delta Cq = +0,14$. Μπλε: αρσενικό γενωμικό DNA, Ροζ: θηλυκό γενωμικό DNA, Τirkouάζ: αρνητικός μάρτυρας.	62
Εικόνα 28. Αποτέλεσμα qPCR για το ζεύγος εκκινητών B3. Η εν λόγω αλληλουχία υπάρχει μόνο στα θηλυκά άτομα. Μπλε: αρσενικό γενωμικό DNA, Ροζ: θηλυκό γενωμικό DNA, Τirkouάζ: αρνητικός μάρτυρας.	62
Εικόνα 29. Συνολικά αποτελέσματα ανάλυσης. Male YES: αρρενοειδικές αλληλουχίες, Male NO: μη αρρενοειδικές αλληλουχίες, Female UP: θηλυκοειδικές.	64
Εικόνα 30. Ποσοστά αρρενοειδικών αλληλουχιών που χαρακτηρίστηκαν μόνο με PCR ή απαιτήθηκε και επιπλέον ανάλυση με real-time qPCR.	64
Εικόνα 31. Ποσοστά μη αρρενοειδικών αλληλουχιών που χαρακτηρίστηκαν μόνο με PCR ή απαιτήθηκε και επιπλέον ανάλυση με real-time qPCR.	64
Εικόνα 32. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων της PCR για τον έλεγχο του φύλου με το ζεύγος εκκινητών sc6626. Με δύο ζώνες είναι τα αρσενικά και με μια ζώνη είναι τα θηλυκά άτομα. L: μάρτυρας μοριακών μεγεθών, 38-52: κωδικοί ιστών.	69
Εικόνα 33. Real time PCR του HKG RPL19. Το Cq και των δύο δειγμάτων είναι πριν τους 30 κύκλους κάτι το οποίο αποδεικνύει τόσο την ύπαρξη καλής συγκέντρωσης cDNA όσο και τη λειτουργικότητά του.	69

Πίνακας περιεχομένων Πινάκων

Πίνακας 1. Μέρος του «Πίνακα 1» από τους Vicoso & Bachtrog, 2015. Στον πίνακα αυτό φαίνεται η πολυμορφικότητα στα συστήματα φυλετικών χρωμοσωμάτων στα Δίπτερα.	18
Πίνακας 2. Αντιδραστήρια και πρότυπα διαλύματα του kit dsDNA BR®.	45
Πίνακας 3. Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR με την Taq polymerase. Τα: ανάλογα τα Tm έκαστου ζεύγους.	47
Πίνακας 4. Πρωτόκολλο αντίδρασης real time – PCR. Τα: ανάλογα τα Tm έκαστου ζεύγους.	48
Πίνακας 5. Στάδια ανάπτυξης του δάκου της ελιάς από τα οποία έγινε απομόνωση ιστών με σκοπό την σύνθεση cDNA.	51
Πίνακας 6. Πίνακας αλληλουχιών του ζεύγους εκκινητών sc6626 που χρησιμοποιήθηκε στις PCR ανίχνευσης φύλου.	51
Πίνακας 7. Πρωτόκολλο καθαρισμού δειγμάτων RNA με DNase.	53
Πίνακας 8. Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR.	54
Πίνακας 9. Πρωτόκολλο αντίδρασης σύνθεσης cDNA.	55
Πίνακας 10. Ζεύγη εκκινητών που χαρακτηρίστηκαν ως αρρενοειδικά με PCR ανάλυση.	60

<i>Πίνακας 11. Ζεύγη εκκινητών που δεν ήταν επιτυχής ο χαρακτηρισμός ως αρρενοειδικά με PCR ανάλυση.</i>	60
<i>Πίνακας 12. Ζεύγη εκκινητών τα οποία αποκλείστηκαν από την ανάλυση με qPCR.</i>	63
<i>Πίνακας 13. Ζεύγη εκκινητών των οποίων ο χαρακτηρισμός ως αρρενοειδικά ή μη αρρενοειδικά έγινε με qPCR ανάλυση.</i>	63
<i>Πίνακας 14. Αποτελέσματα Βιοπληροφορικής ανάλυσης και των 34 αρρενοειδικών εκκινητών.</i>	66
<i>Πίνακας 15. Αποτελέσματα αντιπαραβολής των περιοχών που ενισχύαμε με τα δεδομένα RNAseq του δάκου της ελιάς στη βάση δεδομένων Apollo (i5k).</i>	67
<i>Πίνακας 16. Ζεύγη εκκινητών που επιλέχθηκαν για τη δημιουργία προφίλ έκφρασης.</i>	67
<i>Πίνακας 17. Στάδια ανάπτυξης του δάκου της ελιάς από τα οποία έγινε απομόνωση ιστών με σκοπό την σύνθεση cDNA.</i>	68
<i>Πίνακας 18. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ζεύγη εκκινητών, οι αλληλουχίες τους, το Tm κάθε εκκινητή, ποιοι εκκινητές ελέγχθηκαν μόνο με PCR, ποιοι χρειάστηκε επιπλέον ανάλυση με qPCR, ποιο το ΔCq αυτών που αναλύθηκαν και με qPCR και ποιο το Ta που χρησιμοποιήθηκε για κάθε ζεύγος εκκινητών.</i>	75
<i>Πίνακας 19. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ζεύγη των εκκινητών, το, θεωρητικά, Y – ειδικό Contig αλληλούχισης στο οποίο σχεδιάστηκαν και το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύουν.</i>	81
<i>Πίνακας 20. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης.</i>	83

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

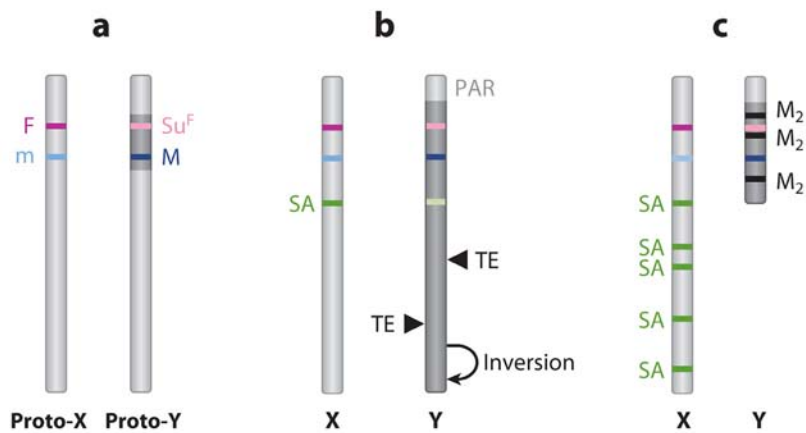
1. Εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων

Σε πολλούς ευκαρυωτικούς οργανισμούς, τα δύο φύλα έχουν διαφορετική χρωμοσωμική διάταξη. Συνήθως, το ένα φύλο (που ονομάζεται ετερογαμετικό) έχει ένα ζεύγος μορφολογικά διαφορετικών χρωμοσωμάτων, και το άλλο φύλο (που ονομάζεται ομογαμετικό) έχει δύο ταυτόσημα μέλη κάθε χρωμοσωμικού ζεύγους. Σε είδη με αρσενική ετερογένεια, τα φυλετικά χρωμοσώματα αναφέρονται ως χρωμοσώματα X και Y (XX θηλυκά, ομογαμετικά και XY αρσενικά, ετερογαμετικά). Στα είδη με θηλυκή ετερογένεια τα φυλετικά χρωμοσώματα, ονομάζονται Z και W (ZZ αρσενικά, ομογαμετικά και ZW θηλυκά, ετερογαμετικά) (Kaiser & Bachtrog, 2010). Οι ίδιες εξελικτικές αρχές που ισχύουν για τα συστήματα XY ισχύουν και για τα συστήματα ZW, με τις κατάλληλες αλλαγές στη διατύπωση.

1.1. Θεωρία προέλευσης των X και Y

Τα μορφολογικά και γενετικά διακριτά χρωμοσώματα X και Y που εμπλέκονται στον προσδιορισμό του φύλου έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα πολλές φορές τόσο στα ζώα όσο και στα φυτά (Charlesworth, 1996). Γενικά πιστεύεται ότι προέρχονται από ένα αρχικά πανομοιότυπο ζεύγος χρωμοσωμάτων (πρώτο-X και πρώτο-Y) μέσω μορφολογικής διαφοροποίησης. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα το ένα να είναι παραπροϊόν του εκφυλισμού του αρχικού χρωμοσώματος και να υπάρχει μόνο στο ετερογαμετικό φύλο, δηλαδή το χρωμοσώμα Y σε είδη με XY αρσενικά και XX θηλυκά. Κατ' αυτόν τον τρόπο το Y προστατεύεται πλήρως από τον γενετικό ανασυνδυασμό και πιστεύεται ότι αυτό βοηθά στη διατήρηση του γενετικού του περιεχομένου που είναι ευνοϊκό για τα αρσενικά άτομα (Bergero & Charlesworth, 2009), (Charlesworth et al., 2005).

Σύμφωνα με το μοντέλο της εξέλιξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων από την ερμαφροδική κατάσταση (Εικόνα 1), ένα ομόλογο ζεύγος αυτοσωμάτων αποκτά δύο τύπους που καθορίζουν το φύλο. Έτσι το ομόλογο αυτό ζεύγος χρωμοσωμάτων



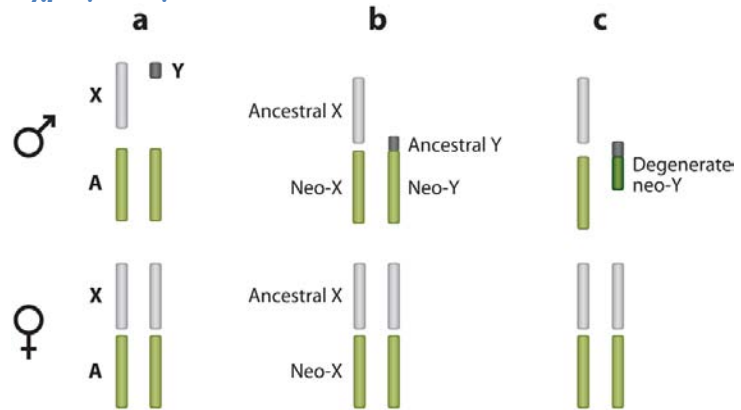
μετατρέπεται σε **Εικόνα 1. Το μοντέλο της εξέλιξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων** χρωμοσώματα proto-X

και proto-Y. Το proto-Y φέρει έναν κυρίαρχο θηλυκό καταστολέα (Female Suppressor, Su^F) και μια περιοχή αρσενικής γονιμότητας (M). Αντίστοιχα το proto-X φέρει περιοχές τόσο, θηλυκής γονιμότητας (F) όσο και αρσενικής στείρας (m). Ο ανασυνδυασμός μεταξύ αυτών των τύπων είναι περιορισμένος (βλ. Εικόνα 1 - σκούρο γκρι) για να αποφευχθεί η παραγωγή στείρων απογόνων χωρίς φύλο. Αυτή η καταστολή του ανασυνδυασμού επεκτείνεται με αποτέλεσμα την εισαγωγή μεταθετών στοιχείων (Transposable Elements, TEs), άλλων μη κωδικοποιητικών αλληλουχιών (πχ επαναλαμβανόμενο DNA) και χρωμοσωμικών αναδιατάξεων. Επιπλέον έχει ως αποτέλεσμα και την απόκτηση σεξουαλικά ανταγωνιστικών γονιδίων (Sexually antagonistic genes, SAs) που φέρουν διαφορετικά αλληλόμορφα

στα χρωμοσώματα X και Y. Τα X και Y ανασυνδυάζονται μόνο σε μια μικρή περιοχή, η οποία αποκαλείται ψευδοαυτοσωμική περιοχή (Pseudoautosomal Region, PAR). Τέλος το χρωμόσωμα Y συσσωρεύει περαιτέρω γονίδια γονιμότητας των αρσενικών (M2), ενώ το X συσσωρεύει σεξουαλικά ανταγωνιστικά (θηλυκό-ευεργετικά ή αρρενό-ευεργετικά) γονίδια (SAs) (Kaiser & Bachtrog, 2010). Κατ' αυτόν τον τρόπο έχουμε τη δημιουργία των νέων X και Y χρωμοσωμάτων.

1.1.1. Νέο-X και νέο-Y χρωμοσώματα

Τα χρωμοσώματα των εντόμων της τάξης των Δίπτερων (Diptera) χαρακτηρίζονται ως στοιχεία του Muller A έως F (Muller elements A-F). Ανάμεσα στις οικογένειες και στα είδη της τάξης των Δίπτερων φαίνεται να υπάρχει ποικιλία στα φυλετικά χρωμοσώματα. Στα Δίπτερα εμφανίζονται έντονα οι περιπτώσεις των νέο-X και νέο-Y χρωμοσωμάτων. Πιο



Εικόνα 2. Το μοντέλο της δημιουργίας νέο-X και νέο-Y χρωμοσωμάτων.

συγκεκριμένα αυτά τα χρωμοσώματα προκύπτουν από την μετατροπή αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων σε φυλετικά χρωμοσώματα και θεωρούνται ως δευτερεύοντα φυλετικά χρωμοσώματα (Vicoso & Bachtrog, 2015).

Στην **Εικόνα 2** φαίνεται συνοπτικά η διαδικασία μέσω της οποίας προκύπτουν τα νέα φυλετικά χρωμοσώματα. Πιο συγκεκριμένα, ο καρυότυπος του αρσενικού είναι XY/AA, και του θηλυκού είναι XX/AA. Το χρωμόσωμα Y συντήκεται με ένα από τα αυτοσώματα, δημιουργώντας ένα νέο χρωμόσωμα το νέο-Y που διαχωρίζεται από το νέο-X (αυτοσωμικό ομόλογο του) στα αρσενικά. Το νέο-X συμπεριφέρεται σαν κανονικό αυτοσωμικό χρωμόσωμα στα θηλυκά και μεταβιβάζεται, στις επόμενες γενιές, μαζί με το αληθινό X. Η έλλειψη ανασυνδυασμού στο αρσενικό άτομο εξασφαλίζει ότι το νέο-Y είναι γενετικά απομονωμένο από το νέο-X. Αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει γενετική ανταλλαγή μεταξύ αυτών των χρωμοσωμάτων. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, το μη ανασυνδυαζόμενο νέο-Y θα εκφυλιστεί, όπως και το αρχικό Y χρωμόσωμα (Kaiser & Bachtrog, 2010). Σε γενικές γραμμές, το ποσοστό του εκφυλισμού του νέο-Y και το εύρος της απώλειας γονιδίων από αυτό αντικατοπτρίζει την ηλικία του χρωμοσώματος (Zhou & Bachtrog, 2015).

Οι Bachtrog και Vicoso στην εργασία τους “Numerous Transitions of Sex Chromosomes in Diptera” (Vicoso & Bachtrog, 2015), μετά από ανάλυση των γονιδιωμάτων 37 διαφορετικών ειδών από τις 22 διαφορετικές οικογένειες των Δίπτερων, κατέληξαν σε μια σειρά από στοιχεία του Muller τα οποία ήταν νέο-φυλετικά χρωμοσώματα. Με αυτόν τον τρόπο έδειξαν μια κρυμμένη ποικιλία φυλετικών χρωμοσωμάτων, στα Δίπτερα, πίσω από γενικά όμοιους καρυότυπους. Σε κάποιες περιπτώσεις η προσθήκη αυτοσωμικού χρωμοσώματος στα φυλετικά έγινε αρκετά πρόσφατα με αποτέλεσμα να υπάρχει ακόμη μια καλή ομολογία ανάμεσα στα νέο-X και νέο-Y (πχ στοιχείο Muller C στην *D. miranda*). Σε άλλες πάλι περιπτώσεις αυτές οι συντήξεις χρωμοσωμάτων έγιναν αρκετό καιρό πριν με αποτέλεσμα να μην υπάρχει πλέον εμφανής ομολογία (πχ στοιχείο Muller D στην *D. miranda*). Τέλος

υπήρχαν και περιπτώσεις που τα νέο-φυλετικά χρωμοσώματα δημιουργήθηκαν τόσο πρόσφατα με αποτέλεσμα το νέο-Y να ταυτίζεται με το νέο-X. Για να ξεπεράσουν αυτό το πρόβλημα κατά την ανάλυση κατέφυγαν σε επιπλέον ανάλυση και των SNP συγκρίνοντας τα SNP των αρσενικών με αυτά των θηλυκών. Αυτή η ταυτοποίηση είναι δυνατή να γίνει στο ετερογαμετικό φύλο λόγω της συσσώρευσης των SNP στα νεογέννητα φυλετικά χρωμοσώματα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα αυτοσώματα (Vicoso & Bachtrog, 2015).

1.1.2. Το πρόβλημα των X και Y χρωμοσωμάτων

Η εξελικτική θεωρία προβλέπει ότι ένα γονιδίωμα το οποίο δεν ανασυνδυάζεται είναι ευάλωτο στη συσσώρευση αρνητικών μεταλλάξεων και θα παρουσιάσει χαμηλά ποσοστά προσαρμοστικότητας (Charlesworth et al., 2005). Πράγματι, ένα εντυπωσιακό κοινό χαρακτηριστικό πολλών ταξινομικών ομάδων είναι η σχεδόν πλήρης απώλεια των γονιδίων από το χρωμόσωμα Y. Επίσης το χρωμόσωμα Y περιέχει συχνά μια ασυνήθιστη αφθονία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA. Τα χρωμοσώματα X, αντίθετα, διατηρούν τα περισσότερα από τα προγονικά τους γονίδια και έχουν αναπτύξει, επιπλέον, μοναδικά χαρακτηριστικά για να αντιμετωπίσουν τις ασυνήθιστες προκλήσεις σε σχέση με τα αυτοσώματα (Kaiser & Bachtrog, 2010).

Κάποιες από αυτές τις προκλήσεις είναι, πρώτον, το γεγονός πως η απώλεια της γονιδιακής λειτουργίας στο Y δημιουργεί μια διαφορά της δόσης των γονιδίων για τα συνδεδεμένα με το X γονίδια στα αρσενικά. Για να αντισταθμιστούν οι ανεπάρκειες των δόσεων των γονιδίων, τα χρωμοσώματα X έχουν αποκτήσει περίτεχνους μηχανισμούς αντιστάθμισης δΟΣΟΛΟΓΙΑΣ (Dosage Compensation, DC) (Charlesworth, 1996), (Siegal & Baker, 2000). Δεύτερον, τα φυλετικά χρωμοσώματα δείχνουν να διαχωρίζονται φυλοειδικά, με το χρωμόσωμα Y να περιορίζεται στα αρσενικά και το χρωμόσωμα X να δείχνει θηλυκοειδική μεταβίβαση (καθώς περνάει κατά ποσοστό 2/3 στην επόμενη γενιά μέσω των θηλυκών). Επιπρόσθετα, θα μπορούσαμε να πούμε πως αυτή η «μεροληπτική» μεταβίβαση των χρωμοσωμάτων X και Y υποδηλώνει την ευκαιρία για ανταγωνιστική επιλογή και κατανομή μεταλλάξεων, είτε αρρενό-ευεργετικών είτε θηλυκό-ευεργετικών, αλλά και για την εμφάνιση γενετικών συγκρούσεων σχετικά με τις αναλογίες των φύλων (W. R. Rice, 1983).

Επιπλέον, στα περισσότερα είδη, το X χρωμόσωμα καθίσταται μεταγραφικά ανενεργό καθ' όλη τη διάρκεια της σπερματογένεσης (Meiotic Sex Chromosome Inactivation, MSCI). Έχει προταθεί ότι ο MSCI εξελίχθηκε είτε ως αντίδραση στην ανταγωνιστική επιλογή, διώχνοντας γονίδια σχετικά με τη σπερματογένεση από το X (Wu & Xu, 2003), είτε έχοντας ως στόχο την πρόληψη της επανειλημμένης εμφάνισης μειωτικών κινητήριων στοιχείων (meiotic drive elements) στο X (Moore et al., 1995). Τέλος, η ημιζυγωτία του X χρωμοσώματος στα αρσενικά άτομα υποδεικνύει ότι η φυσική επιλογή θα δράσει διαφορετικά στο X απ' ό τι στα αυτοσώματα (Charlesworth et al., 1987).

1.2. Φυλετικά χρωμοσώματα στα έντομα

Τα έντομα αποτελούν την πιο ποικιλόμορφη ομάδα ζωικών οργανισμών και εξίσου ποικίλοι είναι και οι μηχανισμοί προσδιορισμού του φύλου τους. Μεταξύ των ειδών με φυλετικά χρωμοσώματα υπάρχουν τα συστήματα με αρσενική ετερογένεια (XY), όπως *Drosophila melanogaster* ή θηλυκή ετερογένεια (ZW), όπως οι πεταλούδες και οι σκώροι. Επίσης, το επίπεδο διαφοροποίησης των χρωμοσωμάτων του φύλου ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ομάδων. Για παράδειγμα, στην *Megaselia scalaris*, τα X και Y δεν μπορούν να διακριθούν κάτω από το μικροσκόπιο (W. Traut,

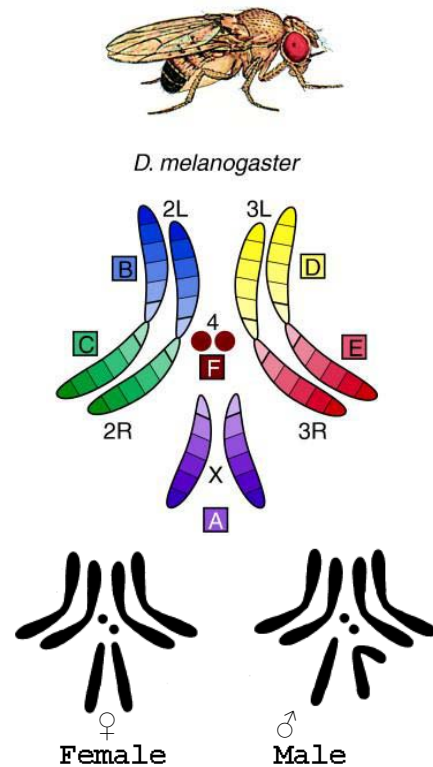
1994), ενώ στις πεταλούδες το χρωμόσωμα W είναι γενικά πολύ μικρότερο από το Z, σχηματίζοντας ετεροχρωματικά σωμάτια στο κύτταρο (Traut et al., 2008). Στις ακρίδες, τους γρύλους και τις κατσαρίδες, το αρχικό χρωμόσωμα Y έχει χαθεί πλήρως, δηλαδή τα αρσενικά φέρουν ένα μόνο X, ενώ τα θηλυκά είναι XX.

1.2.1. *Drosophila melanogaster*

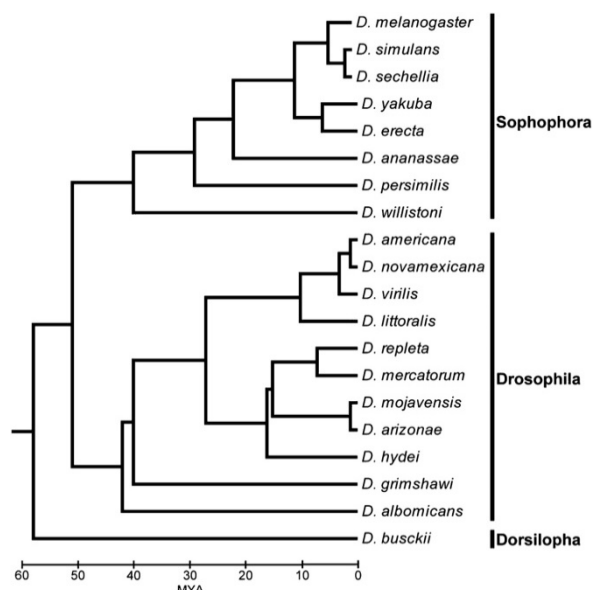
Το σύστημα των φυλετικών χρωμοσωμάτων στη *Drosophila* είναι ίσως το καλύτερα μελετημένο σύστημα μεταξύ των εντόμων. Στην *D. melanogaster*, το χρωμόσωμα Y είναι μικρό, εντελώς ετεροχρωματικό και αποτελείται κυρίως από επαναλαμβανόμενο DNA και μεταθετά στοιχεία. Περιέχει περίπου 20 γονίδια, τα περισσότερα από τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες σχετικές με ειδικές λειτουργίες όπως είναι η κινητικότητα του σπέρματος (Carvalho et al., 2000), (Carvalho et al., 2001), (Gepner & Hays, 1993), (Vibrantovski et al., 2008). Το σύστημα αυτό εκτιμάται ότι έχει ηλικία τουλάχιστον 60 εκατομμυρίων ετών. Αυτό προκύπτει με βάση τα στοιχεία για πέντε γονίδια που συνδέονται με το Y και είναι κοινά μεταξύ των υπογενών *Drosophila* και *Sophophora* (Carvalho & Clark, 2005), (Koerich et al., 2008) (Εικόνα 4).

Τα περισσότερα γονίδια που συνδέονται με το Y είναι μεγέθους μεγαβάσης λόγω των γιγαντιαίων ιντρονίων που περιλαμβάνουν (Gatti & Pimpinelli, 1983), τα οποία αποτελούνται από εκτεταμένα συγκροτήματα εκφυλισμένων μεταθετών στοιχείων ή/και μεγάλων συστάδων δορυφορικού DNA. Τα αρσενικά που στερούνται του χρωμοσώματος Y είναι βιώσιμα αλλά στείρα. Αυτό υποδεικνύει ότι τα συνδεδεμένα με το Y γονίδια έχουν λειτουργίες που σχετίζονται άμεσα με την γονιμότητα των αρσενικών (Bridges, 1916), (Brosseau, 1960).

Είναι ενδιαφέρον ότι όλα τα συνδεδεμένα με το Y γονίδια της *D. melanogaster* φαίνεται να μην προέρχονται από ένα εκφυλισμένο X ομόλογο, αλλά αντ' αυτού φαίνεται πως αποκτήθηκαν μεταγενέστερα από αυτοσώματα (Carvalho, 2002). Αυτό υποδηλώνει ότι σχεδόν όλα τα αρχικά γονίδια χάθηκαν από το Y και τα γονίδια που βρίσκονται τώρα στο Y είναι μεταγενέστερες προσθήκες εξαιτίας ενός αρρενο-ειδικού



Εικόνα 3. A) Τα χρωμοσώματα της *D. mel.* Φαίνονται τα στοιχεία Muller. B) Η διαφορά στον καρύοτυπο θηλυκού με αρσενικό στα φυλετικά χρωμοσώματα (στοιχείο Muller A).



Εικόνα 4. Το φυλογενετικό της οικογένειας των *Drosophilidae*.

πλεονεκτήματος που παρέχουν στα αρσενικά άτομα. Η μεταβλητότητα της αλληλουχίας του Y χρωμοσώματος, στους φυσικούς πληθυσμούς της *D. melanogaster* και των στενών συγγενών της, έχει μειωθεί σε μεγάλο βαθμό (Bachtrog et al., 2006), (Zurovcova & Eanes, 1999). Αυτό αντανακλά τις επιλεκτικές σαρώσεις (selective sweeps) σε ολόκληρο το χρωμόσωμα που συνοδεύουν τη σταθεροποίηση αυτών των γονιδίων.

Η έλλειψη ομολογίας μεταξύ των χρωμοσωμάτων X και Y στην *D. melanogaster* οδήγησε στην υπόθεση ότι το Y στη *Drosophila* δεν αντιστοιχεί σε ένα εκφυλισμένο X χρωμόσωμα. Αντίθετα, το Y, μπορεί να προέρχεται από ένα χρωμόσωμα B, ένα μικρό χρωμόσωμα που απέκτησε την ικανότητα να ζευγαρώνει με το X και να διαχωρίζεται στις αρσενικές μύγες όπως ένα χρωμόσωμα Y (Carvalho, 2002), (Hackstein et al., 1996). Ένας τρόπος για να επιλυθεί το ζήτημα του εάν το Y αντιπροσωπεύει ένα εκφυλισμένο αντίγραφο του αρχικού χρωμοσώματος X ή ένα δευτερογενώς αποκτηθέν B χρωμόσωμα θα ήταν να καθοριστεί η προγονική κατάσταση των φυλετικών χρωμοσωμάτων στο σύστημα της *Drosophila* χρησιμοποιώντας ένα άλλο είδος ως εξωτερική ομάδα. Εάν το προγονικό σύστημα ήταν πράγματι XO, αυτό θα υποστήριζε την ιδέα ότι το χρωμόσωμα Y της *Drosophila* αποκτήθηκε δευτερευόντως και δεν είναι ένα εκφυλισμένο χρωμόσωμα X.

Εκτός από το αρχαίο Y χρωμόσωμα που υπάρχει μεταξύ των περισσότερων μελών του γένους της *Drosophila*, ορισμένα είδη έχουν αποκτήσει και νέα δευτερεύοντα φυλετικά χρωμοσώματα. Τα χρωμοσώματα αυτά ονομάζονται νέο-φυλετικά χρωμοσώματα και έχουν κληρονομηθεί ως φυλετικά χρωμοσώματα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Αυτό, αμέσως, συνεπάγεται το ότι κάθε νέο-φυλετικό ζεύγος χρωμοσωμάτων βρίσκεται και σε διαφορετικό στάδιο κατά τη μετάβασή του από ένα συνηθισμένο ζεύγος αυτοσωμάτων σε ένα ετερομορφικό ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων. Ένα ζευγάρι χρωμοσωμάτων νέο-Y/ νέο-X σχηματίζεται από μια σύντηξη μεταξύ ενός αυτοσωμικού και ενός φυλετικού χρωμοσώματος (Εικόνα 2). Ως αποτέλεσμα μιας τέτοιας σύντηξης, ένα μέλος του ζεύγους αυτοσωμάτων (το νέο-Y) μεταβιβάζεται ή κληροδοτείται από τον πατέρα στον γιο σε συνδυασμό με το πραγματικό Y χρωμόσωμα. Το ομόλογο χρωμόσωμά του (το νέο-X) μεταβιβάζεται με το αληθινό X. Στην *Drosophila*, η απουσία διασταυρώσεως στα αρσενικά εξασφαλίζει ότι ένα τέτοιο χρωμόσωμα νέο-Y είναι γενετικά απομονωμένο από το ζευγάρι του (νέο-X) (Lucchesi, 1978). Στην πραγματικότητα, το νέο-Y χρωμόσωμα προστατεύεται εντελώς από τον ανασυνδυασμό, ενώ το νέο-X διατηρεί ακόμη την δυνατότητα να ανασυνδυάζεται στα θηλυκά.

Στη *Drosophila*, το προγονικό X χρωμόσωμα αντιστοιχεί στο στοιχείο A του Muller (Muller, 1940). Στην γενεαλογία που οδηγεί στην *Drosophila pseudoobscura*, περίπου 13 εκατομμύρια χρόνια πριν, προέκυψε ένα αρχαίο νέο-φυλετικό χρωμοσωμικό σύστημα. Αυτό το σύστημα προέκυψε όταν το στοιχείο D του Muller (χρωμοσωμικός βραχίονας 3L στη *D. melanogaster*) συντήχθηκε με το υπάρχον χρωμόσωμα X. Το νέο-Y χρωμόσωμα του *D. pseudoobscura* (δηλαδή το πρώην ομόλογο του συντηγμένου χρωμοσώματος 3L) έχει εκφυλιστεί και το νέο-X έχει αποκτήσει τους ίδιους μοριακούς μηχανισμούς που χρησιμοποιούνται και από το προγονικό χρωμόσωμα X της *Drosophila* (Bone & Kuroda, 1996), (Marín et al., 1996). Ωστόσο, η προέλευση του Y της *D. pseudoobscura* εξακολουθεί να είναι ασαφής. Εάν είναι πράγματι ένα νέο-Y χρωμόσωμα, τότε τι συνέβη με το προγονικό Y που βρίσκεται τόσο στη *D. melanogaster* όσο και στη *D. hydei*; Μια ακόμη εντυπωσιακή παρατήρηση είναι ότι τα ομόλογα έξι γονιδίων που συνδέονται με το Y της *D. melanogaster* βρέθηκαν να είναι στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα στην *D.*

pseudoobscura (Carvalho & Clark, 2005), και τα οποία χαρτογραφήθηκαν σε ένα συνεχές μπλοκ στο χρωμόσωμα 15 (dot) (Larracuent, et al., 2010). Αντιστρόφως, 15 γονίδια που εδράζονται στο χρωμόσωμα Y της *D. pseudoobscura* βρέθηκαν σε γονιδιωματικές θέσεις διαφορετικές από αυτές του χρωμόσωματος Y στην *D. melanogaster* (Carvalho & Clark, 2005), ενώ οι περισσότερες από αυτές αντιστοιχούσαν σε γονίδια που προέρχονται από το στοιχείο D του Muller. Αυτές οι παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι περίπου την ίδια χρονική στιγμή με το σχηματισμό του νέο-X, το αρχικό χρωμόσωμα Y της *D. pseudoobscura* μετατοπίστηκε σε ένα αυτόσωμα και αντικαταστάθηκε από ένα νέο χρωμόσωμα Y που προήλθε από ένα αυτοσωμικό τμήμα (Carvalho & Clark, 2005), το οποίο πιθανώς να είναι το ομόλογο προς το χρωμόσωμα νέο-X.

Μια ακόμη σύντηξη φυλετικού χρωμοσώματος με αυτοσωμικό εμφανίστηκε και στη γενεαλογία της *Drosophila miranda*, ενός στενού συγγενή της *D. pseudoobscura*. Αυτή τη φορά, το στοιχείο C του Muller συντήχθηκε με το χρωμόσωμα Y (Steinemann et al., 1993), (Yi & Charlesworth, 2000). Το νέο-Y χρωμόσωμα της *D. miranda* εξακολουθεί να διαχωρίζεται ως φυσιολογικό αυτόσωμα στις *Drosophila persimilis* και *D. pseudoobscura*, τους στενότερους συγγενείς του *D. miranda*. Αυτό το γεγονός μας δίνει τη δυνατότητα υπολογίσουμε ότι η ηλικία του συστήματος αυτού είναι το πολύ δύο εκατομμύριων ετών (Yi & Charlesworth, 2000). Στην *Drosophila americana*, η οποία ανήκει σε μια διαφορετική γενεαλογία του γένους *Drosophila*, μια σύντηξη μεταξύ του χρωμοσώματος X και του στοιχείου B του Muller δεν είναι καθορισμένη σε ολόκληρο το είδος (McAllister, 2002), (McAllister & Charlesworth, 1999). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να υπάρχουν θηλυκά με $2n = 10$, 11 ή 12 χρωμοσώματα. Ομοίως, η *Drosophila albomicans* περιέχει ένα σύστημα νέο-φυλετικών χρωμοσωμάτων το οποίο σχηματίστηκε πολύ πρόσφατα (Bachtrog, 2006b).

Έτσι, τα νέο-φυλετικά χρωμοσώματα της *Drosophila* παρέχουν ένα ισχυρό σύστημα που επιτρέπει τη συγκριτική μελέτη των φυλετικών χρωμοσωμάτων σε διαφορετικά στάδια κατά την εξελικτική μετάβασή τους από τα συνηθισμένα αυτοσώματα στα ετερόμορφα φυλετικά χρωμοσώματα (Kaiser & Bachtrog, 2010).

1.2.2. Άλλα δίπτερα

Η τάξη των Δίπτρων, στην οποία ανήκει και η *Drosophila*, έχει συντηρημένη μορφή καρυότυπου που αποτελείται από έξι χρωμοσωμικούς βραχίονες πέντε μεγάλους και έναν που ομοιάζει με τελεία (dot) (Εικόνα 3).

Οι Bachtrog και Vicoso (Vicoso & Bachtrog, 2015) μετά από ανάλυση ολόκληρου του γονιδιώματος σε 37 είδη που ανήκουν σε 22 διαφορετικές οικογένειες των Δίπτρων (μύγες και κουνούπια) αποκάλυψαν μια τεράστια κρυφή ποικιλομορφία στα φυλετικά χρωμοσώματα μεταξύ των μυγών (Πίνακας 1). Συγκεκριμένα ταυτοποίησαν δεκατέσσερις διαφορετικές συνθέσεις φυλετικών χρωμοσωμάτων. Πάρα ταύτα, το μικρό (dot) χρωμόσωμα χρησιμοποιείται επανειλημμένα ως το φυλετικό χρωμόσωμα, κάτι το οποίο υποδηλώνει, πιθανώς, τον προγονικό καρυότυπο των αρχαίων Δίπτρων. Επιπλέον, ταυτοποίησαν είδη με αδιαφοροποίητα φυλετικά χρωμοσώματα, είδη στα οποία ένα διαφορετικό χρωμόσωμα αντικατέστησε το dot χρωμόσωμα ως φυλετικό χρωμόσωμα, είδη στα οποία ενσωματώθηκαν έως και τρία νέα χρωμοσωμικά στοιχεία στα φυλετικά χρωμοσώματα, αλλά και είδη με θηλυκή ετερογαμετικότητα (ZW φυλετικά χρωμοσώματα).

Οι μύγες στα Δίπτερα χωρίζονται στα παραφυλετικά κατώτερα (αρχαιότερα) Δίπτερα (lower Diptera, Nematocera) και στα μονοφυλετικά ανώτερα (νεότερα)

Δίπτερα (higher Diptera, Brachycera) (βλ. φυλογενετικό δέντρο [Εικόνα 5](#)). Στα κατώτερα Δίπτερα βρίσκουμε τις μύγες γερανούς (crane flies) οι οποίες έχουν διαφοροποιημένα φυλετικά χρωμοσώματα, με το στοιχείο F του Muller να λειτουργεί ως το X χρωμόσωμα. Τα κουνούπια (mosquitoes) και οι φλεβοτόμοι (sandflies) δεν έχουν διαφοροποιημένα φυλετικά χρωμοσώματα με εξαίρεση το γένος *Anopheles* το οποίο έχει αποκτήσει ένα νέο ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων που αντιστοιχεί στο στοιχείο A του Muller. Στις μύγες της κοπριάς (dung midges) και στις μύγες των κηκίδων (gall midges) το dot χρωμόσωμα λειτουργεί ως φυλετικό με εξαίρεση την προσθήκη των στοιχείων του Muller C, D και μέρους του E στις μύγες των κηκίδων.

Στα ανώτερα Δίπτερα το dot χρωμόσωμα λειτουργεί, ακόμη, ως φυλετικό χρωμόσωμα στα είδη που διακλαδώθηκαν νωρίς. Τέτοια παραδείγματα είναι οι μύγες στρατιώτες (soldier flies) και οι μύγες μακρόποδες (long-legged flies). Τα στοιχεία αυτά υποδεικνύουν ότι μάλλον το dot χρωμόσωμα είναι το προγονικό φυλετικό χρωμόσωμα για όλα τα ανώτερα Δίπτερα. Το dot χρωμόσωμα είναι το φυλετικό χρωμόσωμα στην πλειοψηφία των οικογενειών και έχει παραμείνει το φυλετικό χρωμόσωμα σε αρκετές μείζονες διακλαδώσεις στις μύγες, συμπεριλαμβανομένων των μυγών των φρούτων (true fruitflies, Tephritidae) ή των πολύ νεότερων μυγών, όπως οι κρεατόμυγες (blowflies) και οι σαρκόμυγες (fleshflies). Έτσι οδηγούμαστε στο συμπέρασμα ότι αυτό το χρωμοσωμικό στοιχείο έχει συνδεθεί με το φύλο για πάνω από 200 εκατομμύρια χρόνια εξέλιξης σε πολλές οικογένειες των ανώτερων μυγών. Ένα ακόμη στοιχείο που ενισχύει αυτό το συμπέρασμα είναι ότι το γονιδιακό περιεχόμενο το dot χρωμοσώματος είναι πολύ καλά διατηρημένο κατά μήκος της εξέλιξης των Δίπτρων από τα κατώτερα έως και τα ανώτερα. Αξιοσημείωτο, επίσης, είναι και το γεγονός πως ενώ σχεδόν όλα τα ανώτερα Δίπτερα έχουν αρσενική ετερογαμία υπάρχει μια υποομάδα στις μύγες των φρούτων που ονομάζεται Tephritinae και έχει θηλυκή ετερογαμία. Ακόμη και σε αυτά όμως το μικρό dot χρωμόσωμα είναι αυτό το οποίο παίζει τον ρόλο του Z με τα αρσενικά να έχουν δύο χρωμοσώματα Z.

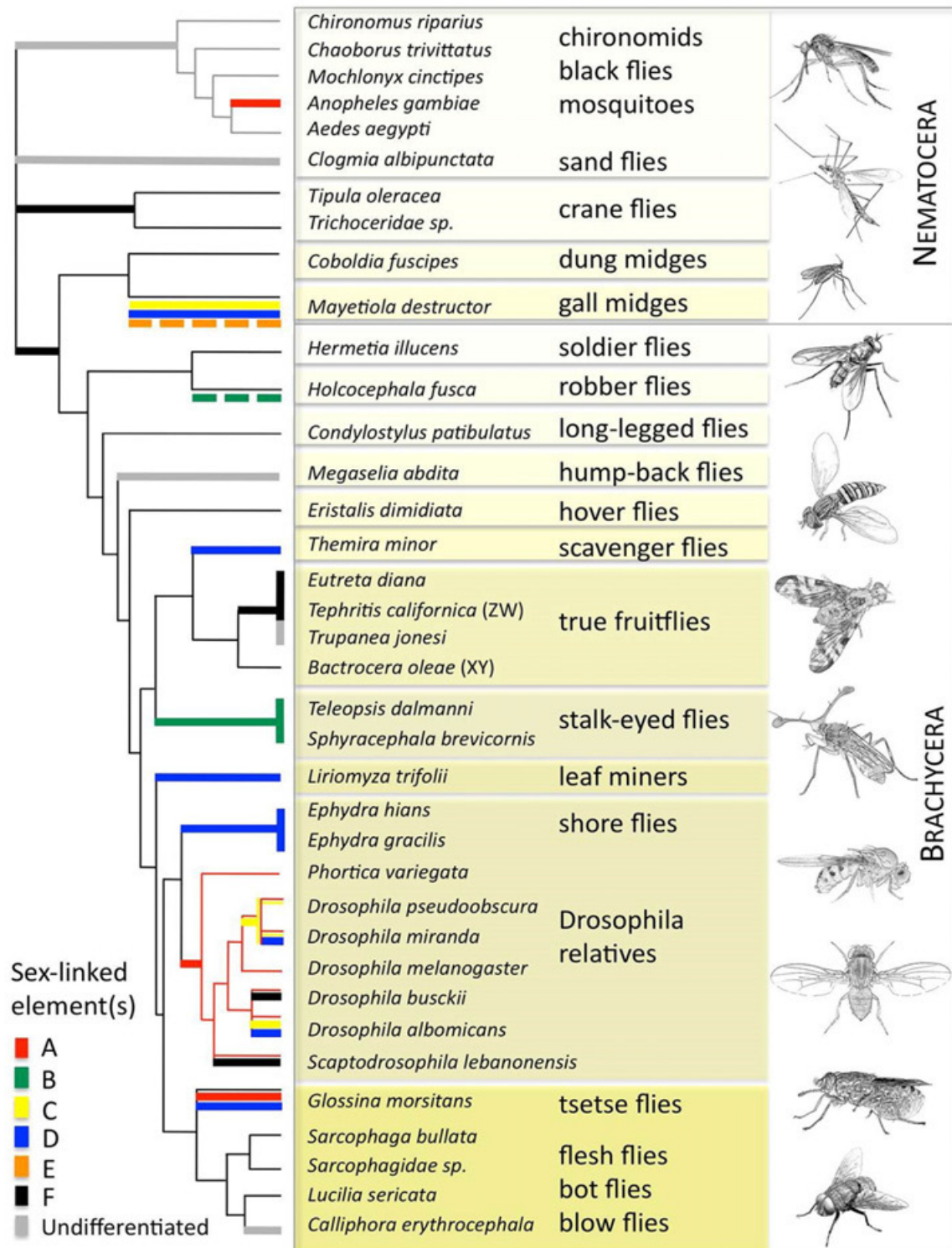
Σε κάποια από τα ανώτερα Δίπτερα επιπλέον χρωμοσώματα ενσωματώθηκαν στα φυλετικά. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν αυτά της μύγας τσε-τσε και της μύγας κλέφτης (robberfly). Στην μεν πρώτη, με προγονικό χρωμόσωμα X (στοιχείο F του Muller) συντήχθηκαν τα στοιχεία του Muller A και D, στη δε δεύτερη ένα μέρος του στοιχείου B του Muller συντήχθηκε με το προγονικό dot χρωμόσωμα.

Σε άλλες οικογένειες Δίπτρων ένα διαφορετικό στοιχείο το Muller αντικατέστησε πλήρως το προγονικό dot χρωμόσωμα. Τέτοια παραδείγματα είναι το στοιχείο D στις μύγες της παραλίας (shoreflies), στις μαύρες μύγες οδοκαθαριστές (black scavenger flies) και στις μύγες ανθρακωρύχους των φύλλων (leafminers), το στοιχείο A στις μύγες των φρούτων (Δροσοφυλοειδή) και το στοιχείο B στις μύγες με μάτια με μίσχους (stalk-eyed flies).

Τέλος άλλα είδη των ανώτερων Δίπτρων, όπως η μύγα καμπούρης (hump-backedfly) *Megaselia abdita*, έχασαν εντελώς τα διαφοροποιημένα σεξουαλικά τους χρωμοσώματα ([Vicoso & Bachtrog, 2015](#)).

Species	Family	sex chromosome
Nematocera Group I		
<i>Tipula oleracea</i>	Tipulidea	dot
Trichoceridae sp.	Trichoceridae	dot
Nematocera Group II		
<i>Chironomus riparius</i>	Chironomidae	undifferentiated
<i>Chaoborus trivittatus</i>	Chaoboridae	undifferentiated
<i>Mochlonyx cinctipes</i>	Culicidae	undifferentiated
<i>Anopheles gambiae</i>	Culicidae	A
<i>Aedes aegypti</i>	Culicidae	undifferentiated
<i>Clogmia albipunctata</i>	Psychodidae	undifferentiated
Nematocera Group III		
<i>Coboldia fuscipes</i>	Scatopsidae	dot
Nematocera Group IV		
<i>Mayetiola destructor</i>	Cecidomyiidae	C,D,F
Brachycera		
<i>Hermetia illucens</i>	Stratiomyidae	dot
<i>Megaselia abdita</i>	Phoridae	undifferentiated
<i>Eristalis dimidiata</i>	Syrphidae	dot
<i>Holcocephala fusca</i>	Asioidea	dot + B(partial)
<i>Condylostylus patibulatus</i>	Dolichopodidae	dot
<i>Bactrocera oleae</i>	Tephritidae	dot
<i>Tephritis californica</i>	Tephritidae	dot
<i>Eutreta diana</i>	Tephritidae	dot
<i>Trupanea jonesi</i>	Tephritidae	dot
<i>Ephydra hians</i>	Ephydridae	D
<i>Ephydra gracilis</i>	Ephydridae	D
<i>Scaptodrosophila lebanonensis</i> (female-only assembly)	Drosophilidae	A+dot
<i>Drosophila busckii</i> (female-only assembly)	Drosophilidae	A+dot
<i>Drosophila pseudoobscura</i>	Drosophilidae	A+D
<i>Drosophila miranda</i>	Drosophilidae	A+C+D
<i>Drosophila melanogaster</i>	Drosophilidae	A
<i>Drosophila albomicans</i>	Drosophilidae	A+C+D
<i>Phortica variegata</i>	Drosophilidae	A
<i>Teleopsis dalmanni</i>	Diopsidae	B
<i>Sphyracephala brevicornis</i>	Diopsidae	B
<i>Themira minor</i>	Sepsidae	D
<i>Liriomyza trifolii</i>	Agromyzidae	D
<i>Sarcophaga bullata</i>	Sarcophagidae	dot
Sarcophagidae sp.	Sarcophagidae	dot
<i>Glossina morsitans</i>	Glossinidae	A, D, F
<i>Lucilia sericata</i>	Calliphoridae	dot
<i>Calliphora erythrocephala</i>	Calliphoridae	undifferentiated

Πίνακας 1. Μέρος του «Πίνακα 1» από τους Vicoso & Bachtrog, 2015. Στον πίνακα αυτό φαίνεται η πολυμορφικότητα στα συστήματα φυλετικών χρωμοσωμάτων στα Δίπτερα.



Εικόνα 5. Τα φυλετικά χρωμοσώματα στα Δίπτερα χαρτογραφημένα στο φυλογενετικό τους δέντρο

1.2.3. Άλλα έντομα

Ενώ στη *Drosophila* υπάρχουν μόνο 4-6 ζεύγη χρωμοσωμάτων, τα φυλετικά χρωμοσώματα στα Λεπιδόπτερα (Lepidoptera) αποτελούν πολύ μικρότερο ποσοστό του γονιδιώματος, αν λάβουμε υπόψη ότι ένα απλοειδές τους γονιδίωμα αποτελείται από περίπου 30 χρωμοσώματα. Μεταξύ των βασικότερων Λεπιδόπτερων και Τριχόπτερων (Trichoptera) (μύγες caddis), τα θηλυκά είναι ZO και τα αρσενικά ZZ,

υποδηλώνοντας ότι αυτή είναι η προγονική κατάσταση (Traut et al., 2008). Πολύ νωρίς στην ιστορία των Λεπιδόπτερων μια σύντηξη μεταξύ του χρωμοσώματος Z και ενός αυτοσωμικού φαίνεται να έχει οδηγήσει στη δημιουργία του χρωμοσώματος W. Το χρωμόσωμα W είναι στην πραγματικότητα ένα νέο-W και βρίσκεται πλέον στο 98% περίπου των ειδών της τάξης αυτής (Traut et al., 2008). Σε ορισμένες γενεαλογίες, το W ήταν δευτερογενώς χαμένο ή συγχωνευμένο με ένα διαφορετικό αυτόσωμα, δημιουργώντας μια ποικιλία από διαφορετικά φυλετικά χρωμοσώματα. Παρ' όλα αυτά τα αρσενικά παραμένουν το ομογαμετικό φύλο (Traut et al., 2008).

Στον μεταξοσκώληκα, *B. mori*, το χρωμόσωμα W είναι ετεροχρωματινικό, και συνίσταται, σε μεγάλο βαθμό, από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Χαρακτηριστικά, στο πρόγραμμα αλληλούχησης του *Bombyx*, το W δεν είχε αλληλουχηθεί (Mita et al., 2004), καθώς η ετεροχρωματινή είναι πολύ δύσκολο να αλληλουχηθεί, με αποτέλεσμα το γενετικό του περιεχόμενο να είναι σε γενικές γραμμές άγνωστο. Μόνο ο θηλυκός παράγοντας *fem* έχει χαρτογραφηθεί στο χρωμόσωμα W του *Bombyx* (Abe et al., 2008), αν και δεν έχει αποκρυπτογραφηθεί ακόμη η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Εκτός από το *fem*, στο W έχουν χαρτογραφηθεί μόνο ανώνυμοι δείκτες RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), προερχόμενοι κυρίως από μεταθετά στοιχεία (Abe et al., 2005). Ωστόσο, δεδομένου ότι το W είναι πολύ μικρότερο από το Z, πιθανότατα και να περιέχει πολύ λιγότερα γονίδια.

Η *Drosophila* δεν είναι η μόνη μύγα με ενδιαφέροντα φυλετικά χρωμοσώματα. Στην *Megaselia scalaris*, τα X και Y είναι ομομορφικά και είναι ένα από τα τρία μόνο ζεύγη χρωμοσωμάτων. Σε μερικά στελέχη της *M. scalaris*, ο παράγοντας καθορισμού του αρσενικού φύλου έχει μεταφερθεί σε ένα διαφορετικό χρωμόσωμα (Traut & Willhoeft, 1990). Μια τέτοια μετακίνηση μπορεί να δημιουργήσει νέα πιθανά φυλετικά χρωμοσώματα, με το ομόλογο του χρωμοσώματος που περιέχει τον παράγοντα αρρενοποίησης να μετατρέπεται σε νέο-X. Στα παλαιότερα φυλετικά χρωμοσώματα της *M. scalaris*, τα X και Y δείχνουν κάποια σχετική διαφοροποίηση όπως, για παράδειγμα, παρεμβολές και διαγραφές στην μη κωδική αλληλουχία, που τα διακρίνει (Traut & Wollert, 1998).

Παρόμοιο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η μύγα, *Musca domestica*. Ο παράγοντας αρρενοποίησης M είναι Y συνδεδεμένος, αλλά σε μερικούς πληθυσμούς βρίσκεται σε ένα από τα πέντε αυτοσώματα ή ακόμα και στο χρωμόσωμα X (Hamm & Scott, 2009), (Scott et al., 2009). Προτάθηκε πρόσφατα ότι η μόνη λειτουργία του M είναι η παρέμβαση στην αυτορρύθμιση του θηλυκού παράγοντα F (γονίδιο *tra*) καθώς οι μεταλλάξεις στον F που οδηγούν σε μη ευαισθησία στην παρουσία του M οδηγούν σε ετερογαμετικά θηλυκά (Hediger et al., 2010).

Στο κουνούπι *Anopheles gambiae*, τα αρσενικά είναι το ετερογαμετικό φύλο και το χρωμόσωμα X είναι πιθανώς το ομόλογο του X της *Drosophila* (Zdobnov et al., 2002). Ωστόσο, τα κουνούπια του γένους *Aedes* έχουν ομομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα (Presgraves & Orr, 1998), γεγονός που υποδηλώνει ότι τα X χρωμοσώματα της *D. melanogaster* και του *Anopheles* προέρχονται, ανεξάρτητα μεν, αλλά από το ίδιο ζεύγος αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων (Kaiser & Bachtrog, 2010).

1.3. Εκφυλισμός των Y και W χρωμοσωμάτων

Ο εκφυλισμός των Y και W χρωμοσωμάτων χαρακτηρίζεται από δύο φαινόμενα. Πρώτον τη μετατροπή τους από ευχρωματινικά σε ετεροχρωματινικά και δεύτερον τη σταδιακή απώλεια δραστηριότητας των γονιδίων τους (Steinemann & Steinemann, 2004). Το τελευταίο, μεταξύ άλλων, μπορεί να οφείλεται τόσο στη συσσώρευση μη

κωδικών αλληλουχιών όσο και στη συσσώρευση μεταθετών στοιχείων (Kaiser & Bachtrog, 2010). Στις περιπτώσεις όπου τα συστήματα των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι πολύ παλιά τότε είναι πολύ δύσκολο να συμπεράνουμε τα αίτια του εκφυλισμού του καθώς έχουν μείνει ελάχιστα σημάδια της διαδικασίας. Υπάρχουν όμως οι περιπτώσεις φυλετικών χρωμοσωμάτων, όπως για παράδειγμα το νέο-Y της *Drosophila miranda*, τα οποία είναι νεότερα και είναι ακόμη στη φάση της διαφοροποίησης, κάτι το οποίο μας δίνει τη δυνατότητα μελέτης των μηχανισμών εκφυλισμού (Kaiser & Bachtrog, 2010).

1.3.1. Μοριακοί μηχανισμοί εκφυλισμού

Ο εκφυλισμός του νέο-Y (ή νέο-W) φαίνεται να υπόκειται σε δύο τύπους μοριακών αλλαγών. Ο ένας είναι ο εκφυλισμός των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα, στη *D. miranda*, περίπου τα μισά από τα γονίδια έχουν καταστεί ανενεργά είτε από μεταλλάξεις που μεταβάλλουν το πλαίσιο ανάγνωσης είτε από μεταλλάξεις που οδηγούν σε κωδικόνια λήξης (Bachtrog et al., 2008). Τα περισσότερα εναπομείναντα γονίδια δείχνουν επίσης διάφορα άλλα σημάδια εκφυλισμού. Τέτοια σημεία είναι ο αυξημένος ρυθμός υποκατάστασης αμινοξέων (Bachtrog, 2003) και οι λιγότερο συντηρημένες ρυθμιστικές περιοχές τους (Bachtrog, 2005).

Ο άλλος τύπος μεταλλαγών είναι οι μεγάλης κλίμακας δομικές αλλαγές είτε από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες είτε από μεταθετά στοιχεία. Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να επηρεάσουν άμεσα τη λειτουργία των γονιδίων με την εισαγωγή τους στα ίδια τα γονίδια είτε στα ρυθμιστικά στοιχεία τους. Εναλλακτικά, τα μεταθετά στοιχεία θα μπορούσαν να προκαλέσουν μεταβολές μεγάλης κλίμακας στη δομή της χρωματίνης με την ενεργοποίηση χρωμοσωμικών περιοχών, ώστε αυτές να γίνουν ετεροχρωματινικές με αποτέλεσμα την ταυτόχρονη σίγηση ενός μεγάλου αριθμού γονιδίων (Dorer & Henikoff, 1994), (Gatti & Pimpinelli, 1992), (Lippman et al., 2004). Συγκεκριμένα το νέο-Y της *D. miranda* είναι στην εξελικτική φάση κατά την οποία αλλάζει μορφή η χρωματίνη του με κάποια μεγάλα τμήματά του να είναι ήδη ετεροχρωματινικά. Επιπλέον μεγάλος αριθμός μεταθετών στοιχείων έχει συσσωρευτεί σε αυτό, κάτι το οποίο υποστηρίζει τη σχέση μεταξύ μεταθετών και αλλαγής στη δομή της χρωματίνης (Kaiser & Bachtrog, 2010).

1.3.2. Εξελικτικές διεργασίες που οδηγούν στον εκφυλισμό

Σύμφωνα με τους Hill & Robertson (Hill & Robertson, 1966), η συγκρουόμενη αλληλεπίδραση δύο θέσεων του γονιδιώματος, που υπόκεινται σε επιλογή, μπορεί να οδηγήσει σε ελάττωση της αποτελεσματικότητας της επιλογής, όταν ο ανασυνδυασμός είναι μικρός ή και τελειώς απών. Αυτό δίνει τη δυνατότητα σε αρνητικές μεταλλάξεις να συσσωρευτούν και εν τέλει να οδηγήσουν στον εκφυλισμό του χρωμοσώματος (Bachtrog, 2006), (Charlesworth, 2000).

Ανάλογα με τον τύπο και την δύναμη της επιλογής υπάρχουν διάφορα μοντέλα, όπως αυτό της επιλογής υποβάθρου (background selection), του τροχού αναστολής του Muller (Muller's ratchet) και των επιλεκτικών σαρώσεων (selective sweeps), τα οποία εφαρμόζονται. Το κοινό στοιχείο όλων αυτών των μοντέλων είναι το εξής: λόγω της αλληλοπαρεμβολής της επιλογής της κάθε μετάλλαξης, ο αποτελεσματικός πληθυσμός (N_e) για ένα μη ανασυνδυαζόμενο τμήμα του γονιδιώματος ελαττώνεται, με αποτέλεσμα να ελαττώνεται και η δύναμη της επιλογής. Αυτό οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα προσαρμογής για τμήματα του γονιδιώματος με χαμηλά επίπεδα ανασυνδυασμού. Κατ' αυτόν τον τρόπο οδηγούμαστε στη μειωμένη πιθανότητα οι

χρήσιμες μεταλλάξεις να εδραιωθούν στο γονιδίωμα και στην αυξημένη πιθανότητα να εδραιωθούν αρνητικές μεταλλάξεις (Charlesworth et al., 2009).

Στο μοντέλο της επιλεκτικής σάρωσης μια χρήσιμη μετάλλαξη εδραιώνεται ταχέως συμπαρασύροντας μαζί της και όλες τις μεταλλάξεις που είναι συνδεδεμένες με αυτή. Σε μια τέτοια περίπτωση το όφελος της μετάλλαξης που επιλέχθηκε αντισταθμίζει τις επιπτώσεις των αρνητικών μεταλλάξεων που πήρε μαζί της (Bachtrog & Gordo, 2004), (Rice, 1987).

Στο μοντέλο της επιλογής υποβάθρου, ισχυρά αρνητικές μεταλλάξεις εξαλείφονται από τον πληθυσμό λόγω απουσίας ανασυνδυασμού. Έτσι μόνο τα χρωμοσώματα που δεν φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις θα επιβιώσουν (Charlesworth, 1996). Σαν αποτέλεσμα ελαττώνεται το N_e , και με τον καιρό ελαττώνεται και η αποτελεσματικότητα της φυσικής επιλογής δίνοντας τη δυνατότητα συσσώρευσης αρνητικών μεταλλάξεων στο μη ανασυνδυαζόμενο χρωμόσωμα Y.

Στο μοντέλο του τροχού αναστολής του Muller, η συσσώρευση αρνητικών μεταλλάξεων περιγράφεται ως εξής: στον πληθυσμό έχουμε χρωμοσώματα Y τα οποία έχουν διαφορετικό αριθμό αρνητικών μεταλλάξεων. Το καλύτερο χρωμόσωμα (αυτό με τις λιγότερες μεταλλάξεις) μπορεί να χαθεί κατά τύχη. Χωρίς τη δυνατότητα ανασυνδυασμού αυτή η κλάση χρωμοσωμάτων δεν μπορεί να αποκατασταθεί (ο τροχός έκανε ένα βήμα). Τώρα το επόμενο καλύτερο χρωμόσωμα Y μπορεί να χαθεί τυχαία. Έτσι οδηγούμαστε στη συνεχή συσσώρευση αρνητικών μεταλλάξεων και στη φθορά της γονιδιακής λειτουργίας του Y.

Το γεγονός πως λίγα είναι γνωστά για τις πληθυσμιακές παραμέτρους που καθοδηγούν τον εκφυλισμό του Y (ποσοστά αρνητικών και χρήσιμων μεταλλάξεων και οι σχετικοί τους επιλεκτικοί συντελεστές) δυσκολεύει τη θεωρητική πρόβλεψη μέσω μοντέλων (Eyre-Walker & Keightley, 2007). Επιπλέον η διαδικασία που επηρεάζει τον εκφυλισμό του Y μπορεί να αλλάξει με την πάροδο του χρόνου. Για παράδειγμα, μια αρνητική μετάλλαξη έχει μεγαλύτερη επίπτωση σε ένα χρωμόσωμα Y το οποίο έχει πολλά λειτουργικά γονίδια παρά σε ένα Y το οποίο βρίσκεται στη μέση της διαδικασίας του εκφυλισμού του (Bachtrog, 2008).

Σε αυτή την περίπτωση φαίνεται πως σημαντικό ρόλο παίζουν οι επιλεκτικές σαρώσεις. Μελέτη της ποικιλομορφίας στον πληθυσμό των νέο-Y της *D. miranda* υποστηρίζουν τις επιλεκτικές σαρώσεις ως το επιλεκτικό μοντέλο το οποίο καθοδηγεί τον εκφυλισμό του Y (Bachtrog, 2004).

1.4. Γονιδιακό περιεχόμενο στο Y χρωμόσωμα

Όπως είδαμε και προηγουμένως, τα φυλετικά χρωμοσώματα στα Δίπτερα έχουν σχηματιστεί επανειλημμένως από τα αυτοσώματα, ενώ τα χρωμοσώματα X τείνουν να διατηρούν τα προγονικά γονίδιά τους λόγω, κυρίως, της δυνατότητας ανασυνδυασμού (Mahajan & Bachtrog, 2017).

Τα φυλετικά χρωμοσώματα περιμένουμε να συσσωρεύσουν ένα μη τυχαίο γονιδιακό περιεχόμενο. Επομένως είναι λογικό να σκεφτούμε ότι το χρωμόσωμα Y θα πρέπει να συσσωρεύει γονίδια που είναι ευεργετικά για τα αρσενικά άτομα, δεδομένου ότι δεν είναι ποτέ υπό επιλογή στα θηλυκά. Πράγματι, το χρωμόσωμα Y στη *Drosophila* περιέχει κυρίως γονίδια αρσενικής λειτουργίας (Carvalho et al., 2000), (Hackstein & Hochstenbach, 1995), (Kennison, 1981). Παρά ταύτα όμως, το ακριβές γονιδιακό περιεχόμενο του Y των εντόμων είναι σε μεγάλο βαθμό ακόμη άγνωστο (Mahajan & Bachtrog, 2017). Λόγω τόσο της ετεροχρωματινικής του φύσης, όσο και του εκφυλισμού του, το Y χρωμόσωμα είναι ένα δύσκολο χρωμόσωμα για να ασχοληθεί κάποιος. Πόσο μάλλον να το αλληλουχήσει και να βρει σε αυτό

λειτουργικά γονίδια. Για το λόγο αυτό παρακάτω γίνεται εκτενέστερη αναφορά στο γονιδιακό περιεχόμενο του Y της *Drosophila* το οποίο είναι το καλύτερα μελετημένο, μέχρι στιγμής, από τα έντομα.

1.4.1. Γονίδια

Πολύ λίγα είναι τα γονίδια τα οποία παραμένουν στα αρχαία Y χρωμοσώματα ενώ ο αριθμός των υπονοούμενων γονιδίων στο Y διαφέρει σημαντικά από είδος σε είδος. Τα νέα Y χρωμοσώματα φέρουν ξεκάθαρα στοιχεία της προέλευσής τους από τα αυτοσώματα. Τα αρχαία Y χρωμοσώματα δεν περιέχουν μόνο γονίδια τα οποία ξέφυγαν του εκφυλισμού αλλά αντιθέτως περιλαμβάνουν και γονίδια τα οποία απέκτησαν δευτερογενώς από αυτοσώματα (Mahajan & Bachtrog, 2017). Επιπλέον, φαίνεται πως τα Y συνδεδεμένα γονίδια έχουν εξελίξει συγκλίνουσες λειτουργίες σχετικές με τους όρχεις. Έτσι, οδηγούμαστε στο συμπέρασμα πως, μάλλον, η αρρενό-ειδική επιλογή που εφαρμόζεται στο Y, είναι η κινητήρια δύναμη που διαμορφώνει το γονιδιακό του περιεχόμενο (Mahajan & Bachtrog, 2017).

1.4.1.1. Γονίδια στο Y της *Drosophila*

Πολλά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες στο Y της *Drosophila melanogaster*, φέρουν ιντρόνια, μέσου μεγέθους 1Kb, που αποτελούνται από επαναλήψεις μεταθετών στοιχείων και δορυφορικού DNA. Αυτό καθιστά αδύνατη τη συναρμολόγησή τους χρησιμοποιώντας προσεγγίσεις αλληλούχησης νέας γενιάς (next generation sequencing) (Carvalho, et al., 2001), (Carvalho et al., 2000) με εξαίρεση αυτή της PacBio η οποία αποδείχθηκε χρήσιμη στην συναρμολόγηση Y-γονιδίων και Y γονιδιωματικών περιοχών στη *D. melanogaster*.

Συγκεκριμένα, τα περισσότερα γονίδια που συνδέονται με το Y στη *Drosophila* δεν είναι απλώς υπολείμματα των γονιδίων που υπήρχαν στο αυτόσωμα από το οποίο προήλθε το Y. Αντίθετα, όλα φαίνεται να έχουν αποκτηθεί σε επόμενη φάση από το Y, αφού είχε εξελιχθεί η αρρενό-ειδική επιλογή του (Carvalho et al., 2001), (Carvalho et al., 2000), (Koerich et al., 2008). Όλα τα γονίδια του Y της *Drosophila melanogaster* έχουν αρρενό-ειδικές λειτουργίες και η έκφρασή τους έχει περιοριστεί στους όρχεις. Αυτό υποδηλώνει ότι τα γονίδια αυτά που αποκτήθηκαν από αυτοσώματα διατηρήθηκαν στο Y λόγω των ευεργετικών για τα αρσενικά ιδιοτήτων τους (Carvalho et al., 2001), (Carvalho et al., 2000), (Koerich et al., 2008).

Το γονίδιο *Coiled-CoilsY (CCY)* είναι ένα λειτουργικό γονίδιο στο Y αλλά δεν έχει μελετηθεί πλήρως ακόμη. Το μόνο στοιχείο που είναι διαθέσιμο είναι το προφίλ έκφρασής στο οποίο φαίνεται ότι η κύρια έκφραση γίνεται στους όρχεις των αρσενικών ενώ δεν εμφανίζει έκφραση στα θηλυκά άτομα (Carvalho et al., 2001), (“FlyBase CCY,” 2017). Το συγκεκριμένο γονίδιο υπάρχει τόσο στο Y της *Drosophila*, το οποίο προέρχεται από το στοιχείο A του Muller, όσο και στο Y της *T. Dalmanni*, το οποίο προέρχεται από το στοιχείο B του Muller. Συμπεραίνουμε έτσι ότι το *CCY* σε αυτούς τους δύο οργανισμούς μετατοπίστηκε στο Y, από κάποιο αυτόσωμα, ανεξάρτητα και αφού διαχωρίστηκαν εξελικτικά και επομένως δεν υπήρχε στο αρχαίο Y (Mahajan & Bachtrog, 2017).

Το *polycystine-related-Y (PRY)* είναι ένα ακόμη γονίδιο το οποίο δεν έχει μελετηθεί η ακριβής λειτουργία του. Για το γονίδιο αυτό στη FlyBase δεν υπάρχουν περαιτέρω πληροφορίες πέραν του ότι βρίσκεται στο Y, είναι ενεργό και η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από αυτό διαθέτει τρία μοτίβα/συντηρημένες περιοχές. Τα μοτίβα αυτά είναι τα GPS motif, PLAT/LH2 domain, PKD/REJ-like domain (“FlyBase PRY,” 2017). Σύμφωνα με την InterPro το πρώτο μοτίβο (GPS) σχετίζεται με το

πρωτεολυτικό κέντρο των GPCR (“Interpro GPS motif,” 2017). Το δεύτερο, η συντηρημένη περιοχή PLAT/LH2, βρίσκεται σε πρωτεΐνες που σχετίζονται είτε με τη πλασματική μεμβράνη είτε με λιπίδια και ως πιθανή μοριακή του λειτουργία δίνεται η πρόσδεση πρωτεϊνών (“Interpro PLAT/LH2 domain,” 2017). Για το τρίτο, τη συντηρημένη περιοχή PKD/REJ-like, δεν υπάρχει κάποια γνωστή της λειτουργία (“Interpro PKD/REJ-like,” 2017).

Σε ότι αφορά στο γονίδιο *Occludin-RelatedY (ORY)*, δεν έχει καθοριστεί η λειτουργία του και το μόνο που γνωρίζουμε είναι πως εκφράζεται τόσο στους όρχεις όσο και στους βοηθητικούς αδένες. Επιπλέον έχουν βρεθεί ορθόλογα του γονίδια σε επτά είδη *Drosophila* και σε τρία επιπλέον Δίπτερα (*Musca domestica*, *Glossina morsitans*, *Lucilia cuprina*) (“FlyBase ORY,” 2017).

Ένα ακόμη γονίδιο το οποίο βρίσκεται στο Y αλλά δεν έχει μελετηθεί είναι το *Ppr-Y*. Το γονίδιο αυτό έχει τέσσερις περιοχές με επαναλήψεις πλούσιες σε Λευκίνες (Leu) και εκφράζεται στους όρχεις. Επίσης δεν διαθέτει ορθόλογα γονίδια ανάμεσα στα υπόλοιπα είδη της *Drosophila* αλλά διαθέτει ορθόλογα γονίδια σε οκτώ άλλα Δίπτερα (“FlyBase Ppr-Y,” 2017).

Παρόμοιες περιπτώσεις είναι και γονίδια *ARY*, *WDY*, *Pp1-Y1/Y2* και *FDY* που έχουν βρεθεί στο Y της *Drosophila*. Αυτά έχουν γενικά άγνωστες ή μη αποδεδειγμένες λειτουργίες, όμως, τα περισσότερα εμφανίζουν αποκλειστική έκφραση στους όρχεις των ενήλικων αρσενικών ατόμων (“FlyBase,” 2017).

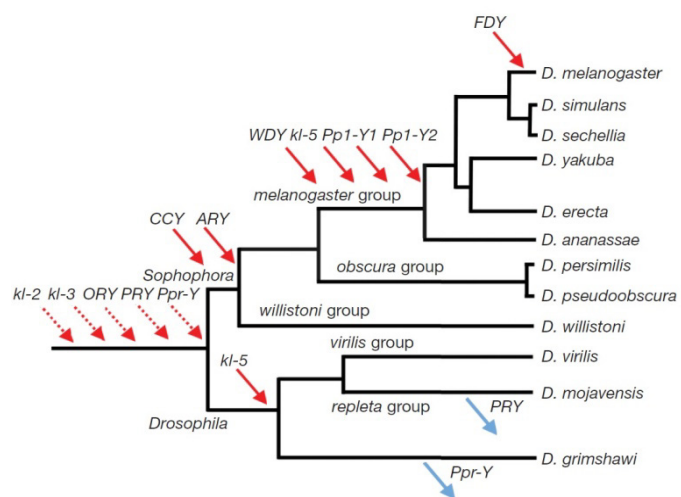
Στις περιπτώσεις των *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2* και *PPr-Y*, τα πειράματα χαρτογράφησης αποκάλυψαν ότι δεν αντιστοιχούν σε κανένα παράγοντα γονιμότητας. Γνωρίζουμε όμως τη βασική τους λειτουργία: τα *Pp1-Y1* και *Pp1-Y2* κωδικοποιούν καταλυτικές υπομονάδες πρωτεϊνικών φωσφατάσων σερίνης-θρεονίνης (υποοικογένεια PPP1) και το *PPr-Y* κωδικοποιεί μια ρυθμιστική υπομονάδα. Οι PPP1 φωσφατάσες ελέγχουν ένα πλήθος κυτταρικών διεργασιών, όπως την κίνηση του μαστιγίου, την πρόοδο κυτταρικού κύκλου και το μεταβολισμό γλυκογόνου. Δεδομένης της ασάφειας των στοιχείων ομοιότητας μεταξύ των αλληλουχιών, όλες ανωτέρω λειτουργίες είναι πιθανές για την Y-συνδεδεμένη PPP1. Το πιο πιθανό, όμως, σενάριο είναι ότι εμπλέκονται στον έλεγχο του μαστιγίου, διότι τα *Pp1-Y1* και *Pp1-Y2* είναι όμοια με την PPP1 του *Chlamydomonas* που εκτελεί αυτή τη λειτουργία (Yang et al., 2000) και το *PPr-Y* είναι παρόμοιο με μια ελαφριά αλυσίδα δυνεΐνης η οποία είναι συστατικό του μαστιγίου του *Chlamydomonas* (Sharon et al., 1999), (Carvalho et al., 2001).

Στην περίπτωση του *FDY* ο Carvalho και οι συνεργάτες του (2015) έδειξαν ότι είναι ένα λειτουργικό γονίδιο που αποκτήθηκε από το χρωμόσωμα Y της *D. melanogaster* μετά το διαχωρισμό της από την *D. simulans*, λιγότερο από 4 εκατομμύρια χρόνια πριν. Λόγω της νεαρής του ηλικίας, ήταν δυνατό να προσδιοριστεί με ακρίβεια ο μηχανισμός της προέλευσής του: ένας διπλασιασμός 11 kb του χρωμοσώματος 3R, που περιλαμβάνει το γονίδιο *vig2* (γονικό γονίδιο του *FDY*) και τέσσερα άλλα γειτονικά γονίδια. Αυτά τα τέσσερα γονίδια μετετράπησαν σε ψευδογονίδια, είτε λόγω της συσσώρευσης προσθηκών ή ελλείψεων που μετατόπισαν το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο, είτε λόγω της προσθήκης μεταθετών στοιχείων που διασπών τις κωδικοποιητικές τους περιοχές. Από την άλλη πλευρά, η περιοχή που κωδικοποιεί το *FDY* παρέμεινε άθικτη, και το mRNA που παράγει αντιστοιχεί στο 21% του mRNA τύπου *vig2* που υπάρχει στους όρχεις. Εν ολίγοις, το μόνο γονίδιο από την διπλασιασμένη περιοχή που παρέμεινε λειτουργικό είναι το *FDY*. Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι σε λίγα εκατομμύρια χρόνια τα ψευδογονίδια θα μεταλλαχθούν τόσο που δεν θα είναι αναγνωρίσιμα και επομένως, το μόνο σημάδι

της αυτοσωμικής προέλευσης του *FDY* θα είναι η πρωτεϊνική ομοιότητα με το αυτοσωμικό γονίδιο *vig2*.

Το *Mst77F* (*Male-specific transcript 77F*) είναι ένα αυτοσωμικό γονίδιο που βρίσκεται στο 3L χρωμόσωμα (Russell & Kaiser, 1993). Είναι απαραίτητο για την γονιμότητα των αρσενικών και κωδικοποιεί για μια πρωτεΐνη που αντικαθιστά τις ιστόνες κατά τη διαδικασία της συμπύκνωσης της χρωματίνης στη σπερματογένεση (Raja & Renkawitz-pohl, 2005). Το 1993 οι Russell και Kaiser βρήκαν στο Y χρωμόσωμα τρεις αλληλουχίες σχετικές με το *Mst77F*. Δύο από αυτές ήταν καθαρά ψευδογονίδια ενώ η τρίτη ήταν ημιτελής ως αλληλουχία και έτσι δεν μπόρεσαν να καθορίσουν αν ήταν λειτουργική ή όχι. Τα Y αντίγραφα του *Mst77F* χαρτογραφούνταν σε περιοχές που δεν αντιστοιχούσαν σε κάποιο από τα γονίδια γονιμότητας (βλέπε παραδείγματα των *CCY* και *ORY* παρακάτω) (Kennison, 1981). Για το λόγο αυτό τα γονίδια αυτά στο Y χαρακτηρίστηκαν μη λειτουργικά με τους Russell και Kaiser (1993) να υποσημειώνουν την πιθανότητα η δράση τους στη γονιμότητα να αποδίδεται σε πλήρη ή μερική συμπλήρωση από τα αυτοσωμικά τους αντίγραφα. Εν τέλει η Krsticevic και οι συνεργάτες της (Krsticevic et al., 2010) έδειξαν ότι στο Y υπάρχουν οκτώ αντίγραφα του *Mst77F* τα οποία είναι ικανά να κωδικοποιήσουν πρωτεΐνη όμοια κατά 88% με αυτή του αυτοσωμικού *Mst77F*. Ενώ τέσσερα από αυτά είναι ενεργά μεταγραφικά και υπεύθυνα για το 1/5 των συνολικών mRNA του *Mst77F* (Russell & Kaiser, 1993).

Μία τελευταία κατηγορία γονιδίων στο Y της *Drosophila* είναι τα γονίδια γονιμότητας του σπέρματος *ks-1*, *ks-2*, *kl-1*, *kl-2*, *kl-3* και *kl-5*. Το 1916 ο Bridges (Bridges, 1916) έδειξε ότι αρσενικά άτομα *Drosophila* που τους έλειπε το Y αλλά έφεραν ένα X είχαν μεν αρσενικά χαρακτηριστικά αλλά ήταν στείρα. Αυτό αμέσως υπέδειξε ότι η γονιμότητα των αρσενικών προέρχεται από το Y χρωμόσωμα. Αργότερα αποδείχθηκε ότι υπάρχουν έξι γονίδια στο Y χρωμόσωμα που σχετίζονται με τη γονιμότητα. Τα γονίδια αυτά κατανέμονται τόσο στο μικρό (YS) όσο και στο μεγάλο (YL) βραχίονα του Y χρωμοσώματος. Στον μικρό βραχίονα βρίσκονται τα *ks-1* και *ks-2* και στον μεγάλο τα *kl-1*, *kl-2*, *kl-3* και *kl-5*. Πιο συγκεκριμένα τα *kl-2*, *kl-3* και *kl-5* είναι απαραίτητα για την παραγωγή πρωτεϊνών μεγάλου μοριακού βάρους πιθανότατα βαριές αλυσίδες δυνεΐνης οι οποίες είναι απαραίτητες για την κινητικότητα του σπέρματος (Brian Charlesworth, 2001). Οι βαριές αυτές αλυσίδες δυνεΐνης είναι μέρη του «κινητήρα» μικροσωληνίσκων ο οποίος είναι σημαντικός για την σπερματογένεση καθώς απουσία των *kl-2/3/5* οι ουρές των σπερματοζωαρίων δεν είναι λειτουργικές (“FlyBase *kl-3*,” 2017). Τα τρία από τα *kl* γονίδια που έχουν μελετηθεί δεν έχουν ομόλογό στο X χρωμόσωμα, μοιράζονται όμως μια ομολογία με γονίδια σε αυτοσωμικά χρωμοσώματα (Carvalho et al., 2000). Επομένως είναι πιθανό, κάποτε στο παρελθόν, αυτά να



Εικόνα 6. Φυλογενετικό δέντρο του γένους των *Drosophila*. Με κόκκινα βέλη φαίνονται οι μεταφορές γονιδίων στο Y. Με γαλάζια βέλη φαίνονται οι απομακρύνσεις γονιδίων από το Y.

μετατοπίστηκαν στο Y από κάποια αυτοσώματα και να διατηρήθηκαν εκεί καθώς έδιναν πλεονέκτημα στα αρσενικά που τα έφεραν (Carvalho et al., 2000), (Fisher, 1931). Τέλος, ο Carvalho και οι συνεργάτες του (2001) έδειξαν ότι τα γονίδια *CCY* και *ORY* χαρτογραφούνται στις περιοχές *ks-1* και *ks-2* και επομένως θα μπορούσαν να αντιστοιχούν σε αυτούς τους παράγοντες γονιμότητας.

1.4.1.2. Γονίδια στο Y των *Anopheles*

Ο Hall και οι συνεργάτες του το 2013 (Hall et al., 2013) ταυτοποίησαν στο Y χρωμόσωμα των κουνουπιών *Anopheles stephensi* και *Anopheles gambiae* έξι νέα γονίδια, τρία από το κάθε είδος. Τα γονίδια αυτά τα ονόμασαν *sYG1/ 2/ 3* (*An. stephensi* Y gene 1/ 2/ 3) και *gYG 1/ 2/ 3* (*An. gambiae* Y gene 1/ 2/ 3). Τα έξι αυτά γονίδια ενισχύθηκαν με PCR μόνο στο γονιδιωματικό DNA των αρσενικών (άρα είναι όντως στο Y) και επιπλέον είναι όλα μεταγραφικά ενεργά. Αν και οι λειτουργίες των Y γονιδίων δεν είναι ακόμα σαφείς, ο Hall και οι συνεργάτες του (2013) κάνουν κάποιους εντυπωσιακούς υπαινιγμούς για τις πιθανές λειτουργίες τους. Το *sYG1* είναι ομόλογο με έναν μεταγραφικό παράγοντα που φέρει HMG-box και ο οποίος εμπλέκεται σε μια σειρά αναπτυξιακών λειτουργιών. Οι μεταγραφικοί παράγοντες με HMG-box περιλαμβάνουν τα δύο βασικά γονίδια που εμπλέκονται στον προσδιορισμό του αρσενικού φύλου στα θηλαστικά (Kozhukhar, 2012). Το *sYG3* μοιράζεται ομολογία με πρωτεΐνη που διαθέτει μια επαναλαμβανόμενη περιοχή του παράγοντα μεταγραφής II, δίνοντας την πιθανότητα να είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας που συνδέεται με το Y. Πέντε από τα Y γονίδια εκφράζονται ξεκάθαρα μόνο στους όρχεις υποδηλώνοντας ότι μάλλον εκτελούν συγκεκριμένους ρόλους στα αρσενικά. Τέλος, και τα έξι Y γονίδια εκφράζονται στο πρώιμο έμβρυο, που είναι το χρονικό σημείο που αρχίζει η σεξουαλική διαφοροποίηση (Salz & Erickson, 2010).

Σε επόμενη εργασία ο Hall και οι συνεργάτες του (2016) βρήκαν ότι το γονίδιο *YG2* θεωρητικά κωδικοποιεί για ένα σύντομο πεπτίδιο 56-aa του οποίου ο πιθανός ρόλος στον προσδιορισμό του αρσενικού φύλου βρίσκεται υπό διερεύνηση. Στο ασιατικό κουνούπι της ελονοσίας *An. stephensi*, ένα Y συνδεδεμένο γονίδιο (*Guy1*) που εμπλέκεται στον προσδιορισμό αρσενικού φύλου κωδικοποιεί επίσης μια αλληλουχία 56-aa της οποίας η προβλεπόμενη δευτερογενής δομή ομοιάζει με εκείνη του υποτιθέμενου πεπτιδίου του *YG2* (Criscione et al., 2013), παρά το γεγονός ότι δεν ανιχνεύεται κάποια ομολογία στην νουκλεοτιδική αλληλουχία (Hall et al., 2013) και στην εξελικτική πορεία τα δύο αυτά είδη διαχωρίζονται περίπου 30 εκατομμύρια χρόνια πριν (Kamali et al., 2014). Επιπρόσθετα, το γεγονός ότι η έκφραση του *YG2* ανιχνεύεται στα πρώιμα εμβρυϊκά στάδια πριν από οποιοδήποτε άλλο Y-συνδεδεμένο γονίδιο στο *An. gambiae*, σε συνδυασμό με τη μοναδικά διατηρημένη θέση του στο Y χρωμόσωμα σε όλα τα κοντινά είδη του *An. gambiae* υποδηλώνει έναν πρωταρχικό ρόλο στον προσδιορισμό των αρσενικών σε αυτά τα είδη (Hall et al., 2016).

Συνοψίζοντας σε δύο γραμμές όλα τα παραπάνω βλέπουμε πως στο Y χρωμόσωμα των εντόμων διαθέτει ελάχιστα γονίδια τα οποία ως επί το πλείστον έχουν προέλθει από διπλασιασμούς αυτοσωμικών περιοχών. Τα περισσότερα από αυτά τα γονίδια έχουν σχέση με τη γονιμότητα των αρσενικών ατόμων, του κάθε είδους, ενώ κάποια άλλα φαίνεται να παίζουν άλλους σημαντικούς ρόλους στη σπερματογένεση.

1.1.1. DNA μεταθετά στοιχεία

Τα DNA μεταθετά στοιχεία διαθέτουν μικρές αναστροφές επαναλήψεις (Inverted repeats, IRs) στα άκρα τους (μήκους 10–200 bp), εκατέρωθεν του γονιδίου της τρανσποζάσης που κωδικοποιούν, ενώ χαρακτηριστικές είναι οι ομόρροπες

επαναλήψεις που χαρακτηρίζουν τις θέσεις ένθεσής τους (insertion sequences, IS) (Finnegan, 1992).

Τα Υ χρωμοσώματα θεωρούνται ως ένας «κουβάς» επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών. Τέτοιες αλληλουχίες είναι τα μεταθετά στοιχεία τα οποία είναι γνωστό ότι αποτελούν σημαντικό ποσοστό των γονιδιωμάτων όλων των οργανισμών και παίζουν σημαντικό ρόλο στην εξέλιξή τους (Biémont & Vieira, 2005). Περίπου το 77% της ετεροχρωματίνης στη *D. melanogaster* καταλαμβάνεται από, κατακερματισμένα ή μη, μεταθετά στοιχεία αλλά και από επαναλαμβανόμενο DNA (Smith et al., 2010). Παρά το χαμηλό αριθμό των αντιγράφων τους είναι υπεύθυνα για περισσότερο από το 50% των φυσικώς-αποκτηθέντων μεταλλάξεων με σημαντικά μορφολογικά αποτελέσματα (Eickbush & Furano, 2002).

Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να επηρεάσουν άμεσα την γονιδιακή έκφραση είτε εισάγοντας γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, είτε τα ρυθμιστικά στοιχεία αυτών των γονιδίων σε νέες χρωμοσωμικές περιοχές και κοντά σε νέα γονίδια. Από την άλλη, τα μεταθετά στοιχεία είναι ικανά να προκαλέσουν δομικές μεταβολές μεγάλης κλίμακας στη χρωματίνη. Πιο συγκεκριμένα είναι ικανά να προκαλέσουν σταδιακή ετεροχρωματινοποίηση χρωμοσωμικών περιοχών κάτι το οποίο μπορεί να οδηγήσει σε ταυτόχρονη σίγηση μεγάλου αριθμού γονιδίων σε εκείνη την περιοχή (Gatti & Pimpinelli, 1992), (Steinmann & Steinmann, 2005) .

Κατά την πορεία της εξέλιξης του Υ χρωμοσώματος μεγάλης κλίμακας δομικές αλλαγές αποδίδονται στην συσσώρευση τόσο επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA όσο και μεταθετών στοιχείων. Το Υ χρωμόσωμα της *D. melanogaster* αποτελείται, σε μεγάλο ποσοστό από μεταθετά στοιχεία (Pimpinelli et al., 1995). Συσσώρευση μεταθετών στοιχείων βρέθηκε και στο νέο-Υ χρωμόσωμα της *D. miranda* (Steinmann & Steinmann, 1992, 1997) ενώ μόλις το 2015 χαρακτηρίστηκε το πρώτο μεταθετό στοιχείο στο Υ του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae* (Tsoumani et al., 2015). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι το στοιχείο *matanga* της *D. melanogaster*, ένα μεταθετό στοιχείο που βρίσκεται σε συστάδες και εκφράζεται ενεργά στο χρωμόσωμα Υ και έχει χαρακτηριστεί και στο κουνούπι της ελονοσίας *Anopheles gambiae* (Rohr et al., 2002). Παρόμοια μεταθετά στοιχεία με το *matanga*, σε αδερφικά είδη του *An. gambiae* (*A. arabiensis*, *A. quadriannulatus*, *A. melas*, και *A. merus*), βρίσκονται σε άλλα χρωμοσώματα εκτός του Υ. Αυτό υποδηλώνει ότι το Υ του *An. gambiae* αποικίστηκε πρόσφατα αυτό το συγκεκριμένο μεταθετό. Η ύπαρξη ενεργών μεταθετών στοιχείων στο Υ υποδεικνύει ότι το Υ δεν είναι μόνο «κουβάς» αλλά είναι και «πηγή» τέτοιων μεταθετών στοιχείων (Rohr et al., 2002). Περαιτέρω μοριακή ανάλυση των αλληλουχιών του Υ χρωμοσώματος αυτού του είδους έδωσε νέα δεδομένα τα οποία υποστηρίζουν τον εμπλουτισμό αυτής της περιοχής με μεταθετά στοιχεία (Krzywinski et al., 2005).

2. Το μονοπάτι του φυλοκαθορισμού στα είδη του γένους *Bactrocera*

Το μονοπάτι του φυλοκαθορισμού είναι πολύ καλά μελετημένο στη *Drosophila*. Συγκεκριμένα, η πορεία που ακολουθεί καταλήγει στο διαφορετικό μάτισμα του mRNA του γονιδίου *doublesex* (*dsx*) δίνοντας, ανάλογα, είτε την αρρενοειδική είτε την θηλυκοειδική ισομορφή της πρωτεΐνης. Το θηλυκοειδικό μάτισμα των μεταγράφων του *dsx* γίνεται από της πρωτεΐνες των γονιδίων *transformer* (*tra*) και *transformer-2* (*tra-2*). Οι πρωτεΐνες αυτές προσδέονται σε μια συγκεκριμένη περιοχή του *dsx* μεταγράφου που φέρει επαναλήψεις που ονομάζονται *dsx repeat elements* (*dsxRE*). Χωρίς όμως τα προϊόντα των *tra* και *tra-2*, το μετάγραφο του *dsx* ματίζεται αρρενοειδικά (Tian & Maniatis, 1993).

Το συντηρημένο του μονοπατιού φυλοκαθορισμού στα τελευταία του στάδια, δηλαδή στα γονίδια *tra/tra-2* και *dsx*, υπονοήθηκε πρώτη φορά μετά από μελέτη των Shearman & Frommer (1998) στο είδος *Bactrocera tryoni*. Στη συνέχεια, η ανακάλυψη ομολόγων του *tra* και σε άλλα είδη Δίπτερων όπως η *Ceratitis capitata* (Pane et al., 2002), το *Bactrocera oleae* (Lagos et al., 2007) και είδη του γένους *Anastrepha* (Ruiz et al., 2007), ενίσχυσαν την άποψη αυτή.

2.1. Το μονοπάτι *tra/tra2-dsx*

Στα Δίπτερα τα πρώιμα μετάγραφα (pre-mRNA) του *tra* περιλαμβάνουν περιοχές που προσδένονται οι πρωτεΐνες TRA/TRA-2 και είναι όμοιες με αυτές που περιλαμβάνουν τα μετάγραφα του *dsx*. Η διαφορά σε αυτές τις θέσεις πρόσδεσης μεταξύ των μεταγράφων του *dsx* και του *tra* είναι ότι τα τελευταία τις έχουν στα αρρενοειδικά εξόνια (Pane et al., 2002).

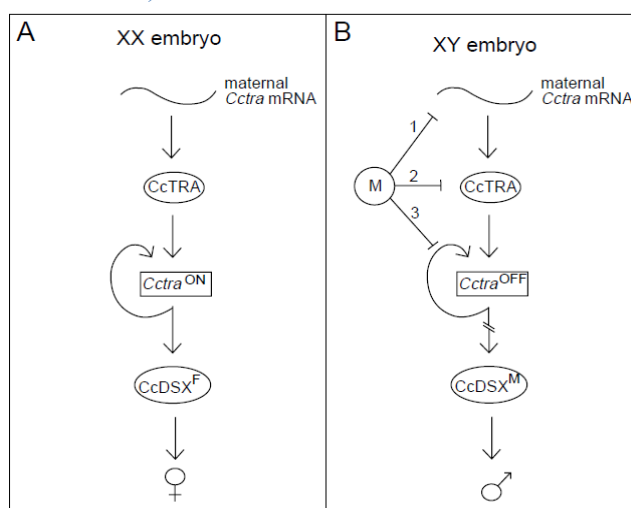
Σε αντίθεση με το *dsx*, η πρόσδεση των TRA και TRA-2 στο *tra* pre-mRNA μπλοκάρει τις κύριες θέσεις ματίσματος και οδηγεί το μάτισμα σε δευτερεύουσες θηλυκοειδικές θέσεις ματίσματος. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να προκύπτει ένα θηλυκοειδικό *tra* mRNA (Pane et al., 2002). Το προϊόν του θηλυκοειδικού *tra* mRNA είναι μεγαλύτερο, από του αρρενοειδικού mRNA, επιτρέποντας μια αυτορυθμιζόμενη παραγωγή θηλυκοειδικού *tra* mRNA και κατ' επέκταση την εγκαθίδρυση της θηλυκής πρωτεΐνης TRA^F στα κύτταρα. Αντίθετα, το αρρενοειδικό *tra* mRNA έχει πρώιμα κωδικόνια λήξης και οδηγεί στην παραγωγή μη λειτουργικής TRA (Morrow et al., 2014).

Στην οικογένεια των *Tephritidae* η TRA-2, παρά το γεγονός ότι εκφράζεται τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά έμβρυα, είναι απαραίτητη ως μέρος του συμπλόκου του ματισματοσώματος (spliceosome), μαζί με την TRA, για το ορθό μάτισμα των *tra* και *dsx*. Σε έμβρυα της *C. capitata* στα οποία έγινε σίγηση των *tra* ή *tra-2* ο μηχανισμός που οδηγεί στην παραγωγή θηλυκοειδικών ματισμένων *tra* και *dsx* διεκόπη. Σαν αποτέλεσμα προέκυψαν τα αρρενοειδικώς ματισμένα *dsx* και η αρρενοειδική πρωτεΐνη DSX^M (Pane et al., 2002).

Στην Εικόνα 7 παρουσιάζεται συνοπτικά το μονοπάτι του φυλοκαθορισμού της *C. capitata* το οποίο φαίνεται να ισχύει και στα υπόλοιπα *Tephritidae*.

Στα XX έμβρυα τα μητρικά παρεχόμενα *tra* mRNA παράγουν τις πρώτες πλήρως λειτουργικές πρωτεΐνες TRA. Αυτές οι πρωτεΐνες προσδένονται στα ζυγωτικά παραγόμενα *tra* mRNAs και οδηγούν στο θηλυκοειδικό τους μάτισμα. Συγκεκριμένα προσδένονται στις θέσεις πρόσδεσης των TRA/TRA-2 στα αρρενοειδικά εξόνια των *tra* mRNA. Οι νέες TRA πρωτεΐνες

που προκύπτουν οδηγούν με τη σειρά τους στην εγκαθίδρυση ενός μηχανισμού ανατροφοδότησης με λειτουργικές TRA πρωτεΐνες που λειτουργεί ως μηχανισμός μνήμης του κυττάρου για την θηλυκοειδική πορεία που πρέπει να ακολουθήσει.



Εικόνα 7. Το μονοπάτι φυλοκαθορισμού στην *C. capitata*. A: σε XX έμβρυα. B: σε XY έμβρυα. (Cc=*C. capitata*)

Τέλος η ύπαρξη των θηλυκοειδικών TRA πρωτεϊνών οδηγεί στην παραγωγή της θηλυκοειδικής πρωτεΐνης DSX^F που εν μέρει οδηγεί στην θηλυκοειδική ανάπτυξη του ατόμου (Pane et al., 2002).

Στα XY έμβρυα η δράση των μητρικώς παρεχόμενων *tra* mRNA διακόπτεται από τον παράγοντα αρρενοποίησης *M* (male determining *M* factor). Ο παράγοντας *M* φαίνεται να μπορεί να επέμβει και να διακόψει την εγκαθίδρυση του μηχανισμού ανατροφοδότησης με λειτουργικές TRA πρωτεΐνες με τέσσερις τρόπους. Πρώτον, με την παρεμπόδιση της μεταγραφής των *tra* mRNA, δεύτερον, με την καταστολή της λειτουργίας της πρωτεΐνης που προκύπτει, τρίτον, με κάποια αλληλεπίδρασή του με το ματισματόσωμα, και τέταρτον, με την καταστολή της μεταγραφής του ζυγωτικού *tra*. Σε κάθε περίπτωση εμποδίζεται η παραγωγή μιας πλήρως λειτουργικής πρωτεΐνης TRA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την απουσία του μηχανισμού ανατροφοδότησης. Απουσία της λειτουργικής TRA το *dsx* ματίζεται αρρενοειδικά και παράγεται η αρρενοειδική πρωτεΐνη DSX^M που οδηγεί το άτομο προς αρρενοειδική ανάπτυξη (Pane et al., 2002).

2.2. Έκφραση γονιδίων σχετικών με τον φυλοκαθορισμό

Ο Morrow και οι συνεργάτες του (Morrow et al., 2014) περιέγραψαν το προφίλ έκφρασης των γονιδίων *tra* και *dsx* στα πρώιμα στάδια αρσενικών και θηλυκών εμβρύων του είδους *Bactrocera jarvisi*, μετρώντας την πληθώρα των μεταγράφων *tra*^F (θηλυκοειδικώς ματισμένο *tra*), *dsx*^F (θηλυκοειδικώς ματισμένο *dsx*) και *dsx*^M (αρρενοειδικώς ματισμένο *dsx*).

Τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά έμβρυα υπήρχε μια σταθερή συγκέντρωση του *tra*^F μέχρι και την 5^η ώρα μετά την ωοαπόθεση. Σε εκείνο το σημείο, στα μεν θηλυκά παρατηρήθηκε μία αύξηση της συγκέντρωσης των *tra*^F μεταγράφων, στα δε αρσενικά μείωση της συγκέντρωσής των *tra*^F. Επτά ώρες μετά την ωοαπόθεση η διαφορά ανάμεσα στις συγκεντρώσεις του *tra*^F σε θηλυκά και αρσενικά έγινε στατιστικά σημαντική και εν τέλει στις 9 ώρες τα μετάγραφα του *tra*^F εξαφανίστηκαν. Από τα παραπάνω μπορούμε να εξάγουμε δύο συμπεράσματα. Πρώτον την ύπαρξη μητρικώς παρεχόμενων και θηλυκοειδικώς ματιζόμενων μεταγράφων *tra* στα έμβρυα και δεύτερον την έναρξη της έκφρασης του ζυγωτικού *tra* λίγο πριν την 5^η ώρα μετά την ωοαπόθεση. Επιπλέον παρατηρήθηκε η παρουσία αρρενοειδικών μεταγράφων του *tra* (*tra*^M) τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά έμβρυα (Morrow et al., 2014). Αυτό συνάδει με τα αποτελέσματα από την *C. capitata* τα οποία έδειξαν πως, κατά τη διαδικασία του ματίσματος των pre-mRNA του *tra* προς το θηλυκοειδικό ώριμο μετάγραφο, προκύπτουν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί ώριμων μεταγράφων μεταξύ των οποίων βρίσκεται και το αρρενοειδικό μετάγραφο *tra*^M (Gabrieli et al., 2010).

Τα επίπεδα των *dsx*^F μεταγράφων παρέμεναν σχετικά σταθερά στα θηλυκά έμβρυα ακόμη και μετά τις 9 ώρες από την ωοαπόθεση. Αντίθετα, στα αρσενικά έμβρυα από την 5^η περίπου ώρα και έπειτα έδειξαν μια ταχύτατη ελάττωση των *dsx*^F μεταγράφων τα οποία εξαφανίστηκαν την 8^η ώρα περίπου. Τέλος τα μετάγραφα του *dsx*^M εμφανίζονται για πρώτη φορά την 6^η ώρα μόνο στα αρσενικά έμβρυα.

3. Παράγοντες αρρενοποίησης στα έντομα

Τα ζώα έχουν αναπτύξει μια ποικιλία μηχανισμών για τον προσδιορισμό του φύλου. Στα έντομα, κυριαρχεί ένα κοινό μοτίβο στο οποίο απαιτείται ένα αρχικό σήμα προσδιορισμού του φύλου, το οποίο στα πρώιμα έμβρυα ενεργοποιεί έναν σύντομο καταρράκτη φυλοειδικώς ματισμένων γονιδίων. Τα προϊόντα αυτών των

γονιδίων ρυθμίζουν τη διαφοροποίηση ενός ατόμου είτε προς αρσενικό είτε προς θηλυκό, ανάλογα με το σύστημα προσδιορισμού του φύλου (Gempe & Beye, 2011). Απουσία, όμως, του αρχικού σήματος, ένα προεπιλεγμένο μοτίβο ματίσματος οδηγεί στην ανάπτυξη του αντίθετου φύλου. Μόνο το τελευταίο γονίδιο του καταρράκτη, το *dsx*, είναι καλά διατηρημένο. Τα υπόλοιπα γονίδια, στα ανώτερα επίπεδα του καταρράκτη φυλοκαθορισμού σε σχέση με το *dsx*, είναι εξελικτικώς ασταθή, διαφέρουν ανάμεσα στα είδη (Wilkins, 1995) και είναι δύσκολο να προσδιοριστούν με τα εργαλεία της συγκριτικής γονιδιωματικής.

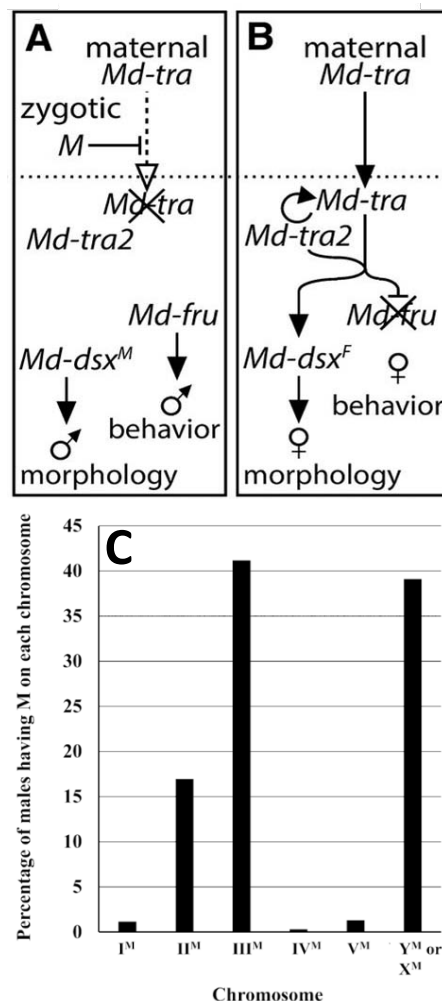
Παρακάτω θα δούμε μερικά παραδείγματα από τους παράγοντες αρρενοποίησης σε τρία διαφορετικά είδη. Τα είδη αυτά είναι η οικιακή μύγα (*Musca domestica*), το κουνούπι της ελονοσίας (*Anopheles gambiae*) και το κουνούπι τίγρης (*Aedes aegypti*).

3.1. Παράγοντας αρρενοποίησης στην οικιακή μύγα (*M. domestica*) *Mdmd* (*Musca domestica* male determiner)

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, πέραν των γονιδίων *tra* και *dsx*, που είναι συντηρημένα, υπάρχει μια πολυμορφικότητα στο μονοπάτι του φυλοκαθορισμού (Bopp et al., 2014). Την πολυμορφικότητα αυτή την αντικατοπτρίζει η *M. domestica* τόσο σε επίπεδο ρύθμισης όσο και σε επίπεδο γονιδίων (Meisel et al., 2015). Τα αρσενικά έχουν την δυνατότητα να φέρουν τον παράγοντα αρρενοποίησης (M factor, παράγοντας M) είτε σε στο X χρωμόσωμα, είτε στο Y, χρωμόσωμα είτε σε κάποιο από τα αυτοσώματα (Kozielska et al., 2008) (Εικόνα 8).

Ο παράγοντας M είναι το αρχικό σήμα στον καταρράκτη φυλοκαθορισμού το οποίο τον καθοδηγεί στην αρρενοειδική ανάπτυξη. Αυτό το επιτυγχάνει ρυθμίζοντας το μάτισμα των μεταγράφων του *tra* (Εικόνα 8). Όταν το *tra* είναι λειτουργικό οδηγεί το μονοπάτι προς ανάπτυξη θηλυκού ατόμου. Όταν είναι μη λειτουργικό οδηγεί το μονοπάτι προς ανάπτυξη αρσενικού ατόμου. Η αρχική ενεργή μορφή του *tra* παραχωρείται από τη μητέρα στο έμβρυο και εγκαθιδρύει τη θετική ανατροφοδότηση του ζυγωτικού *tra*. Αντίθετα ο πατρικώς κληρονομούμενος παράγοντας M αναστέλλει τη θετική ανατροφοδότηση του ζυγωτικού *tra* (Sharma et al., 2017).

Ο Sharma και οι συνεργάτες του (2017) ταυτοποίησαν, ως τον παράγοντα αρρενοποίησης στην οικιακή μύγα, ένα κυρίαρχο γονίδιο και το ονόμασαν *Mdmd* (*Musca domestica* male determiner). Τα μετάγραφα αυτού του γονιδίου εμφανίζονται για πρώτη φορά στις 2 με 3 ώρες μετά την



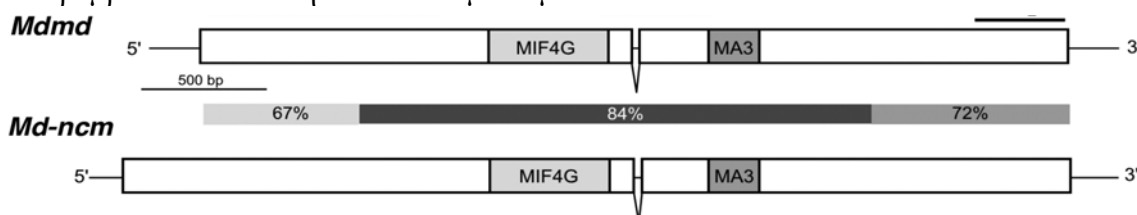
Εικόνα 8. Το Μονοπάτι φυλοκαθορισμού και ο παράγοντας M στην οικιακή μύγα *Musca domestica*. A: μονοπάτι προς ανάπτυξη αρσενικού. B: μονοπάτι προς ανάπτυξη θηλυκού. C: Ποσοστά αρσενικών που φέρουν τον παράγοντα M σε κάθε ένα από τα χρωμοσώματα.

ωοαπόθεση. Ποιο συγκεκριμένα, σε αρσενικά έμβρυα που βρίσκονται στη φάση της μετατροπής του βλαστοδέρματος από ένα συγκήτιο πυρήνων σε ένα σύνολο νέων κυττάρων (κυτταροποίηση). Μετά την έναρξη της μεταγραφής του *Mdmd*, η έκφραση του φαίνεται να διατηρείται σταθερή καθ' όλα τα στάδια της ζωής του εντόμου.

Η πρωτεΐνη που κωδικοποιεί το *Mdmd* έχει μεγάλη ομολογία με την πρωτεΐνη CWC22 ή αλλιώς NCM (Nucampholin) (Εικόνα 9). Η πρωτεΐνη αυτή δημιουργεί σύμπλοκο με τις πρωτεΐνες του ματισματοσώματος και είναι απαραίτητη για το σωστό μάτισμα των πρόδρομων mRNA. Σε αντίθεση με το *Mdmd*, που εκφράζεται μόνο στα αρσενικά άτομα, το *ncm* έχει σταθερή έκφραση τόσο στα θηλυκά όσο και στα αρσενικά άτομα.

Η αποσιώπησή του *Mdmd* σε αρσενικά έμβρυα είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ωθηκών αντί όρχεων. Επιπλέον, η πλήρης απενεργοποίηση του *Mdmd*, μέσω μεταλλάξεων, οδήγησε στη γέννηση θηλυκών ατόμων με γονότυπο XY. Για τους δύο παραπάνω λόγους το *Mdmd* χαρακτηρίζεται ως ο κύριος παράγοντας καθορισμού των αρσενικών χαρακτηριστικών.

Παρά την όλη έρευνα του Sharma και των συνεργατών του (2017) ο ακριβής μηχανισμός με τον οποίο το *Mdmd* ρυθμίζει το μάτισμα των μεταγράφων του *tra* δεν είναι γνωστός. Παρά ταύτα ο Sharma κάνει υποθέσεις για τον τρόπο δράσης. Στην πρώτη υπόθεση το *Mdmd* λειτουργεί ως άμεσος ρυθμιστής του *tra* αποτρέποντας το θηλυκοειδικό μάτισμά του *tra* και οδηγώντας επιλεκτικά προς το αρρενοειδικό μάτισμα. Στη δεύτερη υπόθεση το *Mdmd* λειτουργεί ως έμμεσος ρυθμιστής του *tra* ο οποίος αλληλεπιδρά με το προϊόν του *ncm* (πρωτεΐνη ματισματοσώματος) και παρεμβάλλεται στο θηλυκοειδικό μάτισμα του *tra*.



Εικόνα 9. Τα μετάγραφα των γονιδίων *Mdmd* και *Md-ncm*. Στο ενδιάμεσο φαίνονται τα ποσοστά ομοιότητας μεταξύ τους.

3.2. Παράγοντας αρρενοποίησης στο κουνούπι της ελονοσίας (*Anopheles gambiae*) *Yob*

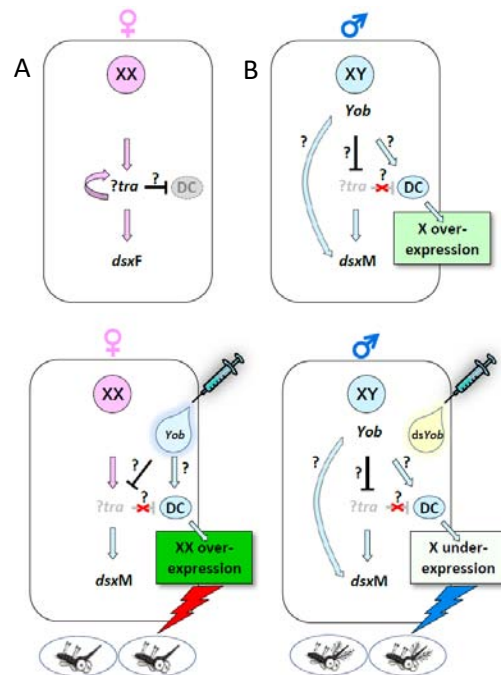
Η Krzywinska και οι συνεργάτες της (2016) περιγράφουν το γονίδιο *Yob* ως τον πιθανό παράγοντα αρρενοποίησης στο κουνούπι τίγρης. Το συγκεκριμένο γονίδιο παράγει ένα ώριμο μετάγραφο μήκους περίπου 600 βάσεων το οποίο κωδικοποιεί για μία πρωτεΐνη μήκους 56 αμινοξέων. Το *Yob* εκφράζεται μόνο στα αρσενικά άτομα. Η έκφρασή του αρχίζει περίπου στις 2 με 2,5 ώρες μετά την ωοαπόθεση και διατηρείται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του εντόμου. Πιο συγκεκριμένα ξεκινά να εκφράζεται πριν τη δημιουργία του βλαστοδέρματος (Juhn & James, 2006) και πριν την έκφραση οποιουδήποτε άλλου γονιδίου από το Y χρωμόσωμα (Hall et al., 2016).

Επιπλέον η ενεργοποίηση του *Yob* προηγείται χρονικά και της εγκαθίδρυσης του φυλοειδικού τρόπου ματίσματος του *dsx*. Η θηλυκοειδική μορφή του *dsx* είναι μητρικώς παρεχόμενη και στα αρσενικά άτομα διατηρείται για τις πρώτες 4 ώρες μετά την ωοαπόθεση. Η αρρενοειδική μορφή του *dsx* εμφανίζεται στα αρσενικά άτομα μόνο μετά τον πλήρη κατακερματισμό των μητρικώς παρεχόμενων μεταγράφων του *dsx*. Πειράματα τόσο *in vitro* σε θηλυκή κυτταρική σειρά κουνουπιού όσο και *in vivo* σε θηλυκές προνύμφες έδειξαν ότι η ύπαρξη των

μεταγράφων του *Yob* επηρεάζει τον τρόπο ματίσματος του *dsx* οδηγώντας το προς αρρενοειδικό μάτισμα.

Στην προσπάθεια να ελέγξουν την δυνατότητα αρρενοποίησης εμβρύων με την εισαγωγή του *Yob* mRNA έκαναν μια σημαντική παρατήρηση. Όλα τα έμβρυα τα οποία προέκυψαν και είχαν εγχυθεί με ικανοποιητική ποσότητα mRNA ήταν αρσενικά με γονότυπο XY και λειτουργικό αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικού. Κατέληξαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι το *Yob* είναι θνησιγόνο για τα θηλυκά. Επιπλέον πειράματα παροδικής σίγησης του *Yob* σε έμβρυα έδειξαν ότι η απουσία του είναι θνησιγόνος για τα αρσενικά καθώς υπήρχε σαφώς χαμηλότερος αριθμός αρσενικών από τα θηλυκά και επιπλέον όλα τα θηλυκά είχαν γονότυπο XX. Το τελευταίο τους οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η απουσία του *Yob* δεν οδηγεί σε θηλυκοποίηση των αρσενικών όπως αναμενόταν.

Δεδομένου ότι η αντιστάθμιση δόσης στο *A. gambiae* γίνεται με υπερενεργοποίηση του X στα αρσενικά άτομα και δεδομένου του θνησιγόνου της παρουσίας του *Yob* στα θηλυκά άτομα και της απουσίας του στα αρσενικά οδηγήθηκαν στη διατύπωση ενός πιθανού μοντέλου θνησιγονίας/ λειτουργίας του *Yob* (Εικόνα 10). Στο συγκεκριμένο μοντέλο το *Yob* είναι αυτό οποίο επάγει και την υπερενεργοποίηση του X στα αρσενικά πέραν της καθοδήγησης του *dsx* προς αρρενοειδικό μάτισμα. Κατ' επέκταση, η χορήγηση *Yob* mRNA στα θηλυκά οδηγεί σε υπερενεργοποίηση και των δύο X με αποτέλεσμα τη δημιουργία μη βιώσιμου περιβάλλοντος στο έμβρυο το οποίο στη συνέχεια πεθαίνει. Αντίθετα η απουσία του *Yob* mRNA από τα αρσενικά άτομα έχει ως αποτέλεσμα το ένα X του αρσενικού να μην μπορεί να παραγάγει την απαραίτητη ποσότητα μεταγράφων των γονιδίων του. Έτσι δημιουργείται και εκεί ένα μη βιώσιμο περιβάλλον και το έμβρυο πεθαίνει.

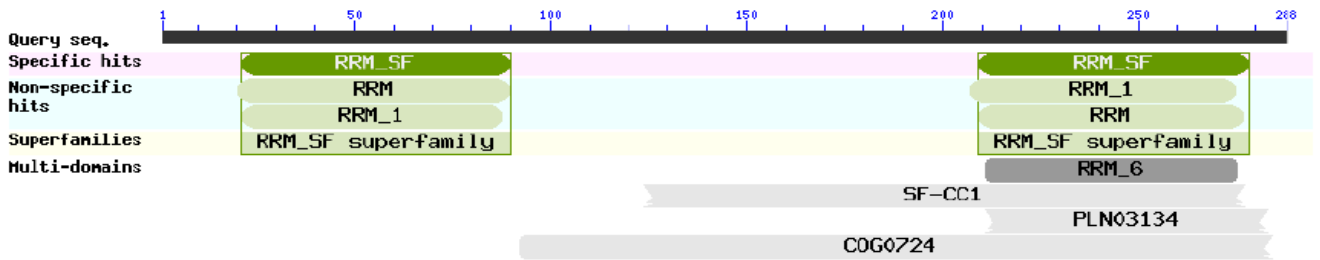


Εικόνα 10. Το μοντέλο λειτουργίας του *Yob*. A, B: μονοπάτι φυλοκαθορισμού σε θηλυκά και αρσενικά αντίστοιχα. Γ: Εκτοπική έκφραση του *Yob* σε θηλυκά. Δ: Αποσιώπηση του *Yob* σε αρσενικά.

3.3. Παράγοντας αρρενοποίησης στο κουνούπι τίγρης (*Aedes aegypti*)

Το φύλο στο κουνούπι *Aedes aegypti* καθορίζεται από ένα κυρίαρχο γονίδιο, τον παράγοντα αρρενοποίησης (M factor). Το γονίδιο αυτό βρίσκεται σε ένα ομομορφικό χρωμόσωμα και συγκεκριμένα σε μία περιοχή του που ομοιάζει στο Y χρωμόσωμα και ονομάζεται περιοχή M (M locus) (Newton et al., 1978).

Αυτά ήταν τα στοιχεία για τον παράγοντα αρρενοποίησης που διαθέταμε μέχρι και σχετικά πρόσφατα. Όμως ο Hall και οι συνεργάτες του (2015) έριξαν φως στην υπόθεση «παράγοντας αρρενοποίησης στο κουνούπι τίγρης». Συγκεκριμένα ταυτοποίησαν τον παράγοντα M ως το γονίδιο *Nix*. Το εν λόγω γονίδιο μεταγράφεται σε ώριμο mRNA μήκους 985 βάσεων από το οποίο κωδικοποιείται μια πρωτεΐνη μήκους 288 αμινοξέων. Η πρωτεΐνη αυτή φέρει δύο πολύ καλά συντηρημένα μοτίβα



Εικόνα 11. Τα δύο μοτίβα αναγνώρισης μονόκλωνου RNA (RNA recognition motif, RRM) κατά μήκος της αμινοξικής αλληλουχίας της πρωτεΐνης NIX.

αναγνώρισης μονόκλωνου RNA (RNA recognition motif, RRM) (Εικόνα 11). Τα μοτίβα αυτά είναι λογικό να υπάρχουν αν σκεφτούμε ότι ο ρόλος του, όπως θα δούμε παρακάτω, είναι η επιρροή του τρόπου ματίσματος του *dsx*.

Το γονίδιο *Nix* δεν ανασυνδυάζεται με αποτέλεσμα να παραμένει διαρκώς στην περιοχή M και επιπλέον αρχίζει να εκφράζεται στις 3 με 4 ώρες μετά την ωοαπόθεση. Σε εκείνη τη χρονική περίοδο το έμβρυο βρίσκεται στο στάδιο του συγκλητιακού βλαστοδέρματος και δεν έχει γίνει ακόμη η εγκαθίδρυση του φύλου στο έμβρυο.

Η απενεργοποίηση του *Nix* με CRSPR/Cas9 οδήγησε σε θηλυκοποίηση των αρσενικών ατόμων τόσο σε φαινοτυπικό όσο και σε γονιδιακό επίπεδο. Ενώ χαρακτηριστικά καθοδήγησε θηλυκοειδικά το μάτισμα του *dsx*. Επιπλέον θηλυκά έμβρυα στα οποία έγινε εκτοπική παραγωγή του *Nix* παρουσίασαν αρρενοειδική ανάπτυξη. Από όλα τα παραπάνω ο Hall και οι συνεργάτες του συμπέραναν ότι το *Nix* είναι απαραίτητο και αρκετό για την αρρενοειδική ανάπτυξη του κουνουπιού τίγρης.

4. Παράγοντας αρρενοποίησης στο δάκο της ελιάς: ένα μυστήριο

Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) είναι ένα έντομο του οποίου το γονιδίωμα για πολλά χρόνια δεν είχε αλληλουχηθεί, παρά την οικονομική του σημασία. Αυτός ήταν και ο κύριος λόγος για τον οποίο ο παράγοντας αρρενοποίησης του δάκου παρέμενε μυστήριο. Ακόμη όμως και μετά την αλληλούχηση του γονιδιώματός του παραμένει καλά κρυμμένος λόγω της εγγενούς δυσκολίας στην αλληλούχηση του Y χρωμοσώματος. Το Y χρωμόσωμά του, όπως και πλήθους άλλων οργανισμών, είναι πλούσιο σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, μεταθετά στοιχεία και φτωχότατο σε γονίδια. Επιπλέον δεν υπάρχουν εργαστηριακά στελέχη του δάκου με ελλείψεις στο Y, τα οποία να δίνουν μόνο θηλυκούς απογόνους, ούτε έχει χαρτογραφηθεί κάποια ανάλογη περιοχή (του) Y χρωμοσώματος. Η ύπαρξη ανάλογων πληροφοριών θα βοηθούσε στη στοχευόμενη αναζήτηση του παράγοντα. Κάτι τέτοιο θα βοηθούσε να γίνει λίγο πιο κατευθυνόμενη η αναζήτηση. Έτσι η ανεύρεση του παράγοντα αρρενοποίησης στο δάκο της ελιάς παραμένει έως σήμερα ένα επιστημονικό πάζλ.

4.1. Ενεργοποίηση του παράγοντα αρρενοποίησης

Ο παράγοντας αρρενοποίησης, στα αρσενικά άτομα πολλών εντόμων, είναι το πρώτο γονίδιο που ενεργοποιείται στο μονοπάτι του φυλοκαθορισμού και το καθοδηγεί προς έναν αρρενοειδικό τρόπο λειτουργίας. Σε γενικές γραμμές ο τρόπος λειτουργίας του παράγοντα αρρενοποίησης είναι παρόμοιος στα διάφορα είδη εντόμων. Επηρεάζει το μάτισμα ενός γονιδίου-κλειδιού το οποίο επηρεάζει το μάτισμα ενός γονιδίου-διακόπτη (Schütt & Nöthiger, 2000). Προκύπτει όμως το εξής ερώτημα: «πως ενεργοποιείται ο παράγοντας αρρενοποίησης;». Δύο είναι τα μοντέλα

που προτείνονται και απαντούν σε αυτή την ερώτηση. Το πρώτο είναι το μοντέλο του λόγου X:A που απαντάται στη *Drosophila*. Το δεύτερο είναι ο αριθμός των αλληλόμορφων του παράγοντα M. Στο δεύτερο μοντέλο έχουμε τις περιπτώσεις ο

Species ^a	Müller's elements							Sex chromosome morphology	Primary signal
	A	B	C	D	E	F	X ^b		
<i>D. melanogaster</i>	X	2L	2R	3L	3R	4		Heteromorphic	X:A
<i>M. domestica</i> ^c	3	1	5	4	2	?	6	Heteromorphic	Dom M
<i>M. domestica</i> ^d	3	1	5	4	2	?	6	Homomorphic	Dom M
<i>L. cuprina</i>	3	2	6	5	4	?	1	Heteromorphic	Dom M
<i>C. capitata</i>	5	3	4	6	2	?	1	Heteromorphic	Dom M
<i>B. tryoni</i>	5	3	4	6	2	?	1	Heteromorphic	Dom M
<i>M. scalaris</i>	?	?	?	?	?	?	Any	Homomorphic ^a	Dom M

^a In all species males are the heterogametic sex.

^b Chromosome representing X chromosome in species other than *D. melanogaster*.

^c Standard strains.

^d Autosomal strains.

Εικόνα 12. Αντιστοίχιση χρωμοσωμάτων των ειδών (1-6) με τα στοιχεία του Muller (A-F, X). Στην τελευταία στήλη του πίνακα φαίνεται πιο είναι το αρχικό σήμα για το μονοπάτι φυλοκαθορισμού σε κάθε ένα από τα είδη της πρώτης στήλης.

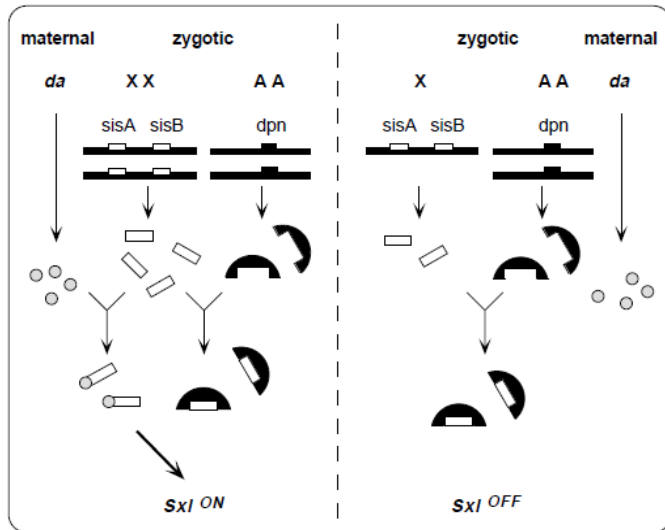
παράγοντας αρρενοποίησης να είναι είτε επικρατής είτε υπολειπόμενος. Όμως στα περισσότερα έντομα είναι επικρατής (Εικόνα 12).

Στη *Drosophila* το αρχικό γενετικό σήμα για το μονοπάτι φυλοκαθορισμού στα σωματικά κύτταρα είναι ο λόγος X:A. Λόγος ίσος με 1.0 (2X:2A) ενεργοποιεί το μονοπάτι φυλοκαθορισμού θηλυκοειδικά. Αντίθετα λόγος ίσος με 0.5 (X:2A) ενεργοποιεί το μονοπάτι φυλοκαθορισμού αρρενοειδικά. Το Y χρωμόσωμα δεν παίζει ρόλο στον καθορισμό του φύλου αλλά στη γονιμότητα των αρσενικών. Ο μοναδικός στόχος των προϊόντων του λόγου X:A είναι το γονίδιο *sexlethal* (*sxl*). Το γονίδιο αυτό είναι ενεργό στα θηλυκά αλλά ανενεργό στα αρσενικά (Bopp et al., 1991). Τα γεγονότα αυτά συμβαίνουν στα πολύ πρώιμα εμβρυϊκά στάδια και συγκεκριμένα ακριβώς πριν τον σχηματισμό του βλαστοδέρματος.

Τα προϊόντα του λόγου X:A, που ξεκινούν το μονοπάτι, είναι γονίδια και διακρίνονται σε τρεις κατηγορίες. Τους αριθμητές (numerators), τους παρονομαστές (denominators) και τα μητρικώς παρεχόμενα στοιχεία (maternal elements). Όλα αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν για μεταγραφικούς παράγοντες. Οι αριθμητές βρίσκονται στο X χρωμόσωμα και επομένως υπάρχουν σε δύο αντίγραφα στα θηλυκά και σε ένα αντίγραφο στα αρσενικά. Ως αριθμητές χαρακτηρίστηκαν εκείνα τα γονίδια τα οποία όταν διπλασιάστηκαν στο XY οδήγησαν σε ενεργοποίηση του *sxl*. Αντίθετα όταν απενεργοποιήθηκαν στο XX οδήγησαν σε απενεργοποίηση του *sxl*. Οι μέχρι σήμερα γνωστοί αριθμητές είναι τα γονίδια *sisterless* (*sisA*, *sisB*, *sisC*) και *runt* (*run*) (Cline, 1988), (Duffy & Gergen, 1991), (Erickson & Cline, 1993), (Deshpande et al., 1995). Ο μοναδικός γνωστός παρονομαστής βρίσκεται σε αυτόσωμα και είναι το γονίδιο *deadpan* (*dpr*). Συγκεκριμένα είναι ένας μεταγραφικός παράγοντας ο οποίος λειτουργεί ως αρνητικός ρυθμιστής του *sxl* (Barbash & Cline, 1995). Τέλος, υπάρχουν τουλάχιστον τέσσερα γονίδια, τα οποία είναι μητρικώς παρεχόμενα και βοηθούν στην «μετάφραση» του λόγου X:A. Δύο θετικοί ρυθμιστές του *sxl*, τα *daughterless* (*da*) και *hermaphrodite* (*her*) (Cronmiller, et al., 1988), (Pultz & Baker, 1995) και δύο αρνητικοί ρυθμιστές τα *extramacrochaetae* (*emc*) και *groucho* (*gro*) (Younger-Shepherd et al., 1992), (Paroush et al., 1994). Επιπλέον έχει δειχθεί ότι οι

πρωτεΐνες DA σχηματίζουν ετεροδιμερή με τις πρωτεΐνες SISB (Cabrera & Alonso, 1991) και λειτουργούν ως ρυθμιστές του *sxl* (Van Doren, et al., 1991).

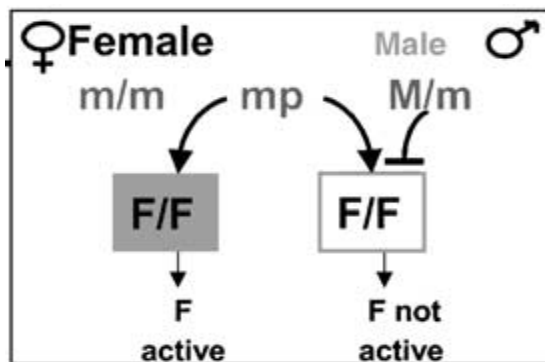
Ο τρόπος συνεργασίας αυτών των τριών κατηγοριών γονιδίων φαίνεται στην **Εικόνα 13**. Όταν ο λόγος είναι ίσος με 1.0 τότε οι αριθμητές παράγουν αρκετή ποσότητα πρωτεϊνών ώστε παρά την δράση του παρονομαστή (που απενεργοποιεί αυτές τις πρωτεΐνες δημιουργώντας σύμπλοκο μαζί τους) να περισσέψουν με σκοπό να δημιουργήσουν ετεροδιμερή σύμπλοκα με τα μητρικώς παρεχόμενα στοιχεία. Αυτά τα ετεροδιμερή ευθύνονται για την ενεργοποίηση του *sxl*.



Εικόνα 13. Πως ο λόγος X:A καθορίζει την πορεία του μονοπατιού φυλοκαθορισμού.

Αντίθετα, όταν ο λόγος είναι 0.5 οι πρωτεΐνες που παράγονται από τους αριθμητές είναι σε μικρότερο αριθμό με αποτέλεσμα να δεσμεύονται όλες από τον παρονομαστή. Έτσι δεν περισσεύουν πρωτεΐνες για να δημιουργήσουν το σύμπλοκο με τα μητρικώς παρεχόμενα στοιχεία, που θα ενεργοποιήσει το *sxl* (Schütt & Nöthiger, 2000).

Ο Lucchesi (1978) πρότεινε ότι το πρωταρχικό σήμα βασίζεται στην διαφορά ανάμεσα στα αλληλόμορφα μιας συγκεκριμένης περιοχής (**Εικόνα 14**). Τα δύο αυτά αλληλόμορφα, χαρακτηρίζονται ως $M(A)$: λειτουργικό αλληλόμορφο και $m(a)$: μη λειτουργικό ή ασθενώς λειτουργικό αλληλόμορφο. Όπως φαίνεται και στην εν λόγω εικόνα το αρσενικό φύλο καθορίζεται από την ύπαρξη ενός κυρίαρχου αλληλόμορφου A . Αντίθετα, το θηλυκό φύλο καθορίζεται από την απουσία του κυρίαρχου γονιδίου (a/a). Εν προκειμένω τα μητρικώς παρεχόμενα στοιχεία (mp) εκκινούν τη διαδικασία προς το θηλυκό φύλο. Η ύπαρξη όμως των προϊόντων του κυρίαρχου και πλήρως λειτουργικού αλληλόμορφου A , το οποίο μεταγράφεται στα πολύ πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης, αναστέλλει τη δράση των mp οδηγώντας στο αρσενικό φύλο. Το κυρίαρχο αλληλόμορφο A όντας απαραίτητο για την ύπαρξη του αρσενικού φύλου πιθανώς θα βρίσκεται υπό τον έλεγχο υποκινητή ο οποίος θα ενεργοποιείται άμεσα ή έμμεσα από τα μητρικώς παρεχόμενα στοιχεία. Γενικότερα η διαφορά στην ποσότητα του προϊόντος του A , ανά γονότυπο, σε συνδυασμό με τη διαφορά στις ποσότητες των υπόλοιπων παραγόντων που βρίσκονται παρόντες στα αρχικά στάδια του εμβρύου φαίνεται να καθορίζουν την ενεργοποίηση του μονοπατιού φυλοκαθορισμού (Shearman, 2002).



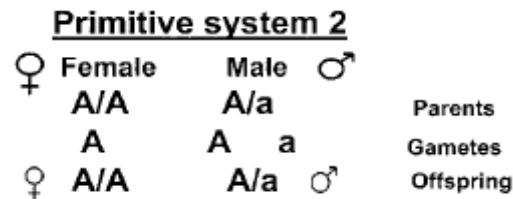
Εικόνα 14. Το πρωταρχικό σήμα βασίζεται στη διαφορά ανάμεσα στα αλληλόμορφα μιας συγκεκριμένης περιοχής. Στο εν λόγω μοντέλο το αρσενικό φύλο καθορίζεται από την ύπαρξη επικρατούς αλληλόμορφου M .

Το 1993 ο Lucchesi (Lucchesi, 1993) πρότεινε ένα νέο μοντέλο για το αρχικό σήμα του μονοπατιού φυλοκαθορισμού στους ευκαρυώτες (**Εικόνα 15**). Στο

συγκεκριμένο μοντέλο η ύπαρξη δύο κυρίαρχων αλληλόμορφων *A* είναι υπεύθυνη για την ανάπτυξη του θηλυκού ατόμου. Αντίθετα η ύπαρξη του αλληλόμορφου *A* σε ετεροζυγωτία οδηγεί στην ανάπτυξη του αρσενικού ατόμου.

Υπάρχουν όμως και κάποιες ενδιαφέρουσες εξαιρέσεις όπως είναι αυτή των παρασιτικών εντόμων που ανήκουν στα τάξη υμενόπτερα. Σε πολλά έντομα της τάξης των υμενόπτερων (βλ. σφήκες, μυρμηγκία και μέλισσες) το φύλο καθορίζεται από την απλοειδία ή την διπλοειδία. Τα

άτομα που προκύπτουν από αγονιμοποιητά ωάρια γίνονται αρσενικά ενώ τα άτομα που προκύπτουν από γονιμοποιημένο ωάρια γίνονται θηλυκά. Ένα τέτοιο έντομο, το οποίο ανήκει στις παρασιτικές σφίγγες, είναι η *Nasonnia vitripennis*. Ο Beukeboom και οι συνεργάτες του (Beukeboom, et al., 2007) περιγράφουν αυτό το μοντέλο που ονομάστηκε MEGISD model (Maternal Effect Genomic Imprinting Sex Determination). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο ο καθορισμός του φύλου οφείλεται στη δράση του *zygotic sex determiner* (*zsd*) το οποίο οδηγεί στην ανάπτυξη θηλυκού ατόμου. Ένα *maternal effect gene* (*msd*) προκαλεί γονιδιωματική αποτύπωση του γονιδίου *zsd* κατά την ωογένεση ώστε το κληρονομούμενο από το θηλυκό *zsd* να μην είναι λειτουργικό στο ζυγωτό. Έτσι τα απλοειδή άτομα αναπτύσσονται ως αρσενικά, διότι φέρουν το «αποτυπωμένο» ανενεργό *zsd* από τη μητέρα. Αντίθετα, τα διπλοειδή αναπτύσσονται ως θηλυκά, διότι φέρουν μεν το ανενεργό *zsd* από τη μητέρα, όμως φέρουν και το ενεργό *zsd* από τον πατέρα το οποίο εκφράζεται κανονικά.



Εικόνα 15. Το πρωταρχικό σήμα βασίζεται στη διαφορά ανάμεσα στα αλληλόμορφα μιας συγκεκριμένης περιοχής. Στο εν λόγω μοντέλο το θηλυκό φύλο καθορίζεται από την ύπαρξη επικρατούς αλληλόμορφου *A* σε ομοζυγωτία.

4.2. Ο παράγοντας αρρενοποίησης στο δάκο της ελιάς

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Rossi), είναι το σοβαρότερο παράσιτο των ελαιόδεντρων, *Olea europaea*, στις μεσογειακές χώρες. Τα προνυμφικά στάδια του δάκου της ελιάς τρέφονται αποκλειστικά με τους καρπούς της ελιάς. Αυτό συνεπάγεται ότι η επιβίωση του εντόμου σχετίζεται άμεσα με την κατάσταση και τη διαθεσιμότητα των καρπών της ελιάς (Daane & Johnson, 2010). Συναντάται σχεδόν οπουδήποτε υπάρχουν καλλιεργούμενες ή άγριες ελιές. Ο δάκος της ελιάς, εκτός από τη λεκάνη της Μεσογείου, ενδημεί και στην Νότιο Αφρική, στα Κανάρια νησιά, στη Μέση Ανατολή και στην Καλιφόρνια (Daane & Johnson, 2010), (Ekesi et al., 2006), (Nardi et al., 2005), (Rice et al., 2003). Η πτήση των ενήλικων ατόμων και η μεταφορά των μολυσμένων καρπών είναι τα σημαντικότερα μέσα της μετακίνησης και της διασποράς σε νέες, προηγούμενες, μη μολυσμένες περιοχές (Fletcher, 1989). Τα θηλυκά γεννούν τα αυγά στο μεσοκάρπιο του καρπού της ελιάς και η προνύμφη τρέφεται από το εσωτερικό του καρπού (Neuenschwander & Michelakis, 1981). Τα ενήλικα άτομα τρέφονται τόσο από οργανικές πηγές, όπως η γύρη των φυτών και οι εκκρίσεις των καρπών, όσο και από πηγές όπως τα περιττώματα των πτηνών, τα βακτήρια και οι ζύμες (Tsiropoulos, 1984).

Οι οικονομικές απώλειες λόγω του συγκεκριμένου παρασίτου έχουν υπολογιστεί ότι φθάνουν μέχρι και το 15% της συγκομιδής, παρά τη χρήση εντομοκτόνων για τον έλεγχο του πληθυσμού του (Mazomenos et al., 2002). Στις επιτραπέζιες ελιές η οικονομική απώλεια ξεκινά με την οπή που ανοίγει το θηλυκό για να ωοαποθέσει. Επιπλέον η προνύμφη που τρέφεται από τον καρπό οδηγεί σε μείωση της οικονομικής

αξίας και της ποιότητας του ελαιόλαδου (Neuenschwander & Michelakis, 1978), (Neuenschwander et al., 1981). Οι συνολικές απώλειες, από τον δάκο της ελιάς, ανά τον κόσμο μπορούν να φτάσουν το 80% της οικονομικής αξίας του ελαιόλαδου, ενώ σε μερικές ποικιλίες ελιάς φτάνουν και το 100% (Tzanakakis, 2003).

Παραδοσιακά, οι μέθοδοι καταστολής του δάκου έχουν βασιστεί σε ψεκασμούς που χρησιμοποιούν μη φιλικά προς το περιβάλλον εντομοκτόνα. Άλλες, περισσότερο εκλεκτικές μέθοδοι, όπως οι μέθοδοι παγίδευσης, έχουν αναπτυχθεί ως οικολογικά καλύτερες εναλλακτικές λύσεις (Bjeliš, 2009). Οι μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες, τη χημική και τη βιολογική καταπολέμηση. Στη χημική καταπολέμηση γίνεται χρήση εντομοκτόνων, ενώ στη βιολογική καταπολέμηση γίνεται χρήση παγίδων, ωφέλιμων εντόμων, τα οποία δρουν εναντίων του δάκου, και η τεχνική του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT).

Η ανακάλυψη του παράγοντα αρρενοποίησης στο δάκο της ελιάς αλλά και σε άλλα μέλη της οικογένειας των Terphritidae παρουσιάζει ενδιαφέρον σε πολλά επίπεδα. Πρώτον, υπάρχει το θεωρητικό ενδιαφέρον σχετικά με την εξελικτική διαδικασία του αρχέγονου μηχανισμού φυλοκαθορισμού, των παραγόντων που συμμετέχουν και του τρόπου αλληλεπίδρασης μεταξύ τους. Δεύτερον, υπάρχει το μηχανιστικό ενδιαφέρον αναφορικά με τους μηχανισμούς που διέπουν τον φυλοκαθορισμό στους οργανισμούς και μάλιστα στα έντομα όπου φαίνεται να υπάρχει μια τεράστια ποικιλομορφία στα αρχικά στάδια του μονοπατιού. Τέλος, από πρακτικής πλευράς, μια τέτοια ανακάλυψη μπορεί επίσης να συνεισφέρει στη βελτίωση της SIT, όπως θα καταστεί σαφέστερο στη συνέχεια.

Μέχρι σήμερα δεν έχει ανακαλυφθεί ακόμη ο παράγοντας αρρενοποίησης λόγω κυρίως των εγγενών προβλημάτων που προκύπτουν από την δομή του Y χρωμοσώματος. Μια δομή που, όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενα κεφάλαια, είναι πλούσια σε επαναλήψεις DNA, ετεροχρωματίνη και μεταθετά στοιχεία, αλλά πολύ φτωχή σε γονίδια.

Στο 3^ο κεφάλαιο αναλύθηκε ο τρόπος δράσης τριών παραγόντων αρρενοποίησης, των *Mdm* (*Musca domestica*), *Yob* (*Anopheles gambiae*) και *Nix* (*Aedes aegypti*), σε συγγενικά με τον δάκο έντομα. Για να λειτουργεί ένα γονίδιο ως παράγοντας αρρενοποίησης πρέπει να πληροί δύο βασικές προϋποθέσεις. Η μια είναι να βρίσκεται αποκλειστικά στο Y χρωμόσωμα, κάτι που δεν ισχύει στη *M. domestica*, και η άλλη είναι να εκφράζεται στα πολύ πρώιμα εμβρυικά στάδια και συγκεκριμένα πριν το σχηματισμό του βλαστοδέρματος.

Βασιζόμενοι στον τρόπο λειτουργίας των τριών αυτών παραγόντων αρρενοποίησης και έχοντας υπόψη τις δύο παραπάνω προϋποθέσεις μπορούν να διατυπωθούν ορισμένες υποθέσεις για τον παράγοντα αρρενοποίησης στον δάκο της ελιάς.

Πρώτον, ο παράγοντας αρρενοποίησης πιθανό να εδράζεται στο Y χρωμόσωμα του δάκου της ελιάς.

Δεύτερον, η έκφρασή του θα πρέπει να εκδηλώνεται περίπου την 3^η έως και την 4^η ώρα μετά την ωοαπόθεση. Έτσι θα υπάρχει ήδη όταν αρχίσουν να εκφράζονται τα υπόλοιπα γονίδια του μονοπατιού φυλοκαθορισμού (βλ. *tra* & *dsx*) και θα του δίνει την δυνατότητα να καθοδηγήσει το μονοπάτι προς ανάπτυξη αρσενικού ατόμου.

Τρίτον, θα πρέπει να είναι υπεύθυνος για το μάτισμα των μεταγράφων του γονιδίου *tra*. Συγκεκριμένα θα πρέπει να εμποδίζει το θηλυκοειδικό μάτισμα του *tra*, το οποίο παράγει μια λειτουργική πρωτεΐνη, και να το οδηγεί στο αρρενοειδικό μάτισμα που παράγει μια μη λειτουργική πρωτεΐνη. Η αλληλεπίδραση με το *tra* μπορεί να είναι είτε άμεση είτε έμμεση. Ως άμεσος ρυθμιστής του *tra* θα δρα

αποτρέποντας το θηλυκοειδικό μάτισμά του *tra* οδηγώντας το επιλεκτικά προς το αρρενοειδικό μάτισμα (πχ. με κάποια πρόσδεση στις θέσεις θηλυκοειδικού ματίσματος). Ως έμμεσος ρυθμιστής του *tra* θα πρέπει να αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη του ματισματοσώματος και έτσι να παρεμβάλλεται στο θηλυκοειδικό μάτισμα του *tra*. Κατ' επέκταση θα είναι υπεύθυνος και για το μάτισμα των μεταγράφων του γονιδίου *dsx*, αφού μια λειτουργική TRA οδηγεί σε θηλυκοειδικό μάτισμα του *dsx* και μια μη λειτουργική TRA σε αρρενοειδικό μάτισμα του *dsx*.

Τέταρτον, θα πρέπει όταν απουσιάζει από αρσενικά έμβρυα αυτά να μετατρέπονται σε άτομα με χρωμοσωμική σύσταση XY αλλά με φαινότυπο θηλυκού ατόμου.

Πέμπτον, θα πρέπει όταν εκφράζεται εκτοπικά σε θηλυκά έμβρυα αυτά να μετατρέπονται σε άτομα με χρωμοσωμική σύσταση XX αλλά με φαινότυπο αρσενικού ατόμου.

4.2.1. Έλεγχος πληθυσμού μέσω SIT στο παρόν και το μέλλον

Η Τεχνική του Στείρου Εντόμου (SIT) θεωρείται αποτελεσματική μέθοδος ελέγχου του πληθυσμού του δάκου της ελιάς και φιλική προς το περιβάλλον. Αυτή η μέθοδος ελέγχου περιλαμβάνει την εκτροφή στείρων αρσενικών ατόμων με στόχο την απελευθέρωση μεγάλου αριθμού από αυτά σε έναν ελαιώνα. Σκοπός αυτής της απελευθέρωσης είναι τα στείρα αρσενικά άτομα να συζευχθούν με τα άγρια θηλυκά του γηγενούς πληθυσμού. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην μπορούν να παραχθούν βιώσιμα αυγά και κατά συνέπεια να μειώνεται πολύ ο πληθυσμός των μυγών της επόμενης γενιάς. Με τον καιρό, αυτό μπορεί να εξαλείψει ολόκληρο τον πληθυσμό των παρασίτων της περιοχής απελευθέρωσης. Οι τρεις βασικότεροι τρόποι δημιουργίας των στείρων εντόμων, που αναφέρονται στη βιβλιογραφία, είναι μέσω ακτινοβολίας, μέσω χημειοστερωτικών και μέσω γενετικής τροποποίησης, η οποία είναι και η νεότερη υπό ανάπτυξη μέθοδος.

Τα πρώτα πειράματα που είχαν ως στόχο την στειρότητα του δάκου της ελιάς ως νύμφη πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ακτινοβολίας το 1960, στην Ιταλία, από τους Mellis και Baccetti (Baccetti & Cappellini, 1961). Αυτή η εργασία ήταν πολύ σημαντική καθώς καθορίστηκαν οι τιμές για το εύρος της γ ακτινοβολίας που θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί (8000 – 1200rad), την κατάλληλη περίοδο εφαρμογής της (3 – 7 μέρες πριν την εμφάνιση του ενηλίκου) και την ελάχιστη αναλογία στείρων : αγρίου – τύπου αρσενικών (4:1). Το αποτέλεσμα ήταν ότι μόνο 1% των αυγών, που εναποτέθηκαν σε ελιές, εκκολαφτήκαν.

Η χρήση χημικών έχει μελετηθεί και αυτή για την επίτευξη στειρώσεως στο δάκο της ελιάς. Το ενδιαφέρον για τη χρήση χημειοστερωτικών προέκυψε τη δεκαετία του 1960. Το 1962 έγινε η πρώτη προσπάθεια για εφαρμογή τους στο δάκο της ελιάς με το χημικό μεθαποξίδη (Orphanidis & Patsakos, 1963) ενώ το 1970 έγινε μελέτη και για ένα άλλο χημικό την αφοξίδη (de Magalhaes, 1970). Άλλα χημειοστερωτικά όπως η αζιριδίνη αρχικά παρουσίασαν ελπιδοφόρα αποτελέσματα με μια σημαντική μείωση της γονιμότητας των θηλυκών και της παρατηρούμενης γονιμότητας στον άγριο πληθυσμό (Orphanidis et al., 1966). Εντούτοις, η περαιτέρω έρευνα ματαιώθηκε λόγω των καρκινογόνων ιδιοτήτων αυτών των χημικών (Orphanidis & Patsakos, 1963), (Fytizas, 1967), (Haniotakis & Galactiou, 1973). Μέχρι σήμερα, κανένα χημειοστερωτικό δεν έχει ανακαλυφθεί που να μπορεί να χρησιμοποιηθεί χωρίς, τουλάχιστον, να παρουσιάσει κάποιο κίνδυνο στους εργαζομένους στα εργοστάσια μαζικής-εκτροφής, ούτε υπάρχουν, ακόμα, χημικές ουσίες διαθέσιμες που

μπορούν να εφαρμοστούν στο γηγενή πληθυσμό παρασίτων χωρίς να εγκυμονεί κίνδυνο για τα είδη μη-στόχους (de Magalhaes, 1970).

Η απελευθέρωση στειρών εντόμων είναι ειδοειδική, φιλική προς το περιβάλλον και σχετικά γρήγορη. Μέχρι στιγμής η SIT στο δάκο της ελιάς δεν είναι επιτυχής και ο κύριος λόγος αποτυχίας της εφαρμογής ήταν η μειωμένη ανταγωνιστικότητα των εργαστηριακών αρσενικών σε σχέση με τα αρσενικά του φυσικού πληθυσμού. (Economopoulos, 1972). Πιο συγκεκριμένα, τα εργαστηριακά έντομα είναι ώριμα για ζευγάρωμα σε ηλικία δύο έως τριών ημερών ενώ τα έντομα του φυσικού πληθυσμού είναι ώριμα σε ηλικία τεσσάρων ημερών (Economopoulos et al., 1971). Σημαντική παρατήρηση, για του σκοπούς της SIT, είναι ότι τα εργαστηριακά έντομα επέλεξαν να ζευγαρώσουν τις τέσσερις ώρες πριν το τέλος της φωτόφασης σε αντίθεση με τα έντομα του φυσικού πληθυσμού που επέλεξαν τις δύο τελευταίες ώρες (Economopoulos & Zervas, 1982). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα εργαστηριακά έντομα ζευγαρώναν λιγότερες φορές σε σύγκριση με τα έντομα του φυσικού πληθυσμού (Economopoulos, 1972) ενώ, τα θηλυκά που γεννούν τα στείρα αυγά θα βλάψουν και πάλι τα φρούτα με τους ωοθέτες τους. Επιπλέον στην κλασική SIT απελευθερώνονται τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά στείρα άτομα. Όμως, η απελευθέρωση και θηλυκών, παρατηρήθηκε, ότι αυξάνει τον πληθυσμό των θηλυκών στο περιβάλλον. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, από τη μια να αυξάνουν οι ζημιές στον καρπό από την ωοθεσία και από την άλλη τα στείρα αρσενικά να ζευγαρώνουν και με στείρα θηλυκά, ελαττώνοντας την αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Προέκυψε, λοιπόν, η ανάγκη για το διαχωρισμό των δύο φύλων. Έτσι, η προσπάθεια εφαρμογής της μεθόδου στο δάκο εγκαταλείφθηκε λόγω της απουσίας βασικών μοριακών και γενετικών εργαλείων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την επίλυση των ανωτέρων προβλημάτων.

Τη λύση, στο πρόβλημα του διαχωρισμού των θηλυκών πριν την απελευθέρωση στο περιβάλλον, έδωσε η γενετική και η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA. Αναπτύχθηκαν σειρές διαφόρων εντόμων της *Ceratitis capitata* οι οποίες είτε είχαν διαφορετικό χρώμα αρσενικού και θηλυκού βομβυκίου (Franz, 2005), είτε τα θηλυκά ήταν ευαίσθητα στη θερμοκρασία ενώ τα αρσενικά όχι (Robinson, 2002), (Robinson et al., 1999), είτε τα θηλυκά πέθαιναν με την ανάπτυξη της ειδικής για θηλυκά RIDL® (Release of Insects carrying a Dominant Lethal), διότι η απουσία του αντιδοτού σκότωνε τα θηλυκά αλλά όχι τα αρσενικά (Alphey, 2007), (Alphey et al., 2007). Συγκεκριμένα η δημιουργία genetic sexing strain της *C. capitata* βασισμένο σε θανατηφόρο γονίδιο ευαίσθητο στη θερμοκρασία έχει δώσει τη δυνατότητα παραγωγής, σε εγκαταστάσεις, 1,4 εκατομμυρίων στειρών αρσενικών νυμφών την εβδομάδα (Caceres, 2002).

Μεγάλη βοήθεια στην εφαρμογή αυτών των μοριακών τεχνικών στον δάκο της ελιάς θα δώσει η ανακάλυψη του παράγοντα αρρενοποίησης, δεδομένου ότι η παρουσία του παράγοντα αρρενοποίησης είναι απαραίτητη για την ανάπτυξη του αρσενικού ατόμου. Η ανακάλυψη του παράγοντα αρρενοποίησης και η χαρτογράφηση του μπορεί να βοηθήσει με διάφορους τρόπους. Θα μπορούσε για παράδειγμα να επιτευχθεί η δημιουργία μιας νέας σειράς εντόμων η οποία θα έδινε ως απογόνους μόνο αρσενικά άτομα. Επίσης θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί η δημιουργία σειράς εντόμων τα οποία θα έχουν τον παράγοντα αρρενοποίησης μεταξύ δύο διαγονιδίων τα οποία φθορίζουν με απώτερο σκοπό τον διαχωρισμό των φθορίζοντων αρσενικών από τα μη φθορίζοντα θηλυκά έντομα. Τέλος, ίσως η σημαντικότερη πιθανή εφαρμογή της γνώσης του παράγοντα αρρενοποίησης θα ήταν η αρρενοποίηση όλων των εμβρύων με αποτέλεσμα την απελευθέρωση μόνο αρσενικών μορφολογικά ατόμων.

4.3. Αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου και επιλογή Y ειδικών αλληλουχιών

Το γονιδίωμα του δάκου της ελιάς είναι ένα από τα πιο πρόσφατα αλληλουχημένα γονιδιώματα το οποίο αλληλουχήθηκε κυρίως με τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς (Next Generation Sequencing) και σε βάθος αλληλούχησης 103X. Όπως αναλύθηκε εκτενώς στα προηγούμενα κεφάλαια, η ανάλυση του Y χρωμοσώματος του δάκου παρουσιάζει πολύ μεγάλο ενδιαφέρον. Έτσι, μετά την αλληλούχηση του γονιδιώματος, προέκυψε η ανάγκη για διαχωρισμό των αλληλουχιών που ανήκουν στο Y χρωμόσωμα με σκοπό την περαιτέρω ανάλυσή τους.

Ο διαχωρισμός των Y ειδικών αλληλουχιών έγινε με την εφαρμογή της τεχνικής Chromosome Quotient (CQ) (Hall et al., 2013b). Η τεχνική αυτή μας δίνει την δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε τον διαχωρισμό μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης και με σχετική ακρίβεια. Η βασική της αρχή είναι η δημιουργία, για κάθε τμήμα του γονιδιώματος, του μαθηματικού λόγου των αναγνώσεων (reads) θηλυκών προς αρσενικών που προκύπτουν από την αλληλούχηση. Επιπλέον, για την ανάλυση, λαμβάνουμε υπόψη ότι μεταξύ αρσενικών και θηλυκών υπάρχει ίδιος αριθμός αυτοσωμάτων, διπλάσιος αριθμός X χρωμοσωμάτων στα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά και τέλος τα αρσενικά είναι τα μόνα τα οποία διαθέτουν Y χρωμόσωμα. Η εν λόγω μέθοδος έχει βρει ευρεία εφαρμογή σε τεμαχισμένα γονιδιώματα οργανισμών τα οποία έχουν προκύψει με τεχνικές αλληλούχησης νέας γενιάς.

Πιο συγκεκριμένα, όσον αφορά τη διαδικασία της ανάλυσης, γίνεται αλληλούχηση θηλυκών ατόμων και ξεχωριστά αλληλούχηση αρσενικών ατόμων. Στη συνέχεια τα αποτελέσματα από την κάθε αλληλούχηση συγκρίνονται και αντιπαραβάλλονται με ένα γονιδίωμα αναφοράς. Σε αυτό το σημείο προκύπτουν οι μαθηματικοί λόγοι βάση των οποίων γίνεται και ο διαχωρισμός. Αν ένα τμήμα του γονιδιώματος έχει λόγο θηλυκών προς αρσενικά $CQ \approx 1$ ($1♀:1♂$) τότε αντιστοιχεί σε τμήμα αυτοσωμικού χρωμοσώματος καθώς υπάρχει η ίδια ποσότητα θηλυκών και αρσενικών διαβασμάτων επειδή τα δύο φύλα έχουν τον ίδιο αριθμό αυτοσωμάτων. Αν για ένα τμήμα του γονιδιώματος ο λόγος είναι $CQ \approx 2$ ($2♀:1♂$) τότε το τμήμα αυτό αντιστοιχεί στο X χρωμόσωμα καθώς υπάρχει διπλάσιος αριθμός διαβασμάτων στα θηλυκά επειδή τα θηλυκά έχουν δύο X χρωμοσώματα ενώ τα αρσενικά ένα. Τέλος αν για ένα τμήμα ο λόγος είναι $CQ \approx 0$ ($0♀:1♂$) τότε το τμήμα αυτό ανήκει στο Y χρωμόσωμα καθώς δεν υπάρχουν διαβάσματα για αυτό στα θηλυκά και υπάρχουν μόνο στα αρσενικά.

Η δομή του Y χρωμοσώματος γνωρίζουμε ότι χαρακτηρίζεται κυρίως από στοιχεία όπως είναι η ετεροχρωματίνη, οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και τα μεταθετά στοιχεία. Επιπλέον η εξελικτική προέλευση του Y έχει ως αποτέλεσμα την πιθανή ύπαρξη ομολογίας τόσο με το X (λόγω προέλευσης) όσο και με τμήματα αυτοσωμάτων ή και του X τα οποία διπλασιάστηκαν και μεταφέρθηκαν στο Y. Λόγω όλων των παραπάνω υπάρχει η πιθανότητα μεταξύ των αλληλουχιών με $CQ \approx 0$ να βρίσκονται και αλληλουχίες οι οποίες ανήκουν είτε στο X χρωμόσωμα είτε σε κάποιο αυτόσωμα. Για τον λόγο αυτό οι αλληλουχίες οι οποίες μέσω της ανάλυσης χαρακτηρίζονται ως αρρενοειδικές (Y-ειδικές) πρέπει να ελέγχονται και σε DNA

αρσενικών και θηλυκών ατόμων μέσω PCR με εκκινητές που σχεδιάζονται μέσα σε αυτές.

5. Σκοπός

Από την αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου, με την αξιοποίηση των τεχνικών Next Generation Sequencing και τη χρήση της μεθόδου Chromosome Quotient, προέκυψε μια βάση δεδομένων με 84 αρρενοειδικές αλληλουχίες. Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η διάκριση και ο διαχωρισμός, ανάμεσα σε αυτές, των πραγματικά αρρενοειδικών αλληλουχιών. Πλέον η μεγάλη υπολογιστική δύναμη μας παρέχει την δυνατότητα βιοπληροφορικής ανάλυσης τεράστιων όγκων δεδομένων. Ο συνδυασμός της γονιδιωματικής και της βιοπληροφορικής ανάλυσης θα βοηθήσουν σημαντικά σε αυτό τον διαχωρισμό των αλληλουχιών μέσα στις οποίες πιστεύεται ότι βρίσκεται και ο παράγοντας αρρενοποίησης του δάκου της ελιάς.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

1. Έλεγχος αρρενοειδικότητας ικριωμάτων αλληλούχισης

1.1. Προέλευση ικριωμάτων αλληλούχισης

Με την αλληλούχιση δίνεται η δυνατότητα να διαβάσουμε την ακριβή αλληλουχία βάσεων ενός τμήματος DNA ή και ολόκληρου του γονιδιώματος ενός οργανισμού και να εξαγάγουμε χρήσιμες πληροφορίες και συμπεράσματα. Μια από αυτές τις πληροφορίες είναι η αλληλουχία του Y χρωμοσώματος και το γονιδιακό του περιεχόμενο.

Η προετοιμασία για την αλληλούχιση περιλαμβάνει την απομόνωση γενωμικού DNA τόσο από αρσενικά όσο και από θηλυκά άτομα και η αποστολή του σε εξωτερικό συνεργάτη για την αλληλούχιση του. Στην παρούσα εργασία τα δείγματά μας εστάλησαν στο Πανεπιστήμιο McGill που εδρεύει στον Καναδά και συγκεκριμένα στο εργαστήριο του κου Ραγκούση. Το εν λόγω εργαστήριο ασχολείται και αναπτύσσει τεχνικές Next Generation Sequencing οι οποίες μας παρέχουν μεγάλο όγκο δεδομένων από το γονιδίωμα και με μεγάλη ακρίβεια. Συγκεκριμένα τα δεδομένα για το γονιδίωμα του δάκου προήλθαν με αλληλούχιση αυτού που έφτανε σε βάθος 103X.

Στη συνέχεια για τον διαχωρισμό των Y ειδικών αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Chromosome Quotient (Hall et al., 2013a). Με την τεχνική αυτή αντιστοιχίζουμε τα δεδομένα της αλληλούχισης του γονιδιώματος των αρσενικών και των θηλυκών ατόμων με ένα γονιδίωμα αναφοράς και ελέγχουμε τους λόγους των θηλυκών αναγνώσεων προς τις αρσενικές αναγνώσεις για κάθε τμήμα του γονιδιώματος αναφοράς. Ελέγχοντας τους λόγους χαρακτηρίζουμε την κάθε αλληλουχία ως αυτοσωμική ή του X χρωμοσώματος ή του Y χρωμοσώματος. Συγκεκριμένα όταν ο λόγος των θηλυκών αναγνώσεων προς τις αρσενικές είναι 1:1 τότε οι αλληλουχίες αυτές θεωρούνται ότι ανήκουν στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα. Αντίστοιχα, όταν ο λόγος θηλυκών αναγνώσεων προς αρσενικές είναι 2:1 τότε οι αλληλουχίες αυτές χαρακτηρίζονται ως του X χρωμοσώματος διότι τα θηλυκά έχουν 2 X ενώ τα αρσενικά 1 X. Τέλος, όταν ο λόγος είναι 0:1 τότε οι αλληλουχίες αυτές ως του Y χρωμοσώματος καθώς τα θηλυκά δεν έχουν Y χρωμόσωμα ενώ τα αρσενικά έχουν. Βέβαια αυτή η διάκριση του Y δεν είναι πάντοτε ξεκάθαρη και απαιτείται επιπλέον έλεγχος με μεθόδους αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με εκκινητές σχεδιασμένους στις, θεωρητικά, αρρενοειδικές αλληλουχίες.

Τα ζεύγη εκκινητών για την διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας σχεδιάστηκαν από το εν λόγω εργαστήριο που πραγματοποίησε την αλληλούχιση και σχεδιάστηκαν σε μικρότερα σημεία εσωτερικά των Contig τα οποία ονομάσαμε «Inner Contigs»

1.2. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA ενήλικων ατόμων

Η απομόνωση του DNA είναι μια διαδικασία καθαρισμού και παραλαβής του DNA από το δείγμα χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό φυσικών και χημικών μεθόδων (Εικόνα 16). Η πρώτη απομόνωση του DNA έγινε το 1869 από τον Friedrich Miescher. Στις μέρες μας, η απομόνωση DNA, είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται κατά κόρον στη μοριακή βιολογία και στις ιατροδικαστικές

αναλύσεις (Dahm, 2008). Η απομόνωση πραγματοποιήθηκε με το Wizard[®] Genomic Purification DNA kit (PROMEGA).

1. Επιλέγουμε τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα.
2. Αναισθητοποιούμε στον πάγο
3. Τέμνουμε και απομακρύνουμε την κοιλία, διατηρούμε το θώρακα και την κεφαλή.
4. Τοποθετούμε ένα έντομο ανά μικροσωληνάριο.
5. Προσθέτουμε 400μl Nuclei Lysis Solution (διατηρείται στον πάγο) σε κάθε μικροσωληνάριο.
6. Με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου λιώνουμε το έντομο.
7. Επωάζουμε στο υδατόλουτρο στους 65°C για 15 – 30min.
8. Προσθέτουμε 135μl Protein Precipitation Solution, αναδεύουμε με vortex και τοποθετούμε στον πάγο για 5min.
9. Φυγοκεντρούμε στο μέγιστο των στροφών της φυγόκεντρου (max speed) για 5min.
10. Παραλαμβάνουμε το υπερκείμενο και το τοποθετούμε σε νέα μικροσωληνάρια.
11. Κατακρημνίζουμε το DNA με 400μl ισοπροπανόλη και το επαναδιαλύουμε σε 100μl ddH₂O.
12. Προσθέτουμε 3μl TE-RNase buffer στο καθένα, τα τοποθετούμε στους 37°C για 30 min και στη συνέχεια τα τοποθετούμε overnight στους 4°C.



Εικόνα 16. Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας απομόνωσης DNA από ζωικό ιστό.

1.3. Ποσοτικοποίηση DNA

Για να έχουμε ακρίβεια στον έλεγχο με την PCR θα πρέπει σε κάθε αντίδραση να υπάρχει η ίδια συγκέντρωση DNA η οποία πρέπει να είναι ίση με 40 ng/μl. Για τον λόγο αυτό μετά την απομόνωση του DNA έγινε ποσοτικοποίηση με τη χρήση του μηχανήματος Qubit™ 2.0 (Invitrogen).

Η ποσοτικοποίηση του DNA επιτυγχάνεται με το kit του μηχανήματος dsDNA BR® (Πίνακας 2) το οποίο διαθέτει φθορίζουσα ουσία η οποία συνδέεται με το δίκλωνο DNA. Η χρωστική αυτή φθορίζει μετά από διέγερση με ακτινοβολία κατάλληλου μήκους κύματος. Το μήκος κύματος διαφέρει ανάλογα με το αν η χρωστική είναι ελεύθερη ή προσδεμένη στο δίκλωνο DNA. Το μηχάνημα πραγματοποιεί την ποσοτικοποίηση βάση πρότυπης καμπύλης την οποία σχηματίζει μετά από μέτρηση των πρότυπων διαλυμάτων που παρέχονται με το kit. Το εύρος ανίχνευσης του μηχανήματος κυμαίνεται μεταξύ 2 και 1000ng.

Είδος	Ονομασία
Αντιδραστήριο	Qubit® dsDNA BR Component A (Qubit® Buffer)
Αντιδραστήριο	Qubit® dsDNA BR Component B (Qubit® Reagent)
Πρότυπο διάλυμα #1	Qubit® dsDNA BR Component C, 0 ng/μl
Πρότυπο διάλυμα #2	Qubit® dsDNA BR Component D, 100 ng/μl

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια και πρότυπα διαλύματα του kit dsDNA BR®.

Η πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της εταιρίας:

1. Ετοιμάζουμε το διάλυμα εργασίας (working solution) σε ένα μικροσωληνάριο προσθέτοντας 199μL Qubit® Buffer και 1μL Qubit® Reagent για κάθε δείγμα που έχουμε προς μέτρηση.
2. Αναδεύουμε έντονα.
3. Τοποθετούμε 190μL από το working solution σε δύο μικροσωληνάρια για τα πρότυπα διαλύματα.
4. Προσθέτουμε 10μL από κάθε πρότυπο διάλυμα στο αντίστοιχο μικροσωληνάριο και αναδεύουμε έντονα.
5. Τοποθετούμε 199μL από το working solution σε νέα μικροσωληνάρια για τα άγνωστα δείγματα.
6. Προσθέτουμε 1μL από το άγνωστο δείγμα στο αντίστοιχο μικροσωληνάριο και αναδεύουμε.
7. Επωάζουμε για 2min σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Μετράμε το φθορισμό των πρότυπων με το φθορισμόμετρο Qubit 2.0.
9. Μετράμε το φθορισμό και των άγνωστων δειγμάτων με το φθορισμόμετρο Qubit 2.0.
10. Το μηχάνημα μας δείχνει τη συγκέντρωση του DNA για κάθε άγνωστο δείγμα.

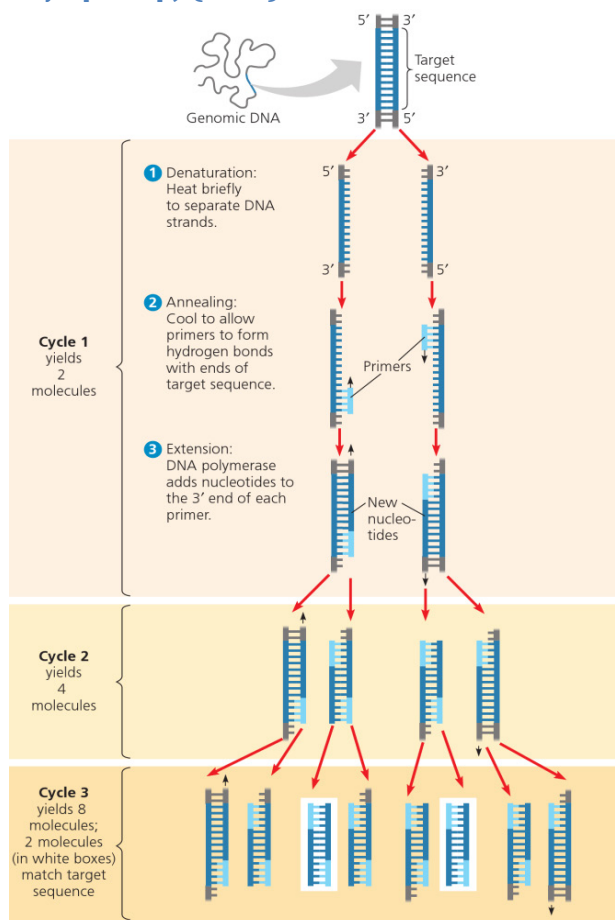
1.4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται στη μοριακή βιολογία για να ενισχυθεί ένα μόνο αντίγραφο ή μερικά αντίγραφα ενός τμήματος DNA, δημιουργώντας από χιλιάδες έως εκατομμύρια αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας. Είναι μια εύκολη και φθηνή μέθοδος για να ενισχυθεί ένα συγκεκριμένο τμήμα του DNA. Είναι χρήσιμη στην διάγνωση και την παρακολούθηση των γενετικών ασθενειών, στην εγκληματολογία, στη μελέτη της λειτουργίας των στοχευόμενων τμημάτων και σε πολλές ακόμη εφαρμογές (Bartlett & Stirling, 2003).

Η μέθοδος βασίζεται στη θερμική κυκλοποίηση, κύκλο επαναλαμβανόμενης θέρμανσης και ψύξης της αντίδρασης, για την τήξη και την αντιγραφή του DNA. Οι εκκινητές, (5' και 3' primers) οι οποίοι έχουν αλληλουχίες συμπληρωματικές προς την περιοχή-στόχο και βρίσκονται εκατέρωθεν αυτής, μαζί με μια DNA πολυμεράση είναι βασικά συστατικά για να καταστεί δυνατή η επιλεκτική και επαναλαμβανόμενη εκθετική ενίσχυση. Η PCR μπορεί σε μεγάλο βαθμό να τροποποιηθεί για να εκτελεί ένα ευρύ φάσμα των γενετικών χειρισμών (πχ. real time-PCR, ποσοτική PCR) (Bartlett & Stirling, 2003). Η αντίδραση (Πίνακας 3) πραγματοποιήθηκε με το ένζυμο Taq polymerase της εταιρίας Geneon.

Όπως φαίνεται και στην [Εικόνα 17](#) κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από μια σειρά συγκεκριμένων σταδίων:

1. Αποδιάταξη του DNA. Η θερμοκρασία συνήθως αυξάνεται στους 98°C ώστε να αποχωριστούν οι δύο κλώνοι του DNA.
2. Υβριδοποίηση εκκινητών. Οι εκκινητές εκτός από τη συμπληρωματικότητα για το στόχο έχουν και μια τιμή T_m (melting temperature). Η τιμή αυτή δίνει την τιμή για την θερμοκρασία υβριδοποίησης των εκκινητών (T_a) η οποία συνήθως είναι $T_a = T_m - 5$.
3. Κλωνική επέκταση. Η θερμοκρασία αυξάνεται στην βέλτιστη θερμοκρασία λειτουργίας της DNA πολυμεράσης και αυτή με τη σειρά της αναγνωρίζει τους εκκινητές και ξεκινά να τους επεκτείνει.



Εικόνα 17. Σχηματική απεικόνιση των τριών πρώτων κύκλων της PCR.

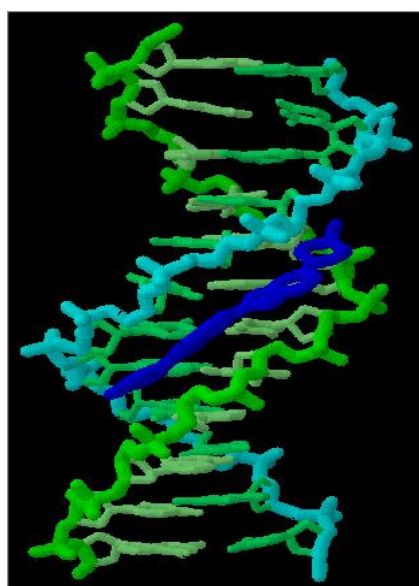
Αυτά τα τρία βήματα αποτελούν έναν ολόκληρο κύκλο PCR. Αυτός ο κύκλος επαναλαμβάνεται περισσότερες από 30 φορές ανάλογα με τις απαιτήσεις του πειράματος.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Πρόγραμμα PCR		
			T °C	Χρόνος
DNA	Επιθυμητή ποσότητα			
Buffer 10×	1×	Αρχική αποδιάταξη	95	3 min
dNTPs	2,5 mM (έκαστο)	Αποδιάταξη	98	30 sec
Primer Forward	10 pmol/μl	Υβριδοποίηση εκκινητών	Ta	30 sec
Primer Reverse	10 pmol/μl	Κλωνική επέκταση	72	10 sec
Taq polymerase	1 unit	Τελική επέκταση	72	5 min
ddH ₂ O	Έως τον τελικό όγκο			
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	Κύκλοι PCR	30	

Πίνακας 3. Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR με την Taq polymerase. Ta: ανάλογα τα Tm έκαστου ζεύγους.

1.5. Ποσοτική PCR (quantitative PCR, qPCR)

Η ποσοτική PCR πραγματοποιήθηκε σε κυκλοποιητή της Bio-Rad® και χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών των οποίων η αρρενοειδικότητα δεν είχε εξακριβωθεί η με απλή PCR (Παράρτημα Πίνακας 18) (Πίνακας 4).



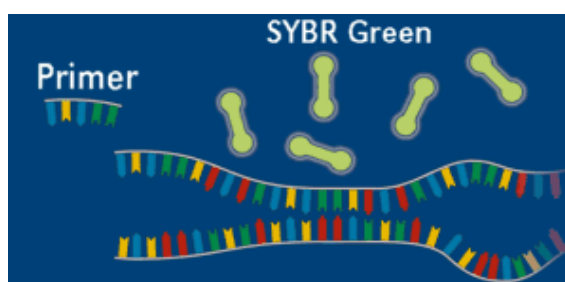
Εικόνα 18. Η χρωστική SYBR Green I (μπλε χρώμα) που προσδένεται στη μικρή αύλακα του DNA και χρησιμεύει ως ανιχνευτής των προϊόντων PCR.

Η ποσοτική PCR δεν διαφέρει καθόλου από την απλή real time-PCR. Συγκεκριμένα, αποτελεί ένα είδος real time-PCR στο οποίο μας ενδιαφέρει ο κύκλος στον οποίο εμφανίζεται το προϊόν ώστε να μπορέσουμε να εκτιμήσουμε την αρχική ποσότητα του στόχου μας. Η απλούστερη τεχνική real time – PCR βασίζεται στην ανίχνευση των προϊόντων της PCR με την ενσωμάτωση της χρωστικής SYBR Green I στο DNA. Η χρωστική αυτή μπορεί να προσδένεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, όπου ενισχύει σημαντικά τον φθορισμό του (Εικόνα 18). Το σήμα φθορισμού αυξάνει σταδιακά κατά τη διάρκεια της φάσης επιμήκυνσης, γίνεται μέγιστο στο τέλος κάθε αντίστοιχης φάσης και μειώνεται ή εκλείπει κατά τη φάση αποδιάταξης (Εικόνα 19). Πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η τεχνική δεν παρουσιάζει απόλυτη εξειδίκευση και ότι ταυτόχρονα μπορεί να ανιχνευθούν διμερή των εκκινητών και μη ειδικά προϊόντα PCR. Προκειμένου να εκτιμηθεί αν έχουν σχηματιστεί ειδικά προϊόντα PCR, πραγματοποιείται ανάλυση της καμπύλης τήξης (melting curve). Αν έχει σχηματιστεί μόνο το ειδικό προϊόν PCR, θα είναι ορατή μόνο μια κορυφή στην

εικόνα ενδείξεων των σημείων τήξης (Ginzinger, 2002), (Van der Velden et al., 2003).

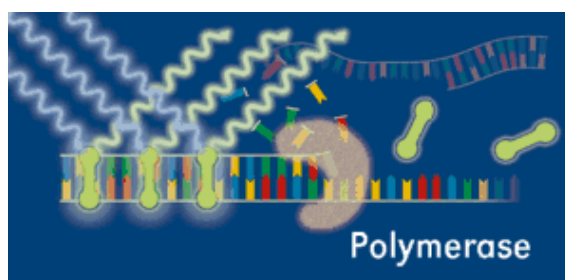
Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Πρόγραμμα real time – PCR		
			T °C	Χρόνος
cDNA	5μl από αραίωση 1:10	Αρχική αποδιάταξη	50°C	2 min
			95°C	3 min
Primer Forward	400 nM	Αποδιάταξη	95°C	10 sec
Primer Reverse	400 nM	Υβριδοποίηση εκκινητών	Ta	20 sec
SYBR Green I	2× → 1×	Κλωνική επέκταση	72°C	30 sec
		Melting curve	55°C	κάθε 0,5 sec ανεβαίνει 0,5°C
ddH ₂ O	Έως τον τελικό όγκο	Τέλος	95°C	
Vτ	15μl	Κύκλοι PCR	49	

Πίνακας 4. Πρωτόκολλο αντίδρασης real time – PCR. Τα: ανάλογα τα Tm έκαστον ζεύγους

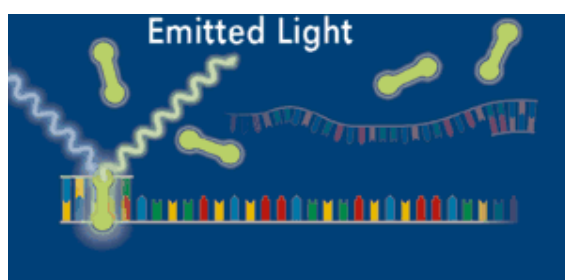


Εικόνα 19. Σχηματική αναπαράσταση της ανάλυσης RT-PCR με τη χρήση της χρωστικής SYBR Green I :

A) Αποδιάταξη του δίκλωνου DNA και χρήση κατάλληλων εκκινητών και μορίων χρωστικής για την επακόλουθη επιμήκυνση και πολλαπλασιασμό των μορίων DNA



B) Υβριδισμός των ειδικών για τα μόρια DNA εκκινητών και έναρξη της πρόσδεσης μορίων SYBR Green I στη μικρή αύλακα και της αντίχενωσης φθορισμού



Γ) Επιμήκυνση και δημιουργία δίκλωνων μορίων DNA με την ταυτόχρονη πρόσδεση χρωστικής. Στο τέλος της φάσης επιμήκυνσης το σήμα φθορισμού αποκτά τη μέγιστη τιμή.

2. Βιοπληροφορική ανάλυση αρρενοειδικών αλληλουχιών

Προκείμενου να εξακριβωθεί η φύση και ο ρόλος των αλληλουχιών που χαρακτηρίστηκαν ως αρρενοειδικές πραγματοποιήθηκε βιοπληροφορική ανάλυση αυτών.

2.1. OMIGA®

Το πρόγραμμα OMIGA® (Kramer, 2001) είναι ένα εργαλείο ανάλυσης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Το πρόγραμμα αυτό παρέχει πλήθος δυνατοτήτων μέσα στις οποίες είναι η δημιουργία, ανάλυση και επεξεργασία νουκλεοτιδικών ή πρωτεϊνικών αλληλουχιών. Επιπλέον είναι δυνατόν να προσδιοριστεί η ύπαρξη θέσεων περιορισμού, δομικών μοτίβων, αναγνωστικών πλαισίων και άλλων χαρακτηριστικών μίας αλληλουχίας.

Το εν λόγω πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση πιθανών ανοικτών αναγνωστικών πλαισίων στις προς έλεγχο αλληλουχίες.

2.2. Αλγόριθμοι Blast

Το πρόγραμμα Blast (Altschul et al., 1990) ανήκει στην κατηγορία των αλγορίθμων τοπικής στοίχισης και είναι ίσως ο συχνότερα χρησιμοποιούμενος αλγόριθμος. Δίνει τη δυνατότητα της σύγκρισης και της στοίχισης νουκλεοτιδικών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών με βάση την ομολογία που εμφανίζουν. Το πρόγραμμα αναζητά και εντοπίζει ομόλογες περιοχές που είναι κατατεθειμένες στις διάφορες βάσεις δεδομένων, που εμφανίζουν μερική τοπική ή πλήρης ομοιότητα με την αλληλουχία επερώτησης. Υπάρχουν διάφορες υποκατηγορίες του προγράμματος Blast ανάλογα με το είδος της αναζήτησης:

- Blastn: αντιστοίχιση νουκλεοτιδικής αλληλουχίας επερώτησης με νουκλεοτιδική βάση δεδομένων.
- Blastx: μετάφραση αλληλουχίας επερώτησης στα έξι αναγνωστικά πλαίσια και αντιστοίχιση σε πρωτεϊνική βάση δεδομένων.
- Blastp: αντιστοίχιση πρωτεϊνικής αλληλουχίας επερώτησης με πρωτεϊνική βάση δεδομένων.
- tBlastn: αντιστοίχιση πρωτεϊνικής αλληλουχίας επερώτησης με αλληλουχίες νουκλεοτιδικής βάσης δεδομένων μεταφρασμένες και στα έξι αναγνωστικά πλαίσια.
- tBlastx: μετάφραση αλληλουχίας επερώτησης στα έξι αναγνωστικά πλαίσια, μετάφραση και των αλληλουχιών νουκλεοτιδικής βάσης δεδομένων στα έξι αναγνωστικά πλαίσια και αντιστοίχιση κάθε αναγνωστικού πλαισίου επερώτησης με κάθε ένα από τα έξι αναγνωστικά πλαίσια κάθε αλληλουχίας στη βάση δεδομένων.

Στην παρούσα εργασία η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε μέσω των Blastn, Blastx και tBlastx στις βάσεις δεδομένων Insecta (taxid:50557), Tephritidae (taxid:7211) και Bactrocera oleae (taxid:104688). Χρησιμοποιήσαμε τις προϋπάρχουσες ρυθμίσεις των αλγόριθμων Blast και αποδεχτήκαμε αποτελέσματα με e-value <0,001. Επιπλέον, στην περίπτωση του Blastn, έγινε χρήση τόσο του Megablast για ανίχνευση αλληλουχιών υψηλής ομοιότητας, όσο και του απλού blastn για ανίχνευση σχετικά όμοιων αλληλουχιών.

2.3. Πρόβλεψη πρωτεϊνικών δομών InterProScan®

Το InterProScan® είναι το πακέτο λογισμικού που επιτρέπει την σάρωση τόσο αμινοξικών όσο και νουκλεοτιδικών αλληλουχιών για ανεύρεση πιθανών δομών – υπογραφών (signatures) στη βάση δεδομένων InterPro. Οι δομές – υπογραφές είναι μοτίβα αμινοξέων ή νουκλεοτιδίων τα οποία σχηματίζουν χαρακτηριστικές δομές και έχουν συγκεκριμένες λειτουργίες και ιδιότητες. Οι δομές – υπογραφές παρέχονται από τις διάφορες βάσεις δεδομένων, που αποτελούν την κοινοπραξία της InterPro.

2.4. Λογική πορεία ανάλυσης

1. Εισαγάγουμε τη νουκλεοτιδική αλληλουχία του inner contig στο OMIGA® και ελέγχουμε για ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια (Open Reading Frames, ORFs).
2. Ελέγχουμε αν το τμήμα των περίπου 100 βάσεων που ενισχύουμε περιλαμβάνει κάποιο ORF και σε ποιο σημείο του inner contig βρίσκεται.
3. Ανάλογα με το μέγεθος του inner contig ή του ORF επιλέγουμε να προχωρήσουμε στο Blast με ένα από αυτά.
 - a. Αν το τμήμα που ενισχύουμε είναι περίπου το ίδιο μέγεθος με το inner contig επιλέγουμε το inner contig.
 - b. Αν υπάρχει κάποιο μεγάλο ORF (>100bp) το οποίο περιλαμβάνει το τμήμα που ενισχύουμε τότε επιλέγουμε το ORF.
 - c. Καλύτερο θεωρούμε να γίνεται επιλογή ολόκληρου του inner contig και εκ των υστέρων κυρίως διατήρηση των αποτελεσμάτων του Blast που έχουν ομολογία με την περιοχή που ενισχύουμε. Αυτό έχει ως στόχο πρώτον την διευκόλυνση της ανίχνευσης ομόλογων στο blast αλλά και την ψηλάφηση της γύρω περιοχής του σημείου που ενισχύουμε.
4. Πραγματοποιούμε Blast με τις προϋπάρχουσες παραμέτρους και διατήρηση αποτελεσμάτων με e-value <0,001. Για κάθε ένα από τα κατωτέρω εργαλεία Blast (a – d) χρησιμοποιούμε τις βάσεις δεδομένων Insecta (taxid:50557), Tephritidae (taxid:7211) και Bactrocera oleae (taxid:104688)
 - a. Blastn (Megablast)
 - b. Blastn (Somewhat similar)
 - c. Blastx
 - d. tBlastx
5. Καταγράφουμε σε κατάλληλα διαμορφωμένο excel τα καλύτερα από τα αποτελέσματά μας ενώ καταχωρούμε σε φακέλους screenshot αυτών για μετέπειτα ευκολότερη πρόσβαση στα αποτελέσματα.

6. Στις περιπτώσεις όπου έχουμε αποτελέσματα από mRNA PREDICTED γονιδίων τότε:
 - a. Ελέγχουμε με ποιο τμήμα του mRNA έχει ομολογία η αλληλουχία επερώτησης.
 - b. Αν είναι σε 5' ή 3' αμετάφραστη περιοχή τότε δεν πραγματοποιούμε περαιτέρω έλεγχο.
 - c. Αν περιλαμβάνει τμήμα της κωδικής αλληλουχίας του mRNA τότε λαμβάνουμε την αμινοξική αλληλουχία του PREDICTED γονιδίου από το NCBI και την καταθέτουμε στο πρόγραμμα InterProScan[®].
7. Το InterProScan[®] θα ανιχνεύσει πιθανά πρωτεϊνικά μοτίβα στην αμινοξική αλληλουχία και θα δώσει και λειτουργικές πληροφορίες για την πιθανή αυτή πρωτεΐνη.
8. Η ανάλυση ολοκληρώνεται με την αντιπαραβολή των τμημάτων που ενισχύουμε στη βάση δεδομένων του RNAseq του δάκου της ελιάς στην πλατφόρμα του Apollo.

3. Δημιουργία προφίλ έκφρασης

Η μελέτη των επιπέδων έκφρασης των πιθανών γονιδίων που επιλέχθηκαν γίνεται με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time – PCR).

Πριν προχωρήσουμε στην real time – PCR πρέπει πρώτα να απομονώνουμε RNA από τα διάφορα στάδια της ανάπτυξης του δάκου που μας ενδιαφέρουν (Πίνακας 5) και με αντίστροφη μεταγραφή να το μετατρέπουμε σε cDNA. Στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου, αυγό, προνύμφη και νύμφη, είναι αδύνατος ο προσδιορισμός του φύλου βάση μορφολογικών χαρακτηριστικών. Για τον λόγο αυτό απομονώνουμε και DNA από κάθε αυγό, προνύμφη και νύμφη που απομονώσαμε RNA. Στη συνέχεια πραγματοποιούμε PCR με το ειδικό ζεύγος εκκινητών sc6626 (Πίνακας 6) που μας επιτρέπει τον προσδιορισμό του φύλου.

ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	
Testes & MAGs:	
0-day male adult	
3-day male adult	
7-day_Before Mating male adult	
7-day_After Mating male adult	
9-day_After Mating male adult	
Eggs-larvae-pupae	
1-hour eggs	
15-hours eggs	
48-hours eggs	
1nd stage larvae	
3rd stage larvae	
1-day pupae	
3-days pupae	

Πίνακας 5. Στάδια ανάπτυξης του δάκου της ελιάς από τα οποία έγινε απομόνωση ιστών με σκοπό την σύνθεση cDNA.

Όνομα εκκινητών	Αλληλουχία	Tm	Προϊόν
sc6626	Forward	5'-TTAGATAGACTCAGGGAACG-3'	500bp
	Reverse	5'-AATTGAAGTGTAGGCAGAG-3'	

Πίνακας 6. Πίνακας αλληλουχιών του ζεύγους εκκινητών sc6626 που χρησιμοποιήθηκε στις PCR ανίχνευσης φύλου.

3.1.Απομόνωση ιστών

Η απομόνωση τόσο του RNA όσο και του DNA έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του αντιδραστηρίου TRI Reagent[®] (Molecular Research Center).

3.1.1. Απομόνωση RNA

Προετοιμασία ιστού

1. Συλλέγουμε τους επιθυμητούς ιστούς, τους τοποθετούμε σε μικροσωληνάρια και προσθέτουμε 100μl TRI Reagent[®].
2. Με τη βοήθεια εμβόλου ομογενοποιούμε τους ιστούς και στη συνέχεια συμπληρώνουμε TRI Reagent[®] έως τελικού όγκου 300μl.
3. Αφήνουμε τους ιστούς για 5min σε RT, αναδεύουμε ήπια με vortex και τους αφήνουμε άλλα 5min σε RT.
4. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 12.000g και στους 4°C.

Απομόνωση RNA

1. Μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέα μικροσωληνάρια και προσθέτουμε BCP (1-Bromo-3-Chloro-Propane) σε αναλογία 0,1ml BCP/1ml TRI Reagent[®].
2. Αναδεύουμε δυνατά με το χέρι για 15sec και τα αφήνουμε για 3min σε RT.
3. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 12.000g και στους 4°C.
4. Στο μικροσωληνάριο θα δημιουργηθούν τρεις φάσεις. Η άνω φάση (υδατική) περιέχει το RNA, η μεσόφαση περιέχει τις πρωτεΐνες και η κάτω φάση (οργανική) το DNA. Συλλέγουμε με προσοχή την άνω φάση και τη μεταφέρουμε σε νέα μικροσωληνάρια. Τις υπόλοιπες δύο φάσεις τις διατηρούμε στον πάγο για να πραγματοποιήσουμε την απομόνωση του DNA.
5. Στα μικροσωληνάρια, με την άνω φάση, προσθέτουμε ισοπροπανόλη, αναδεύουμε απαλά και αφήνουμε για 8min σε RT σε αναλογία 0,5ml ισοπροπανόλης/1ml TRI Reagent[®].
6. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 12.000g και στους 4°C. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 75% αιθανόλη σε αναλογία 1ml αιθανόλης/1ml TRI Reagent[®].
7. Φυγοκεντρούμε για 5min σε 12.000g και στους 4°C. Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και αφήνουμε το ίζημα να στεγνώσει για 2 – 3min.
8. Προσθέτουμε 15μl ζεστό dH₂O (55°C) και αναδεύουμε για να διαλυτοποιηθεί το ίζημα.
9. Αποθηκεύουμε το RNA είτε στους -80°C (μακροχρόνια αποθήκευση) είτε στους -20°C (σύντομη αποθήκευση μιας ημέρας).

3.1.2. Καθαρισμός με DNase

Πριν την χρήση του RNA για τη σύνθεση cDNA είναι απαραίτητος ο καθαρισμός των δειγμάτων με DNase (Πίνακας 7). Αυτός ο καθαρισμός έχει ως στόχο να μην υπάρχουν τμήματα γενωμικού DNA μαζί με το cDNA. Κατ' αυτόν τον τρόπο το cDNA περιλαμβάνει μόνο τις αλληλουχίες των μορίων RNA του κάθε ιστού.

Καθαρισμός με DNase (TURBO DNA – free™ kit)

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Διαδικασία
dsRNA	Επιθυμητή ποσότητα	1. 25min/ 37°C 2. Προσθήκη Inactivation Buffer 1/10 όγκου αντίδρασης 3. Ανακίνηση 5min/ RT 4. Φυγοκέντρηση 10.000g/ 90sec 5. Υπερκείμενο σε νέο tube
TURBO DNase Buffer 10×	1×	
TURBO DNase	2 units	
ddH ₂ O	Έως τελικού όγκου	
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	

Πίνακας 7. Πρωτόκολλο καθαρισμού δειγμάτων RNA με DNase.

3.1.3. Απομόνωση DNA

Προετοιμασία ιστού

1. Συλλέγουμε τους επιθυμητούς ιστούς, τους τοποθετούμε σε μικροσωληνάρια και προσθέτουμε 100μl TRI Reagent®.
2. Με τη βοήθεια εμβόλου ομογενοποιούμε τους ιστούς και στη συνέχεια συμπληρώνουμε TRI Reagent® έως τελικού όγκου 300μl.
3. Αφήνουμε τους ιστούς για 5min σε RT, αναδεύουμε ήπια με vortex και τους αφήνουμε άλλα 5min σε RT.
4. Φυγοκεντρούμε για 10min σε 12.000g και στους 4°C.

Απομόνωση DNA

1. Στα δείγματα που έχουμε διατηρήσει στον πάγο στο βήμα 4 της απομόνωσης RNA (βλέπε ενότητα 3.1.1) κατακρημνίζουμε το DNA προσθέτοντας αιθανόλη 100% σε αναλογία 0,3ml αιθανόλης/1ml TRI Reagent®.
2. Αφήνουμε τα δείγματα για 2 – 3min σε RT και φυγοκεντρούμε για 5min σε 2.000g.
3. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε διάλυμα Sodium citrate 1M σε 10% EtOH σε αναλογία 1ml Sodium citrate/1ml TRI Reagent®. Αναδεύουμε περιστασιακά για 30min σε RT.
4. Φυγοκεντρούμε για 5min σε 2.000g.
5. Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 3 και 4 άλλη μία φορά.
6. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 75% αιθανόλη σε αναλογία 1,5ml αιθανόλης/1ml TRI Reagent®. Αναδεύουμε περιστασιακά για 10 – 20 min σε RT.

7. Φυγοκεντρούμε για 5min σε 2.000g και στους 4°C. Απορρίπτουμε το υπερκείμενο και στεγνώνουμε το ίζημα για 3 – 5min.
8. Επαναδιαλύουμε το ίζημα σε 20μl 8mM NaOH.
9. Αποθηκεύουμε το DNA στους 4°

3.1.4. Έλεγχος φύλου εντόμου

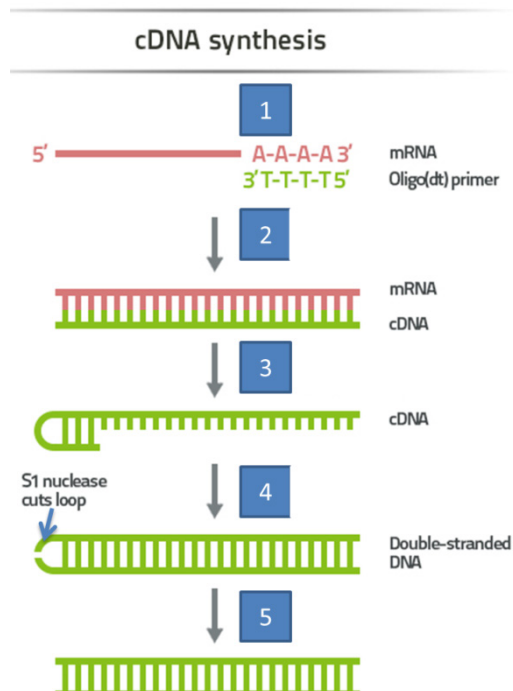
Για τον έλεγχο του φύλου των εντόμων πραγματοποιήσαμε PCR (Πίνακας 8) με τους ειδικούς αρρενοειδικούς εκκινητές sc6626 (Πίνακας 6) οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε άλλη μελέτη του εργαστηρίου μας για το δάκο της ελιάς.

Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Πρόγραμμα PCR		
			T °C	Χρόνος
DNA	Επιθυμητή ποσότητα			
Buffer 10×	1×	Αρχική αποδιάταξη	94	3 min
dNTPs	2,5 mM (έκαστο)	Αποδιάταξη	94	30 sec
Primer Forward	10 pmol/μl	Υβριδοποίηση εκκινητών	55	30 sec
Primer Reverse	10 pmol/μl	Κλωνική επέκταση	72	1:30 min
Taq polymerase	1 unit	Τελική επέκταση	72	5 min
ddH ₂ O	Έως τον τελικό όγκο			
Vτ	Επιθυμητός τελικός όγκος	Κύκλοι PCR	30	

Πίνακας 8. Πρωτόκολλο αντίδρασης PCR.

3.2. Σύνθεση cDNA

Στη μοριακή Βιολογία το complimentary DNA (cDNA) είναι ένα δίκλωνο μόριο DNA που συντίθεται από το ένζυμο αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase), το οποίο χρησιμοποιεί ως εκμαγείο το RNA (πχ. mRNA ή microRNA). Το cDNA συνήθως χρησιμοποιείται για να κλωνοποιήσουμε ευκαρυωτικά γονίδια σε προκαρυωτικά κύτταρα καθώς δεν διαθέτει εσώνια (Croy, 1998) (Εικόνα 20).



Εικόνα 20. Σχηματική απεικόνιση ενός εκ των τρόπων σύνθεσης cDNA με τη χρήση oligo(dt) εκκινητών.

1. Ένας oligo dT εκκινητής συνδέεται στην 3' πολυ(A) ουρά του κάθε mRNA.
 2. Η αντίστροφη μεταγραφάση συνθέτει το cDNA χρησιμοποιώντας το RNA ως εκμαγείο.
 3. Το υβρίδιο cDNA – RNA που προκύπτει υποβάλλεται σε επεξεργασία με αλκαλικό δ/μα ή με RNase και έτσι υδρολύεται το RNA.
 4. Το μονόκλωνο DNA σχηματίζει ένα βρόγχο στο 3' άκρο του ο οποίος χρησιμοποιείται ως εκκινητής για την DNA πολυμεράση που θα συνθέσει τον δεύτερο κλώνο DNA.
- [54]. Μια S1 νουκλεάση θα κόψει τον βρόγχο και έτσι έχουμε το ds cDNA.

1. Επιλέγουμε τα δείγματά RNA που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση του cDNA.
2. Πραγματοποιούμε αντίδραση καθαρισμού με DNase (ενότητα 3.1.2 Πίνακας 5).
3. Προσθέτουμε την επιθυμητή ποσότητα RNA και Mix1 (Πίνακας 9) στο μικροσωληνάριο.
4. Τοποθετούμε στους 65°C για 5min και αμέσως μεταφέρουμε στον πάγο με σκοπό να σταματήσουμε την αντίδραση.
5. Όσο τα δείγματα είναι στον πάγο προσθέτουμε το Mix2 στο μικροσωληνάριο και τοποθετούμε στους 37°C για 2min.
6. Μεταφέρουμε στον πάγο και προσθέτουμε το ένζυμο M-MLV (Invitrogen) (αντίστροφη μεταγραφή).
7. Τοποθετούμε τα δείγματά μας σε κατάλληλο πρόγραμμα σε έναν θερμικό κυκλοποιητή με σκοπό να ολοκληρωθεί η αντίδραση (Πίνακας 9)
8. Αποθηκεύουμε το cDNA στους -20°C.

	Αντιδραστήρια	Ποσότητες	Πρόγραμμα θ. κυκλοποιητή
Mix1	Random Primers 300ng/μl	1μl /αντίδραση	25°C: 10min 37°C: 50min 70°C: 15min
	dNTPs	10mM έκαστο	
	H ₂ O	έως τελικού όγκου	
Mix2	Buffer 5×	4μl	
	DTT 0,1M	2μl	
	RNase inhibitor 40u/μl	1μl	

Πίνακας 9. Πρωτόκολλο αντίδρασης σύνθεσης cDNA.

3.3. Έλεγχος των Housekeeping γονιδίων (HKG)

Για να μπορέσουμε να δημιουργήσουμε τα επιθυμητά προφίλ έκφρασης πρέπει πρώτα να ελέγξουμε με τα κατάλληλα HKG τα cDNA που συνθέσαμε. Ο έλεγχος των HKG πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή qPCR (Πίνακας 4) σε κυκλοποιητή της Bio-Rad® και χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών των HKG που ήταν καταλληλότερα για το κάθε είδος ιστού. Τα ζεύγη αυτά έχουν μελετηθεί και δημοσιευθεί σε προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου μας (Sagri et al., 2017). Ο έλεγχος του κατάλληλου HKG σε κάθε δείγμα, πριν τη δημιουργία του προφίλ έκφρασης, είναι άκρως απαραίτητη. Πρώτον, μας δίνεται η δυνατότητα να ελέγξουμε την ποιότητα και την ποσότητα του cDNA στο δείγμα μας και δεύτερον μας δίνεται η δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε τη σχετική ποσοτικοποίηση για το γονίδιο – στόχο καθώς το HKG λειτουργεί ως το control με βάση το οποίο γίνεται η ποσοτικοποίηση. Συγκεκριμένα στην ανάλυσή μας η τιμή του HKG λαμβάνεται ως το μηδέν και με βάση αυτό γίνεται η σχετική ποσοτικοποίηση των γονιδίων – στόχων.

3.4. Προφίλ έκφρασης

Το τελευταίο στάδιο στην ανάλυσή μας ήταν η δημιουργία του προφίλ έκφρασης των γονιδίων – στόχων. Τα προφίλ έκφρασης πραγματοποιήθηκαν με εφαρμογή qPCR (Πίνακας 4) σε κυκλοποιητή της Bio-Rad® και χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη εκκινητών των οποίων το αποτέλεσμα της βιοπληροφορικής ανάλυσης είχε κάποιο ενδιαφέρον σχετικά με τον σκοπό της εργασίας (Παράρτημα Πίνακας 20).

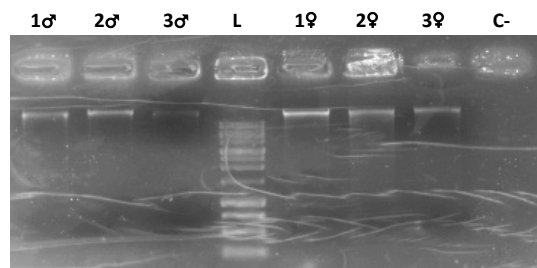
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Επιβεβαίωση αρρενοειδικότητας ικριωμάτων αλληλούχισης

Για την επιβεβαίωση της αρρενοειδικότητας των ικριωμάτων αλληλούχισης είχαμε στη διάθεσή μας είχαμε 85 ζεύγη εκκινητών (βλ. Παράρτημα: Ζεύγη εκκινητών Πίνακας 18). Το καθένα από αυτά σχεδιάστηκε σε ικρίωμα αλληλούχισης, το οποίο, βάση της βιοπληροφορικής ανάλυσης, ανήκε στο χρωμόσωμα Y. Συγκεκριμένα προήλθαν από αλληλούχιση του γονιδιώματος του δάκου και διαχωρισμός των πιθανά αρρενοειδικών αλληλουχιών μέσω ανάλυσης Chromosome Quotient (CQ). Τα ζεύγη αυτά ελέγχθηκαν με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) σε γενωμικό DNA τόσο αρσενικών όσο και θηλυκών ατόμων. Το DNA που χρησιμοποιήθηκε ποσοτικοποιήθηκε με την τεχνολογία Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen) ώστε με την κατάλληλη αραιώση να υπάρχει η ίδια ποσότητα DNA σε κάθε αντίδραση. Για κάποια ζεύγη εκκινητών τα οποία δεν έδωσαν καθαρό αποτέλεσμα με την PCR χρειάστηκε να γίνει επιπλέον quantitative PCR.

1.1. Ποσοτικοποίηση του DNA

Απομονώθηκε DNA από τρία αρσενικά και τρία θηλυκά άτομα δάκου. Μικρή ποσότητα αυτού ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με σκοπό τον έλεγχο της επιτυχούς απομόνωσης (Εικόνα 21). Το DNA που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις PCR ποσοτικοποιήθηκε με τον αναλυτή Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen) χρησιμοποιώντας το Qubit[®] dsDNA BR Assay Kit. Τέλος πραγματοποιήθηκαν αραιώσεις των DNA με τελική συγκέντρωση 40ng/μl.



Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%. ♂: Αρσενικό, ♀: Θηλυκό, C-: Αρνητικό control, L: Δείκτης μεγεθών

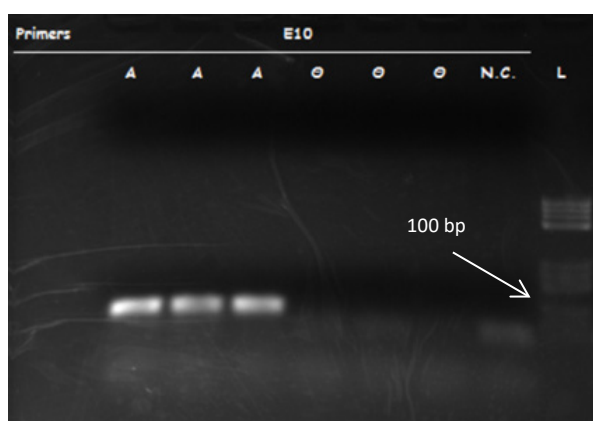
1.2. Επιβεβαίωση με αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Αρχικά και τα 85 ζεύγη εκκινητών ελέγχθηκαν με PCR. Το κάθε ζεύγος ελέγχθηκε σε γενωμικό DNA τριών διαφορετικών αρσενικών και τριών διαφορετικών θηλυκών ατόμων με σκοπό το αποτέλεσμα που θα πάρουμε να είμαστε σίγουροι ότι είναι το ορθό και δεν έχουμε περιπτώσεις ψευδών αποτελεσμάτων. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκε και αρνητικός μάρτυρας για την αποτροπή ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% και οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV).

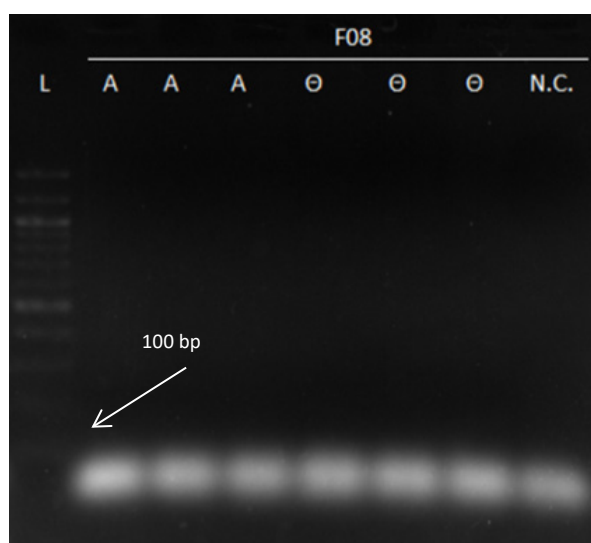
Ο καθορισμός της αρρενοειδικότητας δεν ήταν εύκολος και χρειάστηκε να γίνει βελτιστοποίηση των συνθηκών της PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών. Μόνο με την PCR ήταν δυνατός ο χαρακτηρισμός ως αρρενοειδικών 28 από τα 85 ικρίωματα. Ανάλογα με τα αποτελέσματα, παρά τις όποιες βελτιστοποιήσεις (πχ. αλλαγές θερμοκρασίας υβριδοποίησης, χρήση πολυμεράσης ειδικής για ετεροχρωματίνη), τα ζεύγη εκκινητών κατατάχθηκαν σε τέσσερις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία κατατάχθηκαν αυτά που έδωσαν το επιθυμητό προϊόν μόνο στα αρσενικά και όχι στα θηλυκά (Εικόνα 22). Στη δεύτερη κατηγορία αυτά που δεν έδωσαν προϊόν ούτε στα αρσενικά ούτε στα θηλυκά (Εικόνα 23). Στην τρίτη κατηγορία αυτά που έδωσαν

πολλαπλά διαφορετικά προϊόντα (Εικόνα 24). Τέλος, στην τέταρτη κατηγορία αυτά που έδωσαν τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά το ίδιο προϊόν (Εικόνα 25). Στον Πίνακα 10 παρατίθενται τα ζεύγη των εκκινητών που χαρακτηρίστηκαν ως αρρενοειδικά ενώ στον Πίνακα 11 φαίνονται τα αποτελέσματα από τα υπόλοιπα ζεύγη.

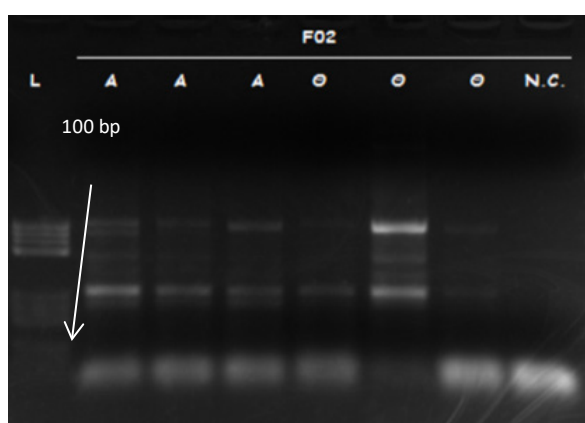
Οκτώ από τα υπόλοιπα 57 ζεύγη εκκινητών, ακόμη και μετά τις βελτιστοποιήσεις στις συνθήκες της PCR, είτε δεν έδιναν καθόλου προϊόντα είτε έδιναν πολλαπλά προϊόντα διαφορετικά από το επιθυμητό. Τα ζεύγη αυτά απορρίφθηκαν από την περαιτέρω ανάλυση με qPCR (Πίνακας 12, σελ. 63).



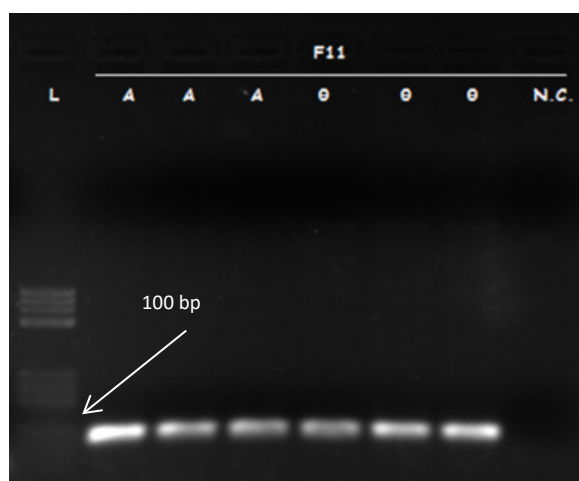
Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1,5% των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών E10. Μέγεθος προϊόντος 102bp. A: Αρσενικό, Θ: θηλυκό, N.C.: Αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας μεγεθών.



Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1,5% των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών F08. Μέγεθος προϊόντος 120bp. Παρατηρούμε την απουσία αυτού του προϊόντος. A: Αρσενικό, Θ: θηλυκό, N.C.: Αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας μεγεθών.



Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1,5% των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών F02. Παρατηρούμε τα πολλαπλά προϊόντα και την απουσία του ειδικού προϊόντος στα 117bp. A: Αρσενικό, Θ: θηλυκό, N.C.: Αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας μεγεθών.



Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1,5% των προϊόντων της PCR με το ζεύγος εκκινητών F11. Μέγεθος προϊόντος 104bp. Παρατηρούμε την ενίσχυση του ίδιου προϊόντος σε αρσενικά και θηλυκά. A: Αρσενικό, Θ: θηλυκό, N.C.: Αρνητικός μάρτυρας, L: μάρτυρας μεγεθών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ		
ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΠΡΟΪΟΝ ΣΕ ♂	ΠΡΟΪΟΝ ΣΕ ♀
B01	ΝΑΙ	ΟΧΙ
B04	ΝΑΙ	ΟΧΙ
B05	ΝΑΙ	ΟΧΙ
B07	ΝΑΙ	ΟΧΙ
B09	ΝΑΙ	ΟΧΙ
B10	ΝΑΙ	ΟΧΙ
B11	ΝΑΙ	ΟΧΙ
C03	ΝΑΙ	ΟΧΙ
D01	ΝΑΙ	ΟΧΙ
D02	ΝΑΙ	ΟΧΙ
D03	ΝΑΙ	ΟΧΙ
D04	ΝΑΙ	ΟΧΙ
D05	ΝΑΙ	ΟΧΙ
D06	ΝΑΙ	ΟΧΙ
D08	ΝΑΙ	ΟΧΙ
D11	ΝΑΙ	ΟΧΙ
D12	ΝΑΙ	ΟΧΙ
E01	ΝΑΙ	ΟΧΙ
E06	ΝΑΙ	ΟΧΙ
E10	ΝΑΙ	ΟΧΙ
E11	ΝΑΙ	ΟΧΙ
E12	ΝΑΙ	ΟΧΙ
G02	ΝΑΙ	ΟΧΙ
G03	ΝΑΙ	ΟΧΙ
G06	ΝΑΙ	ΟΧΙ
H07	ΝΑΙ	ΟΧΙ
H08	ΝΑΙ	ΟΧΙ
H10	ΝΑΙ	ΟΧΙ

Πίνακας 10. Ζεύγη εκκινήτων που χαρακτηρίστηκαν ως αρρενοειδικά με PCR ανάλυση

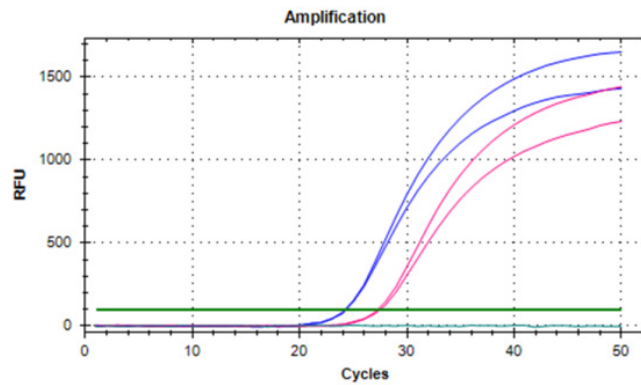
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ					
ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΠΡΟΪΟΝ ΣΕ ♂	ΠΡΟΪΟΝ ΣΕ ♀	ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΠΡΟΪΟΝ ΣΕ ♂	ΠΡΟΪΟΝ ΣΕ ♀
A12	ΝΑΙ	ΝΑΙ	F03	ΝΑΙ	ΝΑΙ
B02	ΝΑΙ	ΝΑΙ	F04	ΝΑΙ	ΝΑΙ
B03	ΝΑΙ	ΝΑΙ	F05	ΝΑΙ	ΝΑΙ
B06	ΝΑΙ	ΝΑΙ	F06	ΝΑΙ	ΝΑΙ
B08	ΝΑΙ	ΝΑΙ	F07	ΝΑΙ	ΝΑΙ
B12	ΝΑΙ	ΟΧΙ	F08	ΟΧΙ	ΟΧΙ
C01	ΟΧΙ	ΟΧΙ	F09	ΝΑΙ	ΝΑΙ
C02	ΝΑΙ	ΝΑΙ	F10	ΝΑΙ	ΝΑΙ
C04	ΝΑΙ	ΝΑΙ	F11	ΝΑΙ	ΝΑΙ
C05	ΝΑΙ	ΝΑΙ	F12	ΝΑΙ	ΝΑΙ
C06	ΝΑΙ	ΝΑΙ	G01	ΟΧΙ	ΟΧΙ
C07	ΝΑΙ	ΝΑΙ	G04	ΝΑΙ	ΝΑΙ
C08	ΝΑΙ	ΝΑΙ	G05	ΟΧΙ	ΟΧΙ
C09	ΝΑΙ	ΝΑΙ	G07	ΟΧΙ	ΟΧΙ
C10	ΝΑΙ	ΝΑΙ	G08	ΝΑΙ	ΝΑΙ
C11	ΝΑΙ	ΝΑΙ	G09	ΝΑΙ	ΟΧΙ
C12	ΝΑΙ	ΝΑΙ	G10	ΟΧΙ	ΟΧΙ
D07	ΝΑΙ	ΝΑΙ	G11	ΝΑΙ	ΝΑΙ
D09	ΝΑΙ	ΝΑΙ	G12	ΟΧΙ	ΟΧΙ
D10	ΝΑΙ	ΝΑΙ	H01	ΝΑΙ	ΝΑΙ
E02	ΝΑΙ	ΟΧΙ	H02	ΝΑΙ	ΝΑΙ
E03	ΝΑΙ	ΝΑΙ	H03	ΟΧΙ	ΟΧΙ
E04	ΝΑΙ	ΝΑΙ	H04	ΝΑΙ	ΝΑΙ
E05	ΝΑΙ	ΝΑΙ	H05	ΝΑΙ	ΝΑΙ
E07	ΝΑΙ	ΝΑΙ	H06	ΝΑΙ	ΝΑΙ
E08	ΟΧΙ	ΟΧΙ	H09	ΝΑΙ	ΝΑΙ
E09	ΝΑΙ	ΝΑΙ	H11	ΟΧΙ	ΟΧΙ
F01	ΝΑΙ	ΝΑΙ	H12	ΝΑΙ	ΝΑΙ
F02	ΝΑΙ	ΝΑΙ			

Πίνακας 11. Ζεύγη εκκινήτων που δεν ήταν επιτυχής ο χαρακτηρισμός ως αρρενοειδικά με PCR ανάλυση.

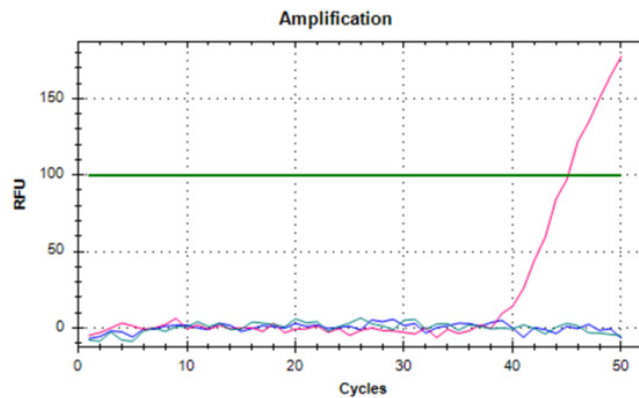
1.3. Με quantitative PCR (qPCR)

Συγκεκριμένα με qPCR ελέγχθηκαν τα ζεύγη των εκκινητών τα οποία έδιναν το προϊόν τόσο στα αρσενικά όσο και στα θηλυκά άτομα. Με την qPCR μπορούμε να ανιχνεύσουμε την πιθανή διαφορά στα αντίγραφα της συγκεκριμένης αλληλουχίας ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά. Αν, για παράδειγμα, μια αλληλουχία έχει μετατοπιστεί από κάποιο άλλο χρωμόσωμα στο Y των αρσενικών τότε τα αρσενικά θα έχουν ένα επιπλέον αντίγραφο. Έτσι ενώ η ποιοτική PCR, η οποία μας δείχνει το τελικό προϊόν της αντίδρασης, δείχνει ενίσχυση τόσο σε αρσενικά όσο και σε θηλυκά, η qPCR θα δείξει σε ποιον από τους δύο ιστούς υπάρχει επιπλέον αντίγραφο της αλληλουχίας που ενισχύεται. Δεδομένης της χρησιμοποίησης ίσης ποσότητας γενωμικού DNA για αρσενικά και θηλυκά δείγματα η όποια διαφορά στον χρόνο εμφάνισης του προϊόντος θα οφείλεται στη διαφορά αντιγράφων ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά.

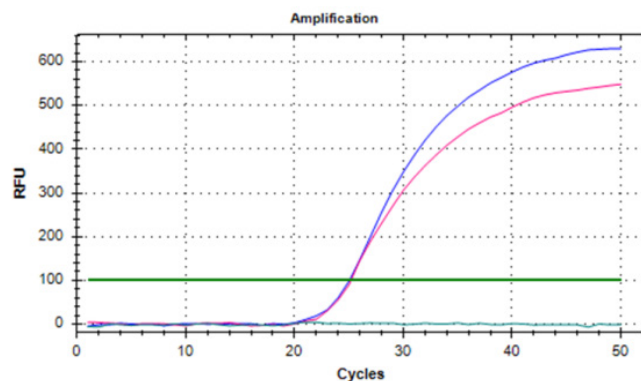
Ανάλογα με το αποτέλεσμα τους, τα 57 αυτά ζεύγη εκκινητών κατατάχθηκαν σε τρεις κατηγορίες. Στην πρώτη κατηγορία κατατάχθηκαν τα ζεύγη τα οποία έδωσαν σημαντική διαφορά στους κύκλους εμφάνισης (C_q) σε αρσενικά και θηλυκά και εμφάνιση του προϊόντος πρώτα στα αρσενικά (Εικόνα 26). Στην δεύτερη κατηγορία κατατάχθηκαν τα ζεύγη τα οποία έδωσαν μεν σημαντική διαφορά στους κύκλους εμφάνισης σε αρσενικά και θηλυκά, αλλά εμφάνιση του προϊόντος πρώτα στα θηλυκά (Εικόνα 27). Τέλος, στην τρίτη κατηγορία κατατάχθηκαν τα ζεύγη τα οποία έδωσαν προϊόν τόσο σε θηλυκά όσο και σε αρσενικά άτομα χωρίς σημαντική διαφορά στους κύκλους εμφάνισης (Εικόνα 28). Οι εκκινητές της πρώτης κατηγορίας χαρακτηρίστηκαν ως αρρενοειδικοί, της δεύτερης ως θηλυκοειδικοί και της τρίτης ως μη αρρενοειδικοί (Πίνακας 13, σελ. 63). Για να θεωρηθεί σημαντική η διαφορά στους κύκλους ορίσαμε ως όριο το $\Delta C_q = -3$ ($\Delta C_q = C_{q\sigma} - C_{q\phi}$). Όταν το $\Delta C_q > -3$ τότε θεωρούνταν ότι δεν υπήρχε διαφορά στον αριθμό των αντιγράφων. Όταν το $\Delta C_q < -3$ τότε θεωρούνταν ότι υπήρχε επιπλέον αντίγραφο στα αρσενικά. Εντοπίστηκαν δύο περιπτώσεις θηλυκοειδικής αλληλουχίας. Στην πρώτη περίπτωση (ζεύγος B03) το C_q των αρσενικών ήταν ίσο με το μηδέν και των θηλυκών 45,12. Στη δεύτερη περίπτωση (ζεύγος B06) το προϊόν υπήρχε και στα αρσενικά και στα θηλυκά όμως εμφανίστηκε πρώτο στα θηλυκά.



Εικόνα 28. Αποτέλεσμα qPCR για το ζεύγος εκκινητών C7. Στο αρσενικό DNA υπάρχει τουλάχιστον ένα επιπλέον αντίγραφο της εν λόγω αλληλουχίας με $\Delta Cq = -3$. Μπλε: αρσενικό γενωμικό DNA, Ροζ: θηλυκό γενωμικό DNA, Τηρκουάζ: αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 28. Αποτέλεσμα qPCR για το ζεύγος εκκινητών B3. Η εν λόγω αλληλουχία υπάρχει μόνο στα θηλυκά άτομα. Μπλε: αρσενικό γενωμικό DNA, Ροζ: θηλυκό γενωμικό DNA, Τηρκουάζ: αρνητικός μάρτυρας.



Εικόνα 28. Αποτέλεσμα qPCR για το ζεύγος εκκινητών D10. Ίδιος αριθμός αντιγράφων σε αρσενικά και θηλυκά με $\Delta Cq = +0,14$. Μπλε: αρσενικό γενωμικό DNA, Ροζ: θηλυκό γενωμικό DNA, Τηρκουάζ: αρνητικός μάρτυρας.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ
C01
C09
C12
D07
E08
F02
G07
H11

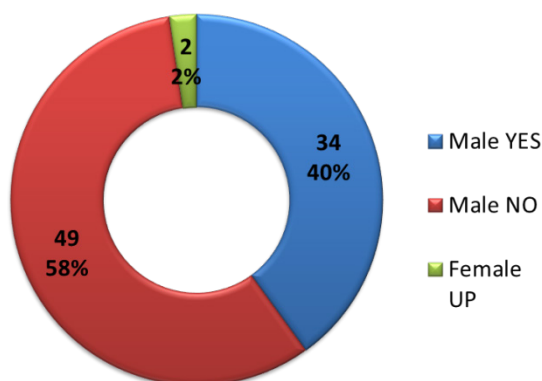
Πίνακας 12. Ζεύγη εκκινήτων τα οποία αποκλείστηκαν από την ανάλυση με qPCR.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΕΛΕΓΧΟΥ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ qPCR			
ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
C05	ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	F07	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
C07	ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	F08	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
C08	ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	F09	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
C11	ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	F11	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
F10	ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	F12	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
H06	ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	G01	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
B03	ΘΗΛΥΚΟΕΙΔΙΚΟ	G04	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
B06	ΘΗΛΥΚΟΕΙΔΙΚΟ	G05	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
A12	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	G08	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
B02	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	G09	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
B08	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	G10	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
B12	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	G11	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
C02	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	G12	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
C04	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	H01	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
C06	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	H02	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
C10	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	H03	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
D09	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	H04	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
D10	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	H05	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
E02	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	H09	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
E03	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ	H12	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ
E04	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ		
E05	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ		
E07	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ		
E09	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ		
F01	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ		
F03	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ		
F04	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ		
F05	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ		
F06	ΜΗ ΑΡΡΕΝΟΕΙΔΙΚΟ		

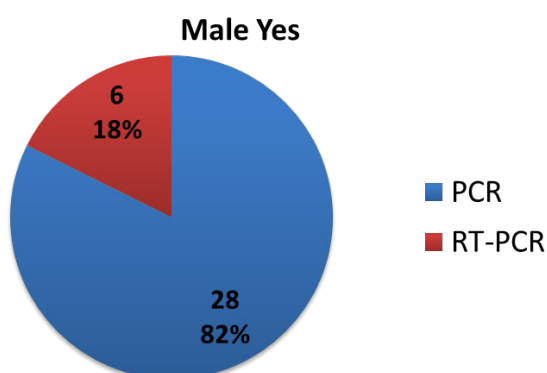
Πίνακας 13. Ζεύγη εκκινήτων των οποίων ο χαρακτηρισμός ως αρρνεοειδικά ή μη αρρνεοειδικά έγινε με qPCR ανάλυση.

1.4. Συνολικά αποτελέσματα

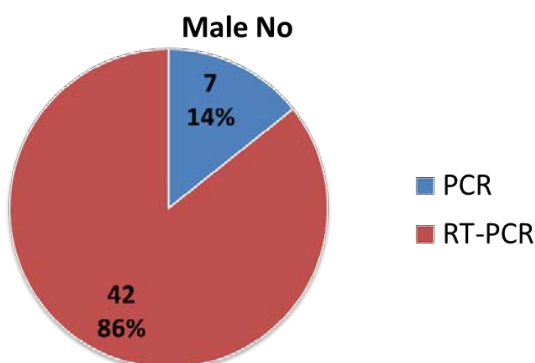
Στις εικόνες 29 έως 31 φαίνονται οι ποσοστιαίες αναλογίες των αποτελεσμάτων του ελέγχου της αρρενοειδικότητας των ικριωμάτων αλληλούχισης. Τα ικριώματα χαρακτηρίστηκαν ως αρρενοειδικά (Male Yes), ως μη αρρενοειδικά (Male No) και ως θηλυκοειδικά (Female UP).



Εικόνα 29. Συνολικά αποτελέσματα ανάλυσης. Male YES: αρρενοειδικές αλληλουχίες, Male NO: μη αρρενοειδικές αλληλουχίες, Female UP: θηλυκοειδικές



Εικόνα 30. Ποσοστά αρρενοειδικών αλληλουχιών που χαρακτηρίστηκαν μόνο με PCR ή απαιτήθηκε και επιπλέον ανάλυση με real-time qPCR.



Εικόνα 31. Ποσοστά μη αρρενοειδικών αλληλουχιών που χαρακτηρίστηκαν μόνο με PCR ή απαιτήθηκε και επιπλέον ανάλυση με real-time qPCR.

2. Βιοπληροφορική ανάλυση ικριωμάτων αλληλούχισης

Οι 34 αλληλουχίες που χαρακτηρίστηκαν ως αρρενοειδικές και συνεπώς βρίσκονται μόνο στο Y υποβλήθηκαν σε επιπλέον βιοπληροφορική ανάλυση με σκοπό την ανίχνευση πιθανών γονιδίων. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα OMIGA®, Blastn/x, tBlastx (NCBI) καθώς και το διαδικτυακό πρόγραμμα πρόβλεψης πρωτεϊνικών δομών InterProScan® της πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων InterPro.

Με το πρόγραμμα OMIGA® έγινε ανάλυση των περιοχών που είχαν σχεδιαστεί οι εκκινήτες για πιθανά ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια τα οποία θα υποδείκνυαν την ύπαρξη κάποιου γονιδίου. Στη συνέχεια έγινε αντιπαραβολή των αλληλουχιών με τις νουκλεοτιδικές βάσεις δεδομένων Insecta (taxid:50557), Tephritidae (taxid:7211) και *Bactrocera oleae* (taxid:104688). Χρησιμοποιήθηκαν οι προϋπάρχουσες ρυθμίσεις των αλγόριθμων Blast και έγιναν αποδεκτά αποτελέσματα με e-value <0,001. Επιπλέον, στην περίπτωση του Blastn, έγινε χρήση τόσο του Megablast για ανίχνευση αλληλουχιών υψηλής ομοιότητας, όσο και του απλού blastn για ανίχνευση σχετικά όμοιων αλληλουχιών.

Στις όποιες περιπτώσεις ένας από τους αλγόριθμους του Blast υποδείκνυε κάποια ομοιότητα με το mRNA ενός πιθανού γονιδίου (τα γονίδια αυτά χαρακτηρίζονται από το NCBI ως PREDICTED), πραγματοποιήθηκε επιπλέον σύγκριση της δικής μας αλληλουχίας με αυτή του γονιδίου της βάσης δεδομένων. Υπήρχαν περιπτώσεις όπου η αλληλουχία επερώτησης, δηλαδή η δική μας αλληλουχία, είχε ομοιότητα με τα 5' και 3' αμετάφραστα άκρα του mRNA της βάσης δεδομένων. Υπήρχαν όμως και περιπτώσεις στις οποίες η αλληλουχία επερώτησης έβρισκε ομοιότητα με την κωδική αλληλουχία του mRNA του πιθανού γονιδίου στη βάση δεδομένων. Σε αυτές τις περιπτώσεις ελέγχσαμε την πρωτεϊνική αλληλουχία του PREDICTED γονιδίου στο διαδικτυακό πρόγραμμα πρόβλεψης πρωτεϊνικών δομών της πρωτεϊνικής βάσης δεδομένων InterPro, με σκοπό να δούμε σε τι αντιστοιχεί η ομόλογη με την αλληλουχία μας περιοχή. Σημειώνουμε εδώ ότι τα PREDICTED είναι γονίδια τα οποία έχουν προκύψει από αυτόματη ανάγνωση των αλληλουχιών των mRNA από το NCBI και επακόλουθη ανίχνευση του μεγαλύτερου ανοικτού αναγνωστικού πλαισίου. Επομένως δεν είναι προϊόντα ακρίβειας και είναι θεωρητικά, εξ' ου και ο χαρακτηρισμός PREDICTED.

Τέλος έγινε αντιπαραβολή όλων των αλληλουχιών με τα δεδομένα του RNAseq του δάκου της ελιάς στη βάση δεδομένων Apollo i5k με σκοπό την ταυτοποίηση αυτών που είναι των μεταγραφικά ενεργών (Πίνακας 15). Στον Πίνακα 14 παρατίθενται συνοπτικά τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης, ενώ στο παράρτημα παρατίθενται αναλυτικότερα.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΒΙΟΠΛΗΡΟΦΟΡΙΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ					
ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΠΙΘΑΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ/ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ	ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΠΡΟΒΛΕΨΗ ΠΙΘΑΝΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ/ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΔΟΜΗΣ	ΣΗΜΕΙΩΣΕΙΣ
B1	Bo specific	Όχι ομολογίες με άλλες αλληλουχίες στο blast, πιθανή ειδική αλληλουχία του Δάκου	D6	Importin 4	
B4	Bo specific		D8	Bo specific	
B5	ncRNA		D11	Bo specific	
B7	mRNA 5' end		D12	Jokey retrotransposon	Ρετροτρανσποζόνιο
B9	D. mel Y Chromosome		E1	DNA binding (transcription factor)	Ομολογία με δομή πρόσδεσης στο DNA. Πιθανώς μεταγραφικός παράγοντας
B10	Bo specific		E6	Importin 4	
B11	Transposon	Τρανσποζόνιο	E10	Bo specific	
C3	uncharacterized protein	Ομολογία με πιθανές και αχαρακτήριστες πρωτεΐνες	E11	Importin 4	
C5	Bo specific		E12	Bo specific	
C7	DNA helicase/binding	Δομή ελικάσης ή πρωτεΐνης που συνδέεται στο DNA	F10	Bo specific	
C8	Importin4	Ιμπορτίνη 4	G2	Bo specific	
C11	Bo specific		G3	Achilles transposon	Τρανσποζόνιο Αχιλλέας
D1	PIF1-like helicase	Ελικάση ή δομή μεγαλύτερης πρωτεΐνης που ζετυλιγεί και DNA	G6	Tamozhenic	Ρυθμιστής εισόδου πρωτεϊνών στον πυρήνα
D2	ncRNA	Ομολογία με ncRNAs	H6	Bo specific	
D3	Bo specific		H7	ncRNA/transposon	ncRNA και τρανσποζόνιο
D4	Achilles transposon	Τρανσποζόνιο Αχιλλέας	H8	Bo specific	
D5	Importin 4	(residues 137-187)	H10	Bo specific	

Πίνακας 14. Αποτελέσματα Βιοπληροφορικής ανάλυσης και των 34 αρρενοειδικών εκκινήτων. Παρατηρούμε μια πληθώρα αποτελεσμάτων η οποία συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία η οποία αναφέρεται σε χαμηλό ποσοστό γονιδίων και υψηλό ποσοστό μεταθετών στοιχείων και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΠΑΡΑΒΟΛΗΣ ΜΕ RNAseq ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ			
ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ	ΚΩΔΙΚΟΣ ΖΕΥΓΟΥΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
B1	Testes	D6	Testes, Egg, Testes AM, Larvae, Pupae, Testes & MAGs
B4	μη αντιστοιχία	D8	μη αντιστοιχία
B5	χωρίς έκφραση	D11	μη αντιστοιχία
B7	χωρίς έκφραση	D12	Egg males, Pupae
B9	μη αντιστοιχία	E1	Testis, Male heads, Larvae, Pupae, Testes & MAGs, Female heads/ ovipositors, mixed Male/Female thorax
B10	μη αντιστοιχία	E6	Testes, Testes AM, Testes & MAGs
B11	Male heads, Mixed stages eggs	E10	Testes AM
C3	Egg Male	E11	Testes, Testes AM, Testes & MAGs
C5	μη αντιστοιχία	E12	μη αντιστοιχία
C7	Adult Testes, Testes AM, Testes & MAGs	F10	χωρίς έκφραση
C8	Testes AM, Testes & MAGs	G2	χωρίς έκφραση
C11	χωρίς έκφραση	G3	μη αντιστοιχία
D1	χωρίς έκφραση	G6	Egg male
D2	Egg Male, Female heads mated to males exposed to pinene, Testes & MAGs	H6	χωρίς έκφραση
D3	χωρίς έκφραση	H7	μη αντιστοιχία
D4	χωρίς έκφραση	H8	χωρίς έκφραση
D5	Testes, Testes AM, Testes & MAGs	H10	μη αντιστοιχία

Πίνακας 15. Αποτελέσματα αντιπαραβολής των περιοχών που ενισχύσαμε με τα δεδομένα RNAseq του δάκου της ελιάς στη βάση δεδομένων Apollo (i5k). Παρατηρούμε ότι για τις περισσότερες από τις αλληλουχίες φαίνεται να εκφράζονται κυρίως σε όρχεις (Testes) και βοηθητικούς αδένες (Male accessory Glans) των αρσενικών. Στις περιπτώσεις όπου αναγράφεται «μη αντιστοιχία» οφείλεται στο γεγονός ότι οι αλληλουχίες που αναλύσαμε ήταν από τα τελευταία δεδομένα αλληλούχισης τα οποία δεν είχαν ακόμη κατατεθεί στη βάση δεδομένων. AM: After Mating, MAGs: Male Accessory Glans, Egg: αυγό, Larvae: προνύμφη, Pupae: νύμφη

Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης έδειξαν μια πληθώρα μεταθετών στοιχείων και αλληλουχιών χωρίς κάποια λειτουργία στο γονιδίωμα, ενώ αντίθετα, παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό γονιδίων. Επιπλέον από τη σύγκριση με το RNAseq φάνηκε ότι τα πιθανά γονίδια, τα οποία υπήρχαν, είχαν μεταξύ άλλων, ως επί το πλείστον, έκφραση στους όρχεις (Testes) και στους βοηθητικούς αδένες των αρσενικών (Male Accessory Glans). Αυτή η πιθανή έκφραση συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία η οποία υποδεικνύει τα γονίδια του Y να έχουν ρόλο στη γονιμότητα του αρσενικού με αποτέλεσμα να εκφράζονται, κυρίως, στα γενετικά όργανα του αρσενικού.

3. Δημιουργία προφίλ έκφρασης των πιθανών γονιδίων

Μετά την βιοπληροφορική ανάλυση έγινε επιλογή 6 ζευγών εκκινητών (Πίνακας 16) με σκοπό τον έλεγχο της πιθανής τους έκφρασης στο δάκο. Έγινε απομόνωση ιστών, σύνθεση cDNA από διάφορα στάδια ζωής του εντόμου, έλεγχος της λειτουργίας του cDNA με Housekeeping γονίδια και τέλος real-time PCR με τα επιλεγμένα ζεύγη εκκινητών. Τα ζεύγη εκκινητών που επιλέχθηκαν ήταν, είτε πιθανά γονίδια μεταγραφικών παραγόντων (C7, D1, E1),

ΖΕΥΓΗ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ
B5
C7
D1
D2
E1
G6

Πίνακας 16. Ζεύγη εκκινητών που επιλέχθηκαν για τη δημιουργία προφίλ έκφρασης.

είτε μη κωδικοποιητικά mRNA (B5, D2), είτε γονίδια με πιθανή συσχέτιση με τον παράγοντα αρρενοποίησης του δάκου (G6).

3.1. Απομόνωση ιστών και σύνθεση cDNA

Πραγματοποιήθηκε επιλογή ιστών από όλα τα στάδια της ανάπτυξης του δάκου της ελιάς (Πίνακας 17). Αρχικά οι ιστοί προστέθηκαν στο αντιδραστήριο Extrazol[®] με σκοπό την ταυτόχρονη απομόνωση DNA και RNA. Στα αυγά (eggs), στις προνύμφες (larvae), και στις νύμφες (pupae) ήταν απαραίτητη και η απομόνωση DNA με σκοπό την ταυτοποίηση του φύλου. Η ταυτοποίηση έγινε με PCR με το ζεύγος εκκινητών sc6626 και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (Εικόνα 32). Από το RNA που απομονώθηκε συντέθηκε cDNA με το kit Prime Script RT[®] (Takara).

3.2. Έλεγχος cDNA μέσω real time PCR Housekeeping γονιδίων

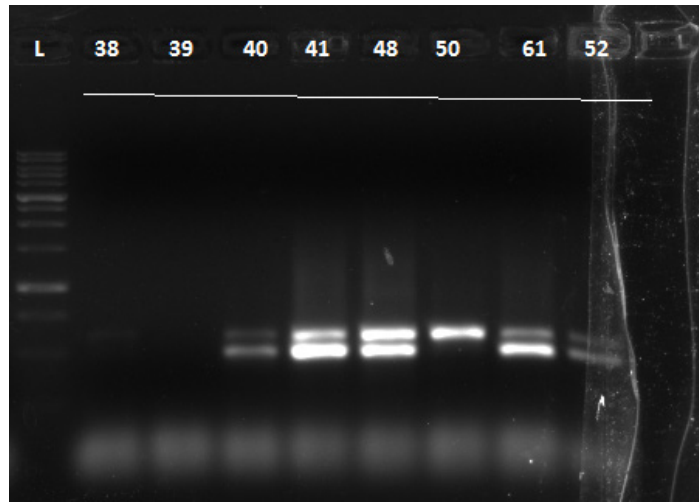
Το cDNA ελέγχθηκε τόσο για την ποσότητά του όσο και για την λειτουργικότητά του μέσω real-time PCR με Housekeeping γονίδια (HKG). Για κάθε ιστό χρησιμοποιήθηκε και κατάλληλο HKG, με βάση προηγούμενη εργασία του εργαστηρίου (Sagri et al., 2017). Όλα τα cDNA που είχαμε στη διάθεσή μας είχαν αφενός ικανοποιητική συγκέντρωση και αφετέρου ήταν πλήρως λειτουργικά (Εικόνα 33).

3.3. Προφίλ έκφρασης

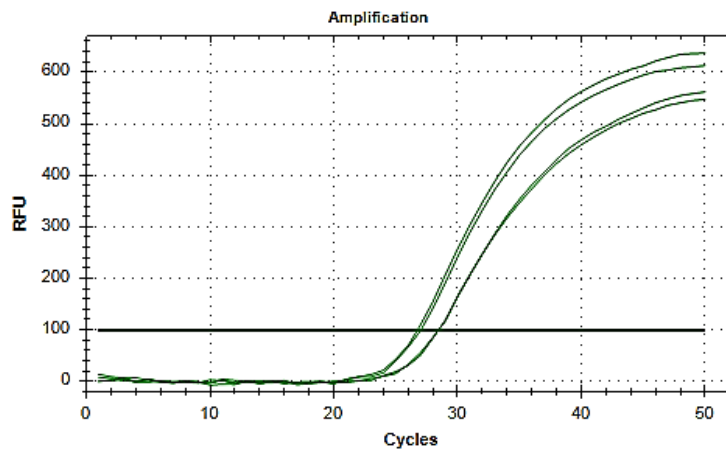
Μετά τον έλεγχο του cDNA ακολούθησε η δημιουργία των προφίλ έκφρασης. Δυστυχώς κανένα από τα 6 ζεύγη εκκινητών που επιλέχθηκαν δεν έδωσε κάποιο αποτέλεσμα. Αυτό μπορεί να συνέβη για διάφορους λόγους. Είτε διότι η περιοχή εκείνη δεν μεταγράφεται, είτε διότι το ζεύγος των εκκινητών δεν ήταν το κατάλληλο, είτε η συγκεκριμένη αλληλουχία δεν μεταγράφεται σε κάποιο από τα στάδια ανάπτυξης από τα οποία απομονώσαμε ιστούς.

ΣΤΑΔΙΑ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ
Testes & MAGs:
0-day male adult
3-day male adult
7-day_Before Mating male adult
7-day_After Mating male adult
9-day_After Mating male adult
Eggs-larvae-pupae
1-hour eggs
15-hours eggs
48-hours eggs
1nd stage larvae
3rd stage larvae
1-day pupae
3-days pupae

Πίνακας 17. Στάδια ανάπτυξης του δάκου της ελιάς από τα οποία έγινε απομόνωση ιστών με σκοπό την σύνθεση cDNA.



Εικόνα 32. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης 1% των προϊόντων της PCR για τον έλεγχο του φύλου με το ζεύγος εκκινητών sc6626. Με δύο ζώνες είναι τα αρσενικά και με μια ζώνη είναι τα θηλυκά άτομα. L: μάρτυρας μοριακών μεγεθών, 38-52: κωδικοί ιστών.



Εικόνα 33. Real time PCR του HKG RPL19. Το Cq και των δύο δειγμάτων είναι πριν τους 30 κύκλους κάτι το οποίο αποδεικνύει τόσο την ύπαρξη καλής συγκέντρωσης cDNA όσο και τη λειτουργικότητά του.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ταυτοποίηση αρρενοειδικών αλληλουχιών

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αναλύθηκαν 85 ικρίωματα αλληλούχησης που χαρακτηρίστηκαν μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης και της μεθόδου Chromosome Quotient (CQ) (Hall et al., 2013a) ως αρρενοειδικά. Αρχικά έγινε επιβεβαίωση της αρρενοειδικότητας τους μέσω ανάλυσης PCR δειγμάτων DNA από αρσενικά και θηλυκά έντομα. Από την ανάλυση αυτή επιβεβαιώθηκε η αρρενοειδικότητα των 34 από τα 85 ικρίωματα.

Στη συνέχεια ακολούθησε βιοπληροφορική ανάλυση των 34 αλληλουχιών για την ταυτοποίηση γονιδίων που πιθανώς έφεραν. Η ανάλυση των γονιδίων ανέδειξε γονίδια με ελάχιστα μεγάλα ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια, μεταθετά στοιχεία, ncRNA, και γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μεταφορείς, όπως για παράδειγμα Importin4, και πιθανούς μεταγραφικούς παράγοντες.

Τέλος, έγινε προσπάθεια για τη δημιουργία προφίλ έκφρασης 6 επιλεγμένων γενετικών τόπων. Αρχικά πραγματοποιήθηκε αντιπαραβολή των των τμημάτων DNA που ενισχύουν τα εν λόγω ζεύγη εκκινητών με τα δεδομένα του RNAseq του δάκου της ελιάς. Μέσω της αντιπαραβολής είδαμε ότι τα 5 από τα 6 ζεύγη εκκινητών των γενετικών τόπων που επιλέχθηκαν δεν είχαν σχεδιαστεί σε μεταγραφόμενες περιοχές. Επιπλέον το έκτο ζεύγος κατά τη διαδικασία της real-time PCR δημιουργούσε διμερή εκκινητών που δεν επέτρεπαν την σωστή ενίσχυση της περιοχής. Θα πρέπει να γίνει εκ νέου σχεδιασμός αυτών των ζευγών εκκινητών σε περιοχές που είναι μεταγραφόμενες ώστε να γίνουν τα προφίλ έκφρασης.

Από τις 85 αρρενοειδικές αλληλουχίες, που μας υπέδειξε η Βιοπληροφορική ανάλυση, μόνο οι 34 επιβεβαιώθηκαν με την πειραματική μας προσέγγιση. Το χαμηλό αυτό ποσοστό μπορεί να οφείλεται τόσο σε πιθανό σφάλμα της προσέγγισής μας, όσο και στην ύπαρξη αυτοσωμικών ομολόγων περιοχών. Από τη μια, η τεχνολογία CQ, όπως και κάθε άλλη τεχνική, λειτουργεί με την πιθανότητα ύπαρξης σφάλματος στα αποτελέσματά της. Οι συνθήκες και οι παράμετροι που ορίζονται κάθε φορά στον αλγόριθμο με σκοπό να πραγματοποιήσει τον διαχωρισμό εγκυμονούν πάντα την πιθανότητα των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Αν παρατηρήσουμε τα διαγράμματα της μεθόδου θα δούμε ότι οι λόγοι δεν είναι απόλυτοι αλλά περιλαμβάνουν ένα φάσμα τιμών. Από την άλλη, όπως αναφέρθηκε εκτενώς στην Εισαγωγή, είναι συχνό φαινόμενο η συσσώρευση στο Y χρωμόσωμα αλληλουχιών από τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα ύστερα από διπλασιασμό των τελευταίων (Mahajan & Bachtrog, 2017). Επιπλέον, σε αρκετές περιπτώσεις εντόμων το Y χρωμόσωμα μπορεί να είναι διαφορετικό του αρχαίου Y του προγονικού οργανισμού και μπορεί να έχει προέλθει από ένα αυτόσωμα το οποίο κάποια στιγμή συντήχθηκε με το αρχαίο Y. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχουν περιοχές που έχουν δύο αντίγραφα στο αυτοσωμικό χρωμόσωμα και ένα αντίγραφο τους στο νέο-Y χρωμόσωμα (Mahajan & Bachtrog, 2017).

Το περιεχόμενο του Y χρωμοσώματος στο δάκο

Μέσω της ανάλυσης των 34 επιβεβαιωμένων αρρενοειδικών περιοχών σκιαγραφήθηκε, εν μέρει, το περιεχόμενο του Y χρωμοσώματος του δάκου. Αρχικά, τα ανοικτά αναγνωστικά πλαίσια μεγάλου μήκους ήταν ελάχιστα. Η απουσία τέτοιων μεγάλων ανοικτών αναγνωστικών πλαισίων μπορεί να οφείλεται είτε σε λάθη κατά την αλληλούχηση που έχουν ως αποτέλεσμα την εισαγωγή κωδικονίων λήξης, είτε στην ύπαρξη πιθανού ιντρονίου στην περιοχή που αναλύεται, αν λάβουμε υπ' όψιν ότι τα ιντρόνια στο Y χρωμόσωμα είναι συνήθως μεγάλα (Comeron & Kreitman, 2000) και μπορούν να φτάσουν σε μέγεθος ακόμη και τη 1Mb (Reugels, et al., 2000). Επίσης μπορεί να οφείλεται στην πιθανότητα η εν λόγω περιοχή απλώς να μην

μεταγράφεται. Επιπλέον, τα μικρά αναγνωστικά πλαίσια μπορεί να κωδικοποιούν μικρά πεπτίδια, non coding RNA και μικρά ρυθμιστικά στοιχεία (Bazzini et al., 2014). Το γεγονός ότι τα RNAseq δεδομένα που αντιστοιχούσαν στις αλληλουχίες μας προέρχονταν κυρίως από αρσενικούς ιστούς και ιστούς του αναπαραγωγικού συστήματος συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία η οποία αναφέρει πως τα γονίδια του Y χρωμοσώματος έχουν συνήθως σχέση με την ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος των αρσενικών, τη σπερματική λειτουργία και γενικότερα την γονιμότητα του αρσενικού εντόμου (Carvalho et al., 2001), (Hall et al., 2016), (Sharma et al., 2017), (Mahajan & Bachtrog, 2017). Τέλος, από την ανάλυση μέσω των εργαλείων του Blast[®] (blastn, blastx, tblastx) έγινε ταυτοποίηση μεταθετών στοιχείων, μη κωδικοποιούμενων RNA, ειδικών περιοχών για τον δάκο της ελιάς αλλά και μικρό ποσοστό γονιδίων. Το χαρακτηριστικό αυτών των γονιδίων ήταν ύπαρξη σε αυτά δομών οι οποίες είτε αναγνώριζαν αλληλουχίες DNA είτε λειτουργούν ως πιθανοί μεταγραφικοί παράγοντες κάτι το οποίο συμβαδίζει με τη βιβλιογραφία για το περιεχόμενο του Y σε άλλα είδη εντόμων όπως τα *Aedes aegypti* (Hall et al., 2016), *Anopheles gambiae* (Krzywinska et al., 2016), *Musca domestica* (Sharma et al., 2017) και *Drosophila melanogaster* (Koerich et al., 2008). Στα έντομα αυτά έχουν χαρακτηριστεί και γονίδια τα οποία είτε παίζουν ρόλο στη γονιμότητα είτε παίζουν ρόλο στον φυλοκαθορισμό. Για παράδειγμα, στη *D. melanogaster* (Koerich et al., 2008), μεταξύ των γονιδίων που έχουν βρεθεί στο Y βρίσκονται και γονίδια όπως τα *Mst77F*, *kll-3*, *ks1-2*. Όταν τα γονίδια αυτά απουσιάζουν από το γονιδίωμα ή είναι μη λειτουργικά, τότε προκύπτουν αρσενικά έντομα τα οποία είναι στείρα, γεγονός που υποστηρίζει ότι τα γονίδια αυτά σχετίζονται άμεσα με την γονιμότητα του εντόμου. Τα γονίδια που σχετίζονται με τον φυλοκαθορισμό είναι συνήθως πρωτεΐνες που σχετίζονται με το μάτισμα πρώιμων μεταγράφων γονιδίων. Για παράδειγμα στη *Musca domestica* (Sharma et al., 2017) και στο *Anopheles gambiae* (Krzywinska et al., 2016) τα γονίδια *Mdmd* και *Yob* αντίστοιχα φέρεται να επηρεάζουν το μάτισμα των μεταγράφων των γονιδίων *tra* και *dsx* αντίστοιχα.

Η προοπτική

Το Y είναι ένα χρωμόσωμα με μεγάλο εξελικτικό, και όχι μόνο, ενδιαφέρον το οποίο όμως είναι δύσκολο στην μελέτη του. Η δυσκολία αυτή πηγάζει από πολλούς και διαφορετικούς παράγοντες. Ο βασικότερος παράγοντας είναι η δομή του η οποία παρεμποδίζει την αλληλούχηση και συναρμολόγησή του και κατά συνέπεια δυσκολεύει την περαιτέρω ανάλυσή του. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το χρωμόσωμα W του *Bombyx mori*, αντίστοιχο του Y στα έντομα με αρσενική ετερογαμία, το οποίο εξαιρέθηκε από το πρόγραμμα αλληλούχησης του γονιδιώματός του λόγω της ετεροχρωματινικής δομής του (Mita et al., 2004).

Το Y χρωμόσωμα μπορεί να είναι δύσκολο στην μελέτη του περιλαμβάνει όμως γονίδια τα οποία έχουν μεγάλο εξελικτικό ενδιαφέρον με χαρακτηριστικότερο παράδειγμα τον παράγοντα αρρενωποίησης, ένα γονίδιο το οποίο είναι υπεύθυνο για την αρρενοειδική ανάπτυξη του εντόμου. Άλλα παραδείγματα εντόμων με τον παράγοντα αρρενωποίησης να εδράζεται στο Y είναι τα *Aedes aegypti* (Hall et al., 2016), *Anopheles gambiae* (Krzywinska et al., 2016) και *Musca domestica* (Sharma et al., 2017). Απώτερος στόχος της ανάλυσης του Y χρωμοσώματος του δάκου της ελιάς είναι η ανεύρεση του παράγοντα αρρενωποίησης. Ο παράγοντας αρρενωποίησης είναι πολύ σημαντικός καθώς μπορεί να δώσει λύση στα προβλήματα της εφαρμογής της Τεχνικής του Στείρου Εντόμου (SIT) στο δάκο της ελιάς, όπως αναφέρθηκε στην Εισαγωγή. Η SIT αφορά στην απελευθέρωση στείρων αρσενικών εντόμων στο περιβάλλον με στόχο την ελάττωση των ατόμων της επόμενης γενιάς μέσα από τον

ανταγωνισμό με τα αρσενικά του γηγενούς πληθυσμού. Η τεχνική αυτή είναι ειδοειδική, αποτελεσματική, φιλική προς το περιβάλλον και σχετικά γρήγορη (Economopoulos, 1972). Μέχρι στιγμής όμως η SIT στο δάκο της ελιάς δεν είναι επιτυχής με σημαντικότερα προβλήματα την μειωμένη ανταγωνιστικότητα των απελευθερούμενων εντόμων (Economopoulos, 1972) και την ταυτόχρονη απελευθέρωση θηλυκών και αρσενικών. Η ανακάλυψη του παράγοντα αρρενοποίησης και η χαρτογράφηση του μπορεί να βοηθήσει την εφαρμογή της SIT με διάφορους τρόπους. Θα μπορούσε, για παράδειγμα, να επιτευχθεί η αρρενοποίηση εντόμων στο στάδιο του αυγού αμέσως μετά την ωοαπόθεση, ή η δημιουργία σειράς εντόμων τα οποία θα έχουν τον παράγοντα αρρενοποίησης μεταξύ δύο διαγονιδίων τα οποία φθορίζουν με απώτερο σκοπό τον διαχωρισμό των φθοριζόντων αρσενικών από τα μη φθορίζοντα θηλυκά έντομα.

Ο δάκος είναι ένα έντομο το οποίο τα αρσενικά με τα θηλυκά διαφέρουν μορφολογικά μόνο μετά την ενηλικίωση. Σε όλα τα προηγούμενα στάδια της ανάπτυξης του τα αρσενικά είναι μορφολογικά πανομοιότυπα με τα θηλυκά. Η ύπαρξη φθοριζόντων εντόμων θα καταστήσει ευκολότερο τον διαχωρισμό των αρσενικών από τα θηλυκά άτομα από τα πολύ πρώιμα στάδια της ζωής τους, για παράδειγμα στο στάδιο των αυγών, όπου είναι και πιο εύκολα διαχειρίσιμα. Έτσι καθίσταται ευκολότερος ο διαχωρισμός τους στα εργοστάσια εκτροφής τους με σκοπό την εφαρμογή της SIT.

Κατά παρόμοιο τρόπο θα βοηθήσει και η αρρενοποίηση αυγών ώστε να έχουμε μόνο αρσενικούς απογόνους. Για παράδειγμα, θα μπορούσαμε να έχουμε αρσενικά τα οποία συζευγνύονται με θηλυκά και τα αυγά που αποθέτουν τα τελευταία να διαποτίζονται σε υγρό το οποίο περιέχει ώριμα μετάγραφα του παράγοντα αρρενοποίησης. Κατ' αυτόν τον τρόπο τα θηλυκά άτομα θα ακολουθούν ανάπτυξη αρσενικού και θα είναι στείρα. Έτσι στην επόμενη γενιά θα έχουμε μορφολογικά αρσενικά άτομα από τα οποία κάποια θα είναι γόνιμα και κάποια στείρα. Τέτοιες σειρές εντόμων θα βοηθήσουν στην παραγωγή και απελευθέρωση μόνο αρσενικών ατόμων με στόχο τη βελτίωση της SIT.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 18. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ζεύγη εκκινητών, οι αλληλουχίες τους, το T_m κάθε εκκινητή, ποιοι εκκινητές ελέγχθηκαν μόνο με PCR, ποιοι χρειάστηκε επιπλέον ανάλυση με qPCR, ποιο το ΔCq αυτών που αναλύθηκαν και με qPCR και ποιο το T_a που χρησιμοποιήθηκε για κάθε ζεύγος εκκινητών. Σε qPCR ανάλυση προχωρήσαμε με τους εκκινητές που δεν έγινε ταυτοποίηση της αρρενοειδικότητας με απλή PCR. Στην πρώτη στήλη και με «*» σημειώνονται τα ζεύγη τα οποία εξαιρέθηκαν της qPCR λόγω του ότι δεν έδιναν καθόλου το ειδικό προϊόν στις απλές PCR.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΠΡΟΣΘΙΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ (FORWARD)	T_m	ΑΝΑΣΤΡΟΦΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΗΣ (REVERSE)	T_m	PCR ΑΝΑΛΥΣΗ	qPCR ΑΝΑΛΥΣΗ	ΔCq ($Cq_{\text{♀}}$ - $Cq_{\text{♂}}$)	T_a
A12	AAACTAGCAAAGCAGCAGC	57	GCCAAAATGAAGCGACTGCA	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	59
B01	TCGCTTGATGCAACAATGGTG	57	GTCGTCGAATTGTCTCCGGT	57	NAI			52
B02	TTTTTCATGAGCGGGTGAAGA	54	TGTCCCGATGCCAGATATGC	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	48
B03	AACATCCGCTCAGGCACTTT	57	TGCTTGTCCCTTGCTGTTTG	56	NAI	NAI	45,12 ΔCq	47
B04	TCCTTCATTCGAGTATGCTCCC	56	ACGGCTGATATCAACTAAGCCT	56	NAI			54
B05	TCTGCGCAAAGAATTGGTGC	57	CGGCATTCTTCGAAAGTGCA	56	NAI			51
B06	ACTCACTCAGTTTACCGCCC	57	TGCTTACAACGGGCACAAGA	57	NAI	NAI	44,76 ΔCq	47
B07	TGGCCGCTGTTGATATCGTT	57	ATACTTCCCTTTGGCACGGG	57	NAI			54
B08	CGACATCTGTTCGAAAAATCACA	54	ACGACATATGCCTCGCAAGA	56	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	52
B09	CGCTGAGCCTGGTTCGATAT	57	GGATCACTGTTCGATTGCGC	57	NAI			54
B10	CCATAGTGCCGTCCATAGGG	57	ACACGGGTGGACGATTGAAT	57	NAI			52
B11	GCTTAACACGTCGGCTGTTG	57	GCCTGGAAGTTCATGGAGGA	57	NAI			52
B12	AGTCTTAAGGTTTTGGCATTGGT	55	TCCAAGACCTCCGGTGAGTA	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	47

C01*	AAATTAAGTTTCCC GCGGCG	57	TCCGTAACATCGCTTGTGGA	56	NAI			47
C02	CCTTCCACCAGATACGGAACA	57	ACGGTATTCTGGGACAATTGGT	56	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	58
C03	TCAATGTCGGTGAGCGTTCA	57	ACGTCCTCCTCCTGTAGTCC	58	NAI			52,5
C04	AAATAACGAGCGTGGCAAAAA	54	AGGATGTCTCTGGCTAATTGGA	55	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	52
C05	AGCTCATAGATGGCGCCAAA	57	TGTACGCAACGAAGACAAAATGA	55	NAI	NAI	-16,73ΔCq	52
C06	AGAAGACGCACTGCACATCA	57	CCCTACACTTTCAGCCGGTT	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	55
C07	GGTACTGCATCGGGGCTTAG	58	AAAAAGATGTGGCGGGCAAC	57	NAI	NAI	-3ΔCq	52
C08	ACCCGCAAATATAACCGAAATCA	55	ACGGAGAATACTTGTGCAATTCA	55	NAI	NAI	-13,72ΔCq	52
C09*	GCATGGTTTTTCGAAGGCGT	57	AGTGATTGTTCCACACACA	54	NAI			55
C10	AGATTGTGGCCATGGATGCA	57	TGTTTCGTTTAAATACGCGCCA	55	NAI	NAI	Προϊόν στους κύκλους 49,55 (♀) και 47,00 (♂). Δεν θεωρήθηκε αξιόπιστο.	50
C11	ACAAAGTGCGGTAAGTAGCT	54	GCCACTGCACTTCTCTGCTT	58	NAI	NAI	-34,14ΔCq	52
C12*	ACAATCCCACCGGTCATGTC	57	TCATCGGGCGATACTTTCG	57	NAI			52
D01	GATGCACACCATTCGAAGCG	57	AACTGGGGTCTTCCGAAAG	57	NAI			52
D02	ACAAGAGTCACTCTGGAAAAGAA	54	CACCAGAACACTTGTTTAGTTGA	53	NAI			48,5
D03	GCCACTGCACTTCTCTGCTT	58	TGCGGTAACCAGCTAAAAATAAAA	53	NAI			51

D04	TTTTTCACTAGCACCCAAGGT	55	TTTACAGGTCGTATCCGCGG	57	NAI			51
D05	GACTTCTTTGGTGGCGTTCAC	57	AACGAATTTAATGCTTGAAGGGA	53	NAI			51
D06	CCTGCACATCCGAGTTACCA	57	ACCATGCGACGGAACATCTT	57	NAI			52
D07*	CGATACCTTCGCAAAAGCCG	57	GCCGCAATGCCGATTACATT	57	NAI			54
D08	CACCCAAGAATTTCTACCGAACT	55	CCAGCGCATGTATACAAAACA	54	NAI			49,5
D09	GGAAAAGCGGCGTATAAGCG	57	TTCCATGAGCTTCGTGTGCT	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	47
D10	AGCGGCTGCAATGTCAAATG	57	GCCTACCCAAACGTAGCGTA	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	52
D11	CACACCCCTGAACGTATGGT	57	TCAGGCATTGTTCGGTAAGCA	57	NAI			52
D12	TATCTGACCACTCGCCAGGT	58	CGCGACTTGTTTGAATTGGAGT	56	NAI			52
E01	TCAAACGCTGTTGTTACGCG	57	AGAAACCAAGCTGCAATGGC	57	NAI			50
E02	TTCCAGCAGGTGTAAGCTCG	57	GAGCGCCATATGGTCACGTA	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	55
E03	GCGTGACTGCGACTAGTAA	57	ATTTGCTTGCCCTTGCCTG	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	58
E04	TGTGTAACCTCACGGCTGCT	57	ATGTAGCGCCATGTTGCAGA	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	55
E05	ACGGAAAGACCCCATGAACC	57	TTTCAACGTCGGCTCCATGA	57	NAI	NAI	-1,34ΔCq	47
E06	TGTAACCTTTGGAGCCGCT	57	TGGTATCTGTGTGCGAACGA	56	NAI			51,5
E07	CTGTCATCGGTTTTGTTTCGCA	56	TTCCGCGAAGTTCCTATCGC	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	52
E08*	CCAAATGGGGCAAATCTCGC	57	TGGCTGTACTAGAACGCGT	56	NAI			58

E09	GCGTTGTTGCTTACGTCGTT	56	CAACATACGCACCCAGCAAC	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	52
E10	CCGGTAAGGCTGCGAGTTTA	57	TGCCACGACTGGTCCTTAAG	57	NAI			52
E11	GAAGATGCTGAGGAGAGCGG	58	TCGCCTTGCTTTCGTTGTTT	56	NAI			53
E12	AGGAAGAGTTCTACACAGACTGT	55	TGTGTTGTAGCTGACTCCGT	56	NAI			51
F01	AACAGCACATTTGTTGGACCA	56	ATCGCCTATAATCACGCAAGC	55	NAI	NAI	-1,3ΔCq	53
F02*	CGTTTCTCTCCGCTCCTGTT	57	ATACTCGTAGTTGGCGGCAG	57	NAI			57
F03	CAAAGGCACGACGACGATTC	57	GCCAGCAAACTAACCCAAGG	57	NAI	NAI	-1,03ΔCq	58
F04	GGACAGCACTGGTGGCATAT	58	TTTCGATGGAGGACTGCACC	57	NAI	NAI	-0,51ΔCq	58
F05	ACTCATCTGCTATGGCACGG	57	ATATTTTACCGCGCCGAGCT	57	NAI	NAI	-1,92ΔCq	58
F06	TTCTTGACGATCTGCCTCCG	57	AACACCGCATGCCATACTCA	57	NAI	NAI	-1,36ΔCq	55
F07	GCTGACAGAGGTGCCTCATT	57	GAAGGCCAATCAAGACCGGA	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	55
F08	GGGTATTGAAAGAGCACAAATT	54	GAGAGAGAGAGAGTTCCCCA	55	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	47
F09	GGTCTGCCGGTCTAAGCTTC	58	CGGCGTTGTGTTCAAGAATGA	56	NAI	NAI	-4,59ΔCq	53
F10	GGGTTGGATGTTAACGTGGC	57	GGCTACTTTAACACCATCTAGCA	55	NAI	NAI	-6,27ΔCq	52
F11	TGGCAGCTTTAATATCTGCGC	56	CTCAAACAGCAGGTGGAGACT	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	52
F12	CGTAGCATATAAGCAGGCGC	56	ACGCACTAGACGCTGTAACA	56	NAI	NAI	-2,61ΔCq	55
G01	AGAGCACGCCCAATGTAATCA	57	CAAAAACGTTCCGCCGTGAT	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	47

G02	GCGAGTTGCAGCAGATGGAG	59	GAAGAAAAAGAAATCTGCCAGGA	53	NAI			59
G03	ACCGCTGTTAGTTCATCGCT	57	CTGAACACGGCACAAAAGGT	56	NAI			51,5
G04	GCAGGATTGCTGGCATCACT	58	AGAGCCAAAGTGCTTTTCGC	56	NAI	NAI	-1,03 Δ Cq	55
G05	ACACCTTAGACGTCATCGGC	57	TTTGATGCTGTTGCTGAGGC	56	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	47
G06	GGCACAGATGGTCGCAAATG	57	CTGCGATTGTTTCCTTGCGA	56	NAI			51
G07*	CGTTCACGAAACCGCGTATC	57	GAAGTCTTAAAGGGCCCGCT	57	NAI			57
G08	TGACGATCTTGATTCAAGTGGT	54	TGCTCTCTCGATTTCGATTTG	55	NAI	NAI	-10 Δ Cq	50
G09	ATCGCCAAGTACATCGCCAT	57	CATGGTGCCGCACTCTATCT	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	47
G10	TGTGACCAAGCTACGCACAT	57	TTTAACCCACGTGAAGCCGA	57	NAI	NAI	-6,8 Δ Cq	50
G11	TACTTGCTCGAGCTTTTCGGC	58	GTAAAGGTCCCAGCAGTCAA	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	53
G12	TTTATGTTGTTGCGGCCTGC	57	AGCTTTCCTTCTGGTGACAG	58	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	50
H01	AAGACCACCTTCGCCGTTAG	57	CGTCGCCAAAGTTGACACTG	57	NAI	NAI	-0,58 Δ Cq	58
H02	AGTGAGTGGCATCCATTACGT	56	GTTTGCCCTGTAATCGCTGC	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	52
H03	AATCCCTCCCCTTTGAGTTTT	54	AGCACGACACACTATCCACT	56	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	47
H04	AGGGAAGTTGACGCATCGAG	57	TATCGAGCCACCGAGTTTCG	57	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	52
H05	ATGGCTCTGAACTGCTGACC	57	ACAACAGTTTTACAACAGCAGCT	56	NAI	NAI	Same Cq in ♂ & ♀	52
H06	ACTCGCGCATTTGTTTTAGCT	56	TGGCGTCACCATTAAGGAGA	57	NAI	NAI	-39,78 Δ Cq	52

H07	GCATCTTCTACAAAATTCCAGGC	54	GGTCGAATACCTTGGCCATA	54	NAI			49
H08	TTGCTTTGGTTCGTGTTGGG	56	TCCACGAATTTTGTGCGGC	57	NAI			52
H09	CGTGTTTCATTCGGGCGTT	57	ACGAAAGCCAAACCAACCG	57	NAI	NAI	-1,93 Δ Cq	58
H10	TGCCGATCGTATTGACCAGG	57	ACGATGACACACAAGACGTCA	56	NAI			53
H11*	GACCTTCCAACCTGAGGTGGG	58	CACCATCCGCACTATCCCC	58	NAI			49
H12	TGCTTTAGAGGCGCAACGTA	57	CTGCCGATGCTCTCATCCAT	57	NAI	NAI	-1,89 Δ Cq	58

Πίνακας 19. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα ζεύγη των εκκινήτων, το, θεωρητικά, Y – ειδικό Contig αλληλούχισης στο οποίο σχεδιάστηκαν και το μέγεθος του προϊόντος που ενισχύουν.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΚΩΔΙΚΟΣ Contig ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR (bp)	ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	ΚΩΔΙΚΟΣ Contig ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗΣ	ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR (bp)
A12	Y_Contig13987	106	E07	Y_Contig3952	112
B01	Y_Contig4077	111	E08	Y_Contig2921	109
B02	Y_Contig5308	100	E09	Y_Contig10883	102
B03	Y_Contig5761	100	E10	Y_Contig13620	102
B04	Y_Contig3253	118	E11	Y_Contig7138	113
B05	Y_Contig6207	108	E12	Y_Contig10284	117
B06	Y_Contig4744	106	F01	Y_Contig989	100
B07	Y_Contig4891	120	F02	Y_Contig9952	117
B08	Y_Contig146	116	F03	Y_Contig11909	100
B09	Y_Contig3086	120	F04	Y_Contig5362	107
B10	Y_Contig5212	100	F05	Y_Contig4288	113
B11	Y_Contig5523	102	F06	Y_Contig1279	103
B12	Y_Contig4581	111	F07	Y_Contig14119	119
C01	Y_Contig2504	101	F08	Y_Contig2329	120
C02	Y_Contig2327	120	F09	Y_Contig7264	101
C03	Y_Contig5021	107	F10	Y_Contig5760	101
C04	Y_Contig3771	118	F11	Y_Contig2193	104
C05	Y_Contig10165	119	F12	Y_Contig382	107
C06	Y_Contig5689	108	G01	Y_Contig6260	107
C07	Y_Contig2463	117	G02	Y_Contig8080	100
C08	Y_Contig6259	113	G03	Y_Contig2464	100
C09	Y_Contig2626	113	G04	Y_Contig3556	109
C10	Y_Contig2466	100	G05	Y_Contig12928	119

C11	Y_Contig2197	105	G06	Y_Contig5241	101
C12	Y_Contig3984	108	G07	Y_Contig11960	100
D01	Y_Contig8390	109	G08	Y_Contig10488	101
D02	Y_Contig13616	107	G09	Y_Contig4079	116
D03	Y_Contig2328	100	G10	Y_Contig6156	118
D04	Y_Contig5687	102	G11	Y_Contig7900	118
D05	Y_Contig2196	102	G12	Y_Contig9909	120
D06	Y_Contig2194	103	H01	Y_Contig4292	109
D07	Y_Contig3533	102	H02	Y_Contig9425	101
D08	Y_Contig4890	120	H03	Y_Contig7614	100
D09	Y_Contig6379	111	H04	Y_Contig11418	118
D10	Y_Contig5925	107	H05	Y_Contig13138	103
D11	Y_Contig5885	114	H06	Y_Contig15987	112
D12	Y_Contig1505	100	H07	Y_Contig278	116
E01	Y_Contig8081	107	H08	Y_Contig8079	105
E02	Y_Contig7021	109	H09	Y_Contig13265	107
E03	Y_Contig6024	118	H10	Y_Contig4	119
E04	Y_Contig7251	108	H11	Y_Contig10587	120
E05	Y_Contig11059	118	H12	Y_Contig976	100
E06	Y_Contig2467	108			

Πίνακας 20. Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης. Στον πίνακα αυτό φαίνονται τα εργαλεία βιοπληροφορικής που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της κάθε περιοχής, το τμήμα της αλληλουχίας που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση καθώς και τα καλύτερα αποτελέσματα του blast. Επιπλέον, στη στήλη «Apollo expression» φαίνονται τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της αλληλουχίας που ενισχύονταν κάθε φορά σε σύγκριση με τη βάση δεδομένων RNaseq της πλατφόρμας Apollo. Οι αριθμοί στην παρένθεση δείχνουν τον αριθμό διαβασμάτων (reads) του RNaseq για την συγκεκριμένη αλληλουχία, δηλαδή πόσες φορές βρήκε την συγκεκριμένη αλληλουχία στα δείγματα που έγινε αλληλούχιση. Η τελευταία στήλη είναι η πρόβλεψη που κάνουμε για τον πιθανό ρόλο της κάθε αλληλουχίας. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν εντός των Contig αλληλούχισης σε σημείο που ονομάζουμε «inner contig». Οι αλληλουχίες των inner contig δεν παρατίθενται λόγω μεγάλου όγκου. Στην πρώτη στήλη και με «*» επισημαίνονται τα ζεύγη εκκινητών που επιλέχθηκαν για τη δημιουργία προφίλ έκφρασης.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩ N	product position in inner contig	Inner contig length	blast with	Blast tools used			Apollo expression	Best blastn hit	Best blastx hit	Best tblastx hit	PREDICTION (gene/protein domain)
				blast n	blast x	tblast x					
B1	172-282	872	product	+	+	+	Testes (2)	no significant hits	no significant hits	ubiquitin C- terminal hydrolase	Bo specific
B4	698-815	830	contig	+	+	+	no matches found	no significant hits	no significant hits	no significant hits	Bo specific
B5*	937 - 1094	1620	contig	+	+	+	no expression	Bo ncRNA, transcription initiation factor TFIID	no significant hits	Bo ncRNA, transcription initiation factor TFIID	ncRNA
B7	525-644	652	ORF (652- 459)	+	+	+	no expression	mRNA 5' end, zinc finger domain	transcriptio n factor GAGA	RNAIL transcription subunit, transcription factor GAGA	mRNA 5' end
B9	647-766	1584	ORF (771- 634)	+	+	+	no matches found	D. mel Y chromosome hit	Bo nuclear pore complex protein	no significant hits	D. mel Y Chromosome (probable B.o. Y)
B10	327-426	430		+	+	+	no matches found	no significant hits	no significant hits	no signigicant hits	Bo specific

B11	41 - 142	513	ORF (1-155)	+	+	+	Male heads (2), Mixed stages eggs (1-2)	no significant hits	Gag polyprotein gypsy transposone	no significant hits	transposon
C3	316-422	448	product	+	+	+	Egg Male (1)	no significant hits	uncharacterized proteins	uncharacterized proteins	uncharacterized protein
C5	15-133	278	product	+	+	+	no matches found	no significant hits	no significant hits	no significant hits	Bo specific
C7*	704-820	1318	contig	+	+	+	Adult Testes (2), Testes AM (2), Testes & MAGs (2)	PIF1-like DNA helicase	PIF1-like DNA helicase	PIF1-like DNA helicase	DNA helicase/binding
C8	42 - 154	265	contig	+	+	+	Testes AM (7), Testes & MAGs (15)	importin4	no hits	importin4	Importin4 (5' mRNA end)
C11	61-165	298	contig	+	+	+	no expression	no significant hits	no hits	no significant hits	Bo specific
D1*	33-141	197	contig	+	+	+	no expression	PIF1-like DNA helicase	PIF1-like DNA helicase	no significant hits	PIF1-like helicase
D2*	41 - 147	523	contig	+	+	+	Egg Male (1-2), Female heads mated to males exposed to pinene, Testes & MAGs (2)	ncRNA in Y chromosome of Dmel, the same nucleotides in various sites on Y chromosome of Dmel	no hits	no significant hits (e.v>3,2)	ncRNA

D3	126 - 225	225	contig	+	+	+	no expression	no significant hits	no significant hits	no significant hits	Bo specific
D4	40 - 141	225	contig	+	+	+	no expression	Achilles	no hits	no hits	Achilles transposon
D5	5 - 106	135	contig	+	+		Testes (3), Testes AM (2), Testes & MAGs (3)	Importin4 mRNA Bo	Importin4 mRNA Bo		Importin 4 (residues 137-187)
D6	62 - 164	363	contig	+	+	+	Testes (6), Egg (2), Testes AM (11), Larvae (2), Pupae (1), Testes & MAGs (14)	Importin4 mRNA Bo (Minus)	Importin4 mRNA Bo (Minus)	Importin4 mRNA Bo (Minus)	Importin 4 (residues 275 - 343, frame -2)
D8	36-155	155	contig	+	+	+	no matches found	no significant hits	no significant hits	no significant hits	Bo specific
D11	418-531	838	contig	+	+	+	no matches found	no significant hits	low e.v. with uncharacterized proteins that have no domains, interpro uncharacterized protein	uncharacterized protein	
D12	139-238	238	contig	+	+	+	Egg males (1), Pupae (2)	Jokey non-LTR retrotransposon	Jokey retrotransposon	jokey retrotransposon	Jokey retrotransposon

								on			
E1*	195-301	336	contig	+	+		Testis (8-19), Male heads (2-5), Larvae (2), Pupae (2-5), Testes & MAGs (2-7), Female heads (2)/ovipositors (2), mixed M/Fm thorax (2)	PIF1-like DNA helicase, transcription factor	PIF1-like DNA helicase		DNA binding (transcription factor)
E6	60-167	466	contig	+			Testes (7), Testes AM (27), Testes & MAGs (28)	importin 4			Importin 4
E10	41-142	377	contig	+	+	+	Testes AM (2-4)	no significant hits	no hits	no significant hits	Bo specific
E11	38-150	160	contig	+			Testes (2-12), Testes AM (2), Testes & MAGs (2)	importin 4			Importin 4
E12	173-289	1009	contig	+	+	+	no matches found	no significant hits	no hits	no significant hits	Bo specific
F10	20-120	141	contig	+	+	+	no expression	no significant hits	no hits	no significant hits	Bo specific
G2	29-128	152	contig	+	+	+	no expression	no significant hits	no significant hits	no significant hits	Bo specific

G3	145-244	544	contig	+	+	+	no matches found	uncharacterized		Achilles retrotransposon, uncharacterized	Achilles transposon
G6*	506-606	698	contig	+	+	+	Egg male (163)	B.dor PDF receptor, B.o tamozhennic	no hits	B.dor PDF receptor, B.o tamozhennic	tamozhenic
H6	23-134	152	contig	+	+	+	no expression	no significant hits	no significant hits	no significant hits	
H7	93 - 208	278	contig	+	+		no matches found	ncRNA (Bo, ev: 0,064, Query cover: 11%)	Retrovirus-related Pol (transposon gypsy)		ncRNA/transposon
H8	149-253	358	contig	+	+	+	no expression	no significant hits	no significant hits	no significant hits	Bo specific
H10	91-209	213	contig	+	+	+	no matches found	no significant hits	no significant hits	no significant hits	Bo specific

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abe, H., Fujii, T., Tanaka, N., Yokoyama, T., Kakehashi, H., Ajimura, M., ... Shimada, T. (2008). Identification of the female-determining region of the W chromosome in *Bombyx mori*. *Genetica*, *133*(3), 269–282. <https://doi.org/10.1007/s10709-007-9210-1>
2. Abe, H., Mita, K., Yasukochi, Y., Oshiki, T., & Shimada, T. (2005). Retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Cytogenetic and Genome Research*, *110*(1–4), 144–151. Retrieved from <https://www.karger.com/DOI/10.1159/000084946>
3. Alphey, L. (2007). Engineering insects for the Sterile Insect Technique. In *Areawide control of insect pests: from research to field implementation* (pp. 51–60). Dordrecht, The Netherlands: Springer Publications.
4. Alphey, L., Nimmo, D., O’Connell, S., & Alphey, N. (2007). Insect population suppression using engineered insects. In *Transgenesis and the management of vector-borne disease*. Austin, Texas: Landes Bioscience.
5. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, *215*(3), 403–410.
6. Baccetti, B., & Cappellini, M. (1961). Ricerche sulla sterilizzazione di insetti nocivi con radiazioni ionizzanti. *Nuntius Radiologicus*, *7*, 600–603.
7. Bachtrog, D. (2003). Protein evolution and codon usage bias on the neo-sex chromosomes of *Drosophila miranda*. *Genetics*, *165*(3), 1221–1232.
8. Bachtrog, D. (2004). Evidence that positive selection drives Y-chromosome degeneration in *Drosophila miranda*. *Nature Genetics*, *36*(5), 518.
9. Bachtrog, D. (2005). Sex chromosome evolution: Molecular aspects of Y-chromosome degeneration in *Drosophila*, 1393–1401. <https://doi.org/10.1101/gr.3543605>.
10. Bachtrog, D. (2006a). A dynamic view of sex chromosome evolution. *Current Opinion in Genetics & Development*, *16*(6), 578–585.
11. Bachtrog, D. (2006b). The speciation history of the *Drosophila nasuta* complex. *Genetical Research*, *88*(1), 13–26. <https://doi.org/DOI:10.1017/S0016672306008330>
12. Bachtrog, D. (2008). The temporal dynamics of processes underlying Y chromosome degeneration. *Genetics*, *179*(3), 1513–1525.
13. Bachtrog, D., & Gordo, I. (2004). Adaptive evolution of asexual populations under Muller’s ratchet. *Evolution*, *58*(7), 1403–1413.
14. Bachtrog, D., Hom, E., Wong, K. M., Maside, X., & de Jong, P. (2008). Genomic degradation of a young Y chromosome in *Drosophila miranda*. *Genome Biology*, *9*(2), R30.
15. Bachtrog, D., Thornton, K., Clark, A., & Andolfatto, P. (2006). EXTENSIVE INTROGRESSION OF MITOCHONDRIAL DNA RELATIVE TO NUCLEAR GENES IN THE DROSOPHILA YAKUBA SPECIES GROUP. *Evolution*, *60*(2), 292–302. <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2006.tb01107.x>
16. Barbash, D. A., & Cline, T. W. (1995). Genetic and molecular analysis of the autosomal component of the primary sex determination signal of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *141*, 1451–1471.
17. Bartlett, J. M. S., & Stirling, D. (2003). A short history of the polymerase chain reaction. In *PCR protocols* (pp. 3–6). Springer.
18. Bazzini, A. A., Johnstone, T. G., Christiano, R., Mackowiak, S. D., Obermayer, B., Fleming, E. S., ... Walther, T. C. (2014). Identification of

- small ORFs in vertebrates using ribosome footprinting and evolutionary conservation. *The EMBO Journal*, e201488411.
19. Bergero, R., & Charlesworth, D. (2009). The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2008.09.010>
 20. Beukeboom, L. W., Kamping, A., & De Zande, L. (2007). Sex determination in the haplodiploid wasp *Nasonia vitripennis* (Hymenoptera: Chalcidoidea): A critical consideration of models and evidence. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 18, 371–378.
 21. Biémont, C., & Vieira, C. (2005). What transposable elements tell us about genome organization and evolution: The case of *Drosophila*. *Cytogenetic and Genome Research*, 110(1–4), 25–34. <https://doi.org/10.1159/000084935>
 22. Bjeliš, M. (2009). Control of olive fruit fly–*Bactrocera oleae* Rossi (Diptera, Tephritidae) by mass trapping and bait sprays methods in dalmatia. *Zbornik Predavanj in Referatov*, 9, 397–401.
 23. Bone, J. R., & Kuroda, M. I. (1996). Dosage Compensation Regulatory Proteins and the Evolution of Sex Chromosomes in *Drosophila*. *Genetics*, 144(2), 705–713. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1207561/>
 24. Bopp, D., Bell, L. R., Cline, T. W., & Schedl, P. (1991). Developmental distribution of female-specific Sex-lethal proteins in *Drosophila melanogaster*. *Genes Development*, 5, 403–415.
 25. Bopp, D., Saccone, G., & Beye, M. (2014). Sex determination in insects: Variations on a common theme. *Sexual Development*, 8(1–3), 20–28. <https://doi.org/10.1159/000356458>
 26. Bridges, C. (1916). Non-disjunction as a proof of the chromosome theory of heredity. *Genetics*, 1, 1–52, 107–163.
 27. Brosseau, G. E. (1960). Genetic Analysis of the Male Fertility Factors on the Y Chromosome of *Drosophila Melanogaster*. *Genetics*, 45(3), 257–274. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1210049/>
 28. Cabrera, C. V., & Alonso, M. C. (1991). Transcriptional activation by heterodimers of the achaete-scute and daughterless gene products of *Drosophila*. *The EMBO Journal*, 10, 2965–2973.
 29. Caceres, C. (2002). Mass rearing of temperature sensitive genetic sexing strains in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). *Genetica*, 116(1), 107–116.
 30. Carvalho, A. B. (2002). Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. *Current Opinion in Genetics & Development*, 12(6), 664–668. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00356-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00356-8)
 31. Carvalho, A. B., & Clark, A. G. (2005). Y Chromosome of *D. pseudoobscura* Is Not Homologous to the Ancestral *Drosophila* Y. *Science*, 307(5706), 108 LP-110. Retrieved from <http://science.sciencemag.org/content/307/5706/108.abstract>
 32. Carvalho, A. B., Dobo, B. A., Vibranovski, M. D., & Clark, A. G. (2001). Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(23), 13225–13230. <https://doi.org/10.1073/pnas.231484998>
 33. Carvalho, A. B., Dobo, B. A., Vibranovski, M. D., & Clark, A. G. (2001). Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila*

- melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98(23), 13225–13230. <https://doi.org/10.1073/pnas.231484998>
34. Carvalho, A. B., Lazzaro, B. P., & Clark, A. G. (2000). Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97(24), 13239–13244. <https://doi.org/10.1073/pnas.230438397>
 35. Carvalho, A. B., Lazzaro, B. P., & Clark, A. G. (2000). Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13239–13244.
 36. Carvalho, A. B., Vicoso, B., Russo, C. A. M., Swenor, B., & Clark, A. G. (2015). Birth of a new gene on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(40), 12450–12455. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516543112>
 37. Carvalho, A., & Clark, A. (2005). Y chromosome of *D. pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. *Science*, (307), 108–110.
 38. Charlesworth, B. (1996a). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology*, 6(2), 149–162. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00448-7](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00448-7)
 39. Charlesworth, B. (1996b). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Current Biology*, 6(2), 149–162.
 40. Charlesworth, B. (2001). Genome analysis: More *Drosophila* Y chromosome genes. *Current Biology*, 11(5), 182–184. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00089-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00089-6)
 41. Charlesworth, B., Betancourt, A. J., Kaiser, V. B., & Gordo, I. (2009). Genetic recombination and molecular evolution. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Vol. 74, pp. 177–186). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
 42. Charlesworth, B., & Charlesworth, D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 355(1403), 1563–1572.
 43. Charlesworth, B., Coyne, J. A., & Barton, N. B. (1987). The Relative Rates of Evolution of Sex Chromosomes and Autosomes. *The American Naturalist*, 130(1), 113–146. <https://doi.org/10.1086/284701>
 44. Charlesworth, D., Charlesworth, B., & Marais, G. (2005). Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. *Heredity*, 95(2), 118–128. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800697>
 45. Cline, T. W. (1988). Evidence that sisterless-a and sisterless-b are two of several discrete “numerator elements” of the X/A sex determination signal in *Drosophila* that switch Sxl between two alternative stable expression states. *Genetics*, 119, 829–862.
 46. Comeron, J. M., & Kreitman, M. (2000). The correlation between intron length and recombination in *Drosophila*: dynamic equilibrium between mutational and selective forces. *Genetics*, 156(3), 1175–1190.
 47. Criscione, F., Qi, Y., Saunders, R., Hall, B., & Tu, Z. (2013). A unique Y gene in the Asian malaria mosquito *Anopheles stephensi* encodes a small lysine-rich protein and is transcribed at the onset of embryonic development. *Insect Molecular Biology*, 22(4), 433–441. <https://doi.org/10.1111/imb.12034.A>
 48. Cronmiller, C., Schedl, P., & Cline, T. W. (1988). Molecular characterization of daughterless, a *Drosophila* sex determination gene with multiple roles in

- development. *Genes Development*, 2, 1666–1676.
49. Croy, R. (1998). Molecular Genetics II. In *Molecular Genetics II*. Durham: Durham University.
 50. Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive fruit fly: managing an ancient pest in modern times. *Annual Review of Entomology*, 55, 151–169.
 51. Dahm, R. (2008). Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Human Genetics*, 122(6), 565–581.
 52. de Magalhaes Silva, G. (1970). Sterile-male technique for control of the olive fly. *Review of Work on Rearing and Irradiation*. IAEA, Vienna.
 53. Deshpande, G., Stuke, J., & Schedl, P. (1995). scute (sis-b) function in *Drosophila* sex determination. *Molecular Cell Biology*, 15, 4430–4440.
 54. Dorer, D. R., & Henikoff, S. (1994). Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell*, 77(7), 993–1002.
 55. Duffy, J. B., & Gergen, J. P. (1991). The *Drosophila* segmentation gene runt acts as a position-specific numerator element necessary for the uniform expression of the sex-determining gene Sex-lethal. *Genes Development*, 5, 2176–2187.
 56. Economopoulos, A. P. (1972). Sexual competitiveness of γ -ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. *Environmental Entomology*, 1(4), 490–497.
 57. Economopoulos, A. P., Giannakakis, A., Tzanakakis, M. E., & Voyadjoglou, A. V. (1971). Reproductive behavior and physiology of the olive fruit fly. 1. Anatomy of the adult rectum and odors emitted by adults. *Annals of the Entomological Society of America*, 64(5), 1112–1116.
 58. Economopoulos, A. P., & Zervas, G. A. (1982). The quality problem in olive flies produced for SIT experiments. In *Proceedings, international symposium on sterile insect technique and use of radiation in genetic insect control*. International Atomic Energy Agency, Vienna, IAEA, STI/PUB/592 (pp. 357–368).
 59. Eickbush, T. H., & Furano, A. V. (2002). Fruit flies and humans respond differently to retrotransposons. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12(6), 669–674. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(02\)00359-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(02)00359-3)
 60. Ekesi, S., Nderitu, P. W., & Rwomushana, I. (2006). Field infestation, life history and demographic parameters of the fruit fly *Bactrocera invadens* (Diptera: Tephritidae) in Africa. *Bulletin of Entomological Research*, 96(4), 379–386.
 61. Erickson, J. W., & Cline, T. W. (1993). A bZIP protein, sisterless-a, collaborates with bHLH transcription factors early in *Drosophila* development to determine sex. *Genes Development*, 7, 1688–1702.
 62. Eyre-Walker, A., & Keightley, P. D. (2007). The distribution of fitness effects of new mutations. *Nature Reviews Genetics*, 8(8), 610.
 63. Finnegan, D. (1992). Transposable elements. *Current Opinions in Genetics & Development*, 2, 861–867. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(05\)80108-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80108-X)
 64. Fisher, R. (1931). The evolution of dominance. *Biology Reviews*, 6, 345–368.
 65. Fletcher, B. S. (1989). Ecology; movements of tephritid fruit flies. *World Crop Pests*, 3, 209–219.
 66. FlyBase. (2017). Retrieved from <http://flybase.org>
 67. FlyBase CCY. (2017).

68. FlyBase k1-3. (2017). Retrieved from <http://flybase.org/reports/FBgn0267432.html>
69. FlyBase ORY. (2017). Retrieved from <http://flybase.org/reports/FBgn0046323.html>
70. FlyBase Ppr-Y. (2017).
71. FlyBase PRY. (2017). Retrieved from <http://flybase.org/reports/FBgn0267489.html>
72. Franz, G. (2005). Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to largescale rearing for the sterile insect technique. In V. A. Dyck, J. Hendrichs, & A. S. Robinson (Eds.), *Sterile Insect Technique Principles and practice in area-wide integrated pest management* (pp. 427–451). The Netherlands: Springer Publications.
73. Fytizas, E. (1967). Action du tepa sur les adultes de *Dacus oleae* Gmel.(Diptera: Tephritidae), en fonction des quantites du chimiosterilisant utilisees. *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki*, 8, 32–46.
74. Gabrieli, P., Falaguerra, A., Siciliano, P., Gomulski, L. M., Scolari, F., Zacharopoulou, A., ... Gasperi, G. (2010). Sex and the single embryo: early deveiopment in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Dev Biol*, 10, 12. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-10-12>
75. Gatti, M., & Pimpinelli, S. (1983). Cytological and genetic analysis of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* 0.1. Organization of the fertility factors. *Chromosoma*, 88, 349–73.
76. Gatti, M., & Pimpinelli, S. (1992). Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annual Review of Genetics*, 26(1), 239–276.
77. Gatti, M., & Pimpinelli, S. (1992). Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annual Review of Genetics*, 26(65), 239–275. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.26.1.239>
78. Gempe, T., & Beye, M. (2011). Function and evolution of sex determination mechanisms, genes and pathways in insects. *BioEssays*, 33(1), 52–60. <https://doi.org/10.1002/bies.201000043>
79. Gepner, J., & Hays, T. S. (1993). A fertility region on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* encodes a dynein microtubule motor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(23), 11132–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.11132>
80. Ginzinger, D. G. (2002). Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology*, 30(6), 503–512.
81. Hackstein, J. H. P., & Hochstenbach, R. (1995). The elusive fertility genes of *Drosophila*: the ultimate haven for selfish genetic elements. *Trends in Genetics*, 11(5), 195–200.
82. Hackstein, J. H. P., Hochstenbach, R., Hauschteck-Jungen, E., & Beukeboom, L. W. (1996). Is the Y chromosome of *Drosophila* an evolved supernumerary chromosome? *BioEssays*, 18(4), 317–323. <https://doi.org/10.1002/bies.950180410>
83. Hall, A. B., Basu, S., Jiang, X., Qi, Y., Timoshevskiy, V. A., Biedler, J. K., ... Tu, Z. (2015). A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 348(6240), 1268–1270. <https://doi.org/10.1126/science.aaa2850>
84. Hall, A. B., Basu, S., Jiang, X., Qi, Y., Vladimir, A., Biedler, J. K., ... Adelman, Z. N. (2016). A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 348(6240), 1268–1270.

- <https://doi.org/10.1126/science.aaa2850.A>
85. Hall, A. B., Papathanos, P.-A., Sharma, A., Cheng, C., Akbari, O. S., Assour, L., ... Besansky, N. J. (2016). Radical remodeling of the Y chromosome in a recent radiation of malaria mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *113*(15), E2114–E2123. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525164113>
 86. Hall, A. B., Qi, Y., Timoshevskiy, V., Sharakhova, M. V., Sharakhov, I. V., & Tu, Z. (2013a). Six novel Y chromosome genes in Anopheles mosquitoes discovered by independently sequencing males and females. *BMC Genomics*, *14*(1), 273. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-273>
 87. Hall, A. B., Qi, Y., Timoshevskiy, V., Sharakhova, M. V., Sharakhov, I. V., & Tu, Z. (2013b). Six novel Y chromosome genes in Anopheles mosquitoes discovered by independently sequencing males and females. *BMC Genomics*, *14*(1), 273. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-273>
 88. Hamm, R. L., & Scott, J. G. (2009). A High Frequency of Male Determining Factors in Male *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) from Ipswich, Australia. *Journal of Medical Entomology*, *46*(1), 169–172. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0121>
 89. Haniotakis, C. E., & Galachtiou, C. G. (1973). Metepa sterilization of the olive fruit fly. *Journal of Economic Entomology*, *66*(1), 55–61.
 90. Hediger, M., Henggeler, C., Meier, N., Perez, R., Saccone, G., & Bopp, D. (2010). Molecular characterization of the key switch F provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. *Genetics*, *184*(1), 155–170.
 91. Hill, W. G., & Robertson, A. (1966). The effect of linkage on limits to artificial selection. *Genetics Research*, *8*(3), 269–294.
 92. Interpro GPS motif. (2017). Retrieved from <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR000203>
 93. Interpro PKD/REJ-like. (2017). Retrieved from <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR002859>
 94. Interpro PLAT/LH2 domain. (2017). Retrieved from <http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001024>
 95. Juhn, J., & James, A. A. (2006). oskar gene expression in the vector mosquitoes, *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti*. *Insect Molecular Biology*, *15*(3), 363–372. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00655.x>
 96. Kaiser, V. B., & Bachtrog, D. (2010). Evolution of Sex Chromosomes in Insects. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, *44*, 91–112. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102209-163600>. Evolution
 97. Kamali, M., Marek, P. E., Peery, A., Antonio-Nkondjio, C., Ndo, C., Tu, Z., ... Sharakhov, I. V. (2014). Multigene phylogenetics reveals temporal diversification of major African malaria vectors. *PLoS ONE*, *9*(4), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093580>
 98. Kennison, J. A. (1981). The genetic and cytological organization of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *98*(3), 529–548.
 99. Kennison, J. A. (1981). The genetic and cytological organization of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *98*(3), 529–548.
 100. Koerich, L. B., Wang, X., Clark, A. G., & Carvalho, A. B. (2008). Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. *Nature*, *456*(7224), 949–951. <https://doi.org/10.1038/nature07463>
 101. Kozhukhar, V. (2012). SRY and SOX9: the main genetic factors of mammalian sex determination. *Tsitologiya*, *54*(5), 390–404.

102. Kozielska, M., Senckenberg, B. F., Pen, I., Weissing, F. J., & Beukeboom, L. (2008). Are autosomal sex-determining factors of the housefly (*Musca domestica*) spreading north? *Genetics Research*, *90*(2). <https://doi.org/10.1017/S001667230700907X>
103. Kramer, J. A. (2001). OmigaTM: A PC-based sequence analysis tool. *Molecular Biotechnology*, *19*(1), 97–106.
104. Krsticevic, F. J., Santos, H. L., Januário, S., Schrago, C. G., & Carvalho, A. B. (2010). Functional copies of the Mst77F gene on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *184*(1), 295–307. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.107516>
105. Krzywinska, E., Dennison, N. J., Lycett, G. J., & Krzywinski, J. (2016a). A maleness gene in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Research*, *2927*(1979), 1431–1434.
106. Krzywinska, E., Dennison, N. J., Lycett, G. J., & Krzywinski, J. (2016b). A maleness gene in the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science*, *353*(6294), 67–69. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5605>
107. Krzywinski, J., Sangaré, D., & Besansky, N. J. (2005). Satellite DNA from the Y chromosome of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Genetics*, *169*(1), 185–196. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.034264>
108. Lagos, D., Koukidou, M., Savakis, C., & Komitopoulou, K. (2007). The transformer gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Molecular Biology*, *16*, 221–230.
109. Larracuenta, A. M., Noor, M. A. F., & Clark, A. G. (2010). Translocation of Y-Linked Genes to the Dot Chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. *Molecular Biology and Evolution*, *27*(7), 1612–1620. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq045>
110. Lippman, Z., Gendrel, A.-V., Black, M., Vaughn, M. W., Dedhia, N., McCombie, W. R., ... Kasschau, K. D. (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, *430*(6998), 471.
111. Lucchesi, J. C. (1978). Gene dosage compensation and the evolution of sex chromosomes. *Science*, *202*, 711–716.
112. Lucchesi, J. C. (1993). How widespread is the phenomenon of dosage compensation? *Developmental Biology*, *4*, 141–145.
113. Mahajan, S., & Bachtrog, D. (2017). Convergent evolution of y chromosome gene content in flies. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00653-x>
114. Marín, I., Franke, A., Bashaw, G. J., & Baker, B. S. (1996). The dosage compensation system of *Drosophila* is co-opted by newly evolved X chromosomes. *Nature*, *383*, 160. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/383160a0>
115. Mazomenos, B. E., Pantazi-Mazomenou, A., & Stefanou, D. (2002). Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system. *IOBC Wprs Bulletin*, *25*(9), 137–146.
116. McAllister, B. F. (2002). Chromosomal and allelic variation in *Drosophila americana*: selective maintenance of a chromosomal cline. *Genome*, *45*(1), 13–21. <https://doi.org/10.1139/g01-112>
117. McAllister, B. F., & Charlesworth, B. (1999). Reduced Sequence Variability on the Neo-Y Chromosome of *Drosophila americana americana*. *Genetics*, *153*(1), 221 LP-233. Retrieved from <http://www.genetics.org/content/153/1/221.abstract>

118. Meisel, R. P., Scott, J. G., & Clark, A. G. (2015). Transcriptome Differences between Alternative Sex Determining Genotypes in the House Fly, *Musca domestica*. *Genome Biology and Evolution*, 7(7), 2051–2061. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv128>
119. Mita, K., Kasahara, M., Sasaki, S., Nagayasu, Y., Yamada, T., Kanamori, H., ... Sasaki, T. (2004). The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 11(1), 27–35.
120. Moore, T., Hurst, L. D., & Reik, W. (1995). Genetic conflict and evolution of mammalian X-chromosome inactivation. *Developmental Genetics*, 17(3), 206–211. <https://doi.org/10.1002/dvg.1020170305>
121. Morrow, J. L., Riegler, M., Frommer, M., & Shearman, D. C. A. (2014). Expression patterns of sex-determination genes in single male and female embryos of two *Bactrocera* fruit fly species during early development. *Insect Molecular Biology*, 23(6), 754–767. <https://doi.org/10.1111/imb.12123>
122. Muller, H. (1940). Bearings of the *Drosophila* work on systematics. *The New Systematics*, 185–268.
123. Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G. K., & Frati, F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology*, 14(9), 2729–2738.
124. Neuenschwander, P., Canard, M., & Michelakis, S. (1981). The attractivity of protein hydrolysate baited McPhail traps to different chrysopid and hemerobiid species (Neuroptera) in a Cretan olive orchard [Greece]. In *Annales de la Société Entomologique de France*.
125. Neuenschwander, P., & Michelakis, S. (1978). The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Journal of Applied Entomology*, 86(1-4), 420–433.
126. Neuenschwander, P., & Michelakis, S. (1981). Olive fruit drop caused by *Dacus oleae* (Gmel.) (Dipt. Tephritidae). *Journal of Applied Entomology*, 91(1-5), 193–205.
127. Newton, M. E., Wood, R. J., & Southern, D. I. (1978). Cytological mapping of the M and D loci in the mosquito, *Aedes aegypti* (L.). *Genetica*, 48(2), 137–143. <https://doi.org/10.1007/BF00127510>
128. Orphanidis, P. S., Patsakos, P. C., & Kalmoukos, P. E. (1966). Preliminary field experiments on the possibility of chemical sterilization of the adult olive fruit flies, *Dacus oleae* (Gmel.). *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki*, 7, 189–201.
129. Orphanidis, P. S., & Patsakos, P. G. (1963). Recherches en laboratoire sur la sterilization d'adultes de *Dacus oleae* Gmel. au moyen de Metaphoxide et d'Aphoxide (Comparaison avec les resultants obtenus sur *Ceratitis capitata* Wied.). *Ann. Inst. Phytopathol. Benaki*, 5, 305–322.
130. Pane, A., Salvemini, M., Delli Bovi, P., Polito, C., & Saccone, G. (2002). The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate Development. *Development*, 129, 3715–3725.
131. Paroush, Z., Finley, R. L., Kidd, T., Wainwright, S. M., Ingham, P. W., Brent, R., & Ish-Horowicz, D. (1994). groucho is required for *Drosophila* neurogenesis, segmentation, and sex determination and interacts directly with hairy-related bHLH proteins. *Cell*, 79, 805–815.
132. Pimpinelli, S., Berloco, M., Fanti, L., Dimitri, P., Bonaccorsi, S., Marchetti,

- E., ... Gatti, M. (1995). Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), 3804–3808. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.9.3804>
133. Presgraves, D. C., & Orr, H. A. (1998). Haldane's rule in taxa lacking a hemizygous X. *Science*, 282(5390), 952–954.
 134. Pultz, M. A., & Baker, B. S. (1995). The dual role of hermaphrodite in the *Drosophila* sex determination regulatory hierarchy. *Development*, 121, 99–111.
 135. Raja, S. J., & Renkawitz-pohl, R. (2005). Replacement by *Drosophila melanogaster* Proamines and Mst77F of Histones during Chromatin Condensation in Late Spermatids and Role of Sesame in the Removal of These Proteins from the Male Pronucleus. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 6165–6177. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.6165>
 136. Reugels, A. M., Kurek, R., Lammermann, U., & Bünemann, H. (2000). Mega-introns in the dynein gene *DhDhc7* (Y) on the heterochromatic Y chromosome give rise to the giant threads loops in primary spermatocytes of *Drosophila hydei*. *Genetics*, 154(2), 759–769.
 137. Rice, R., Phillips, P., Stewart-Leslie, J., & Sibbett, G. (2003). Olive fruit fly populations measured in central and southern California. *California Agriculture*, 57(4), 122–127.
 138. Rice, W. R. (1983). Sex Chromosomes and the Evolution of Sexual Dimorphism. *Evolution*, 38(4), 735–742.
 139. Rice, W. R. (1987). Genetic hitchhiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome. *Genetics*, 116(1), 161–167.
 140. Robinson, A. (2002). Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica*, 116, 5–13.
 141. Robinson, A., Franz, G., & Fisher, K. (1999). Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata*: Development, Mass Rearing and Field Application. *Trends in Entomology*, 2, 81–104.
 142. Rohr CJ, Ranson H, Wang X, B. N. (2002). Structure and evolution of *mtanga*, a retrotransposon actively expressed on the Y chromosome of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Molecular Biology and Evolution*, 19(2), 149–62.
 143. Ruiz, M.F., Milano, A., Salvemini, M., Eirin-Lopez, J. M., & Perondini, A.L.P., Selivon, D. et al. (2007). The gene Transformer of *Anastrepha* fruit flies (Diptera, Tephritidae) and its evolution in insects. *PLoS ONE*, 2, e1239.
 144. Russell, S. R. H., & Kaiser, K. (1993). *Drosophila melanogaster* Male Germ Line-Specific Transcripts With Autosomal and Y-Linked Genes. *Genetics*, 308, 293–308.
 145. S. Steinemann and M. Steinemann. (2004). Neo-X and Neo-Y Chromosomes in *Drosophila miranda*. In M. SCHMID & I. NANDA (Eds.), *Chromosomes Today* (1st ed., pp. 55–63). Kluwer Academic Publishers. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-1033-6>
 146. Sagri, E., Koskinioti, P., Gregoriou, M. E., Tsoumani, K. T., Bassiakos, Y. C., & Mathiopoulos, K. D. (2017). Housekeeping in Tephritid insects: The best gene choice for expression analyses in the medfly and the olive fly. *Scientific Reports*, 7(August 2016), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep45634>
 147. Salz, H. K., & Erickson, J. W. (2010). Sex determination in *Drosophila*: The view from the top. *Fly*, 4(1), 60–70.

148. Schütt, C., & Nöthiger, R. (2000). Structure, function and evolution of sex-determining systems in Dipteran insects. *Development (Cambridge, England)*, *127*(4), 667–677. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90247-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90247-4)
149. Scott, J. G., Liu, N., Kristensen, M., & Clark, A. G. (2009). A Case for Sequencing the Genome of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology*, *46*(2), 175–182. <https://doi.org/10.1603/033.046.0202>
150. Sharma, A., Heinze, S. D., Wu, Y., Kohlbrenner, T., Morilla, I., Brunner, C., ... Bopp, D. (2017). Male sex in houseflies is determined by *Mdmd*, a paralog of the generic splice factor gene *CWC22*. *Science*, *356*(6338), 642–645. <https://doi.org/10.1126/science.aam5498>
151. Sharon E. Benashski, Ramila S. Patel-King, S. M. K. (1999). Light Chain 1 from the Chlamydomonas Outer Dynein Arm Is a Leucine-Rich Repeat Protein Associated with the Motor Domain of the γ Heavy Chain. *Biochemistry*, *38*(22), 7253–7264. <https://doi.org/10.1021/bi990466y>
152. Shearman, D. C. A. (2002). The evolution of sex determination systems in dipteran insects other than *Drosophila*. *Genetica*, *116*(1), 25–43. <https://doi.org/10.1023/A:1020955507978>
153. Shearman, D. C. A., & Frommer, M. (1998). The *Bactrocera tryoni* homologue of the *Drosophila melanogaster* sex-determination gene doublesex. *Insect Molecular Biology*, *7*, 355–366.
154. Siegal, M. L., & Baker, B. S. (2000). The evolution of dosage-compensation mechanisms, 1106–1114.
155. Smith, C. D., Shu, S., Mungall, C. J., & Gary, H. (2010). The Release 5.1 Annotation of *Drosophila melanogaster* Heterochromatin. *Science*, *316*(5831), 1–14. <https://doi.org/10.1126/science.1139815>
156. Steinemann, M., & Steinemann, S. (1992). Degenerating Y chromosome of *Drosophila miranda*: a trap for retrotransposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(16), 7591–7595.
157. Steinemann, M., & Steinemann, S. (1997). The enigma of Y chromosome degeneration: TRAM, a novel retrotransposon is preferentially located on the neo-Y chromosome of *Drosophila miranda*. *Genetics*, *145*(2), 261–266.
158. Steinemann, M., Steinemann, S., & Lottspeich, F. (1993). How Y chromosomes become genetically inert. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(12), 5737–5741. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC46797/>
159. Steinemann, S., & Steinemann, M. (2005). Y chromosomes: Born to be destroyed. *BioEssays*, *27*(10), 1076–1083. <https://doi.org/10.1002/bies.20288>
160. Tian, M., & Maniatis, T. (1993). A splicing enhancer complex controls alternative splicing of doublesex pre-mRNA. *Cell*, *74*, 105–114.
161. Traut, W. (1994). Sex determination in the fly *Megaselia scalaris*, a model system for primary steps of sex chromosome evolution. *Genetics*, *136*(3), 1097–1104.
162. Traut, W., Sahara, K., & Marec, F. (2008). Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sexual Development*, *1*(6), 332–346. <https://doi.org/10.1159/000111765>
163. Traut, W., & Willhoeft, U. (1990). A jumping sex determining factor in the fly *Megaselia scalaris*. *Chromosoma*, *99*, 407–12.
164. Traut, W., & Wollert, B. (1998). *An X/Y DNA segment from an early stage of sex chromosome differentiation in the fly Megaselia scalaris. Genome /*

- National Research Council Canada = Génome / Conseil national de recherches Canada* (Vol. 41). <https://doi.org/10.1139/g98-015>
165. Tsiropoulos, G. J. (1984). Amino-acid synthesis in adult *Dacus oleae* (Gmelin)(Diptera Tephritidae) determined with [U-14C] glucose. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie*, *92*(4), 313–316.
 166. Tsoumani, K. T., Drosopoulou, E., Bourtzis, K., Gariou-Papalexioy, A., Mavragani-Tsipidou, P., Zacharopoulou, A., & Mathiopoulos, K. D. (2015). Achilles, a new family of transcriptionally active retrotransposons from the olive fruit fly, with y chromosome preferential distribution. *PLoS ONE*, *10*(9), 18–38. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137050>
 167. Tzanakakis, M. E. (2003). Seasonal development and dormancy of insects and mites feeding on olive: a review. *Netherlands Journal of Zoology*, *52*(2), 87–224.
 168. Van der Velden, V. H. J., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., & Van Dongen, J. J. M. (2003). Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, *17*(6), 1013.
 169. Van Doren, M., Ellis, H. M., & Posakony, J. W. (1991). The *Drosophila* extramacrochaetae protein antagonizes sequence-specific DNA binding by daughterless/achaete-scute protein complexes. *Development*, *113*, 245–255.
 170. Vibranovski, M. D., Koerich, L. B., & Carvalho, A. B. (2008). Two New Y-Linked Genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *179*(4), 2325–2327. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.086819>
 171. Vicoso, B., & Bachtrog, D. (2015). Numerous Transitions of Sex Chromosomes in Diptera. *PLoS Biology*, *13*(4), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002078>
 172. Wilkins, A. S. (1995). Moving up the hierarchy: A hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway. *BioEssays*, *17*(1), 71–77. <https://doi.org/10.1002/bies.950170113>
 173. Wu, C. I., & Xu, E. Y. (2003). Sexual antagonism and X inactivation - The SAXI hypothesis. *Trends in Genetics*, *19*(5), 243–247. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(03\)00058-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(03)00058-1)
 174. Yang, P., Fox, L., Colbran, R. J., & Sale, W. S. (2000). Protein phosphatases PP1 and PP2A are located in distinct positions in the *Chlamydomonas* flagellar axoneme. *Journal of Cell Science*, *102*, 91–102. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/113/1/91.short>
 175. Yi, S., & Charlesworth, B. (2000). Contrasting Patterns of Molecular Evolution of the Genes on the New and Old Sex Chromosomes of *Drosophila miranda*. *Molecular Biology and Evolution*, *17*(5), 703–717. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026349>
 176. Younger-Shepherd, S., Vaessin, H., Bier, E., Jan, L. Y., & Jan, Y. N. (1992). deadpan, an essential pan-neural gene encoding an HLH protein, acts as a denominator in *Drosophila* sex determination. *Cell*, *70*, 911–922.
 177. Zdobnov, E. M., Von Mering, C., Letunic, I., Torrents, D., Suyama, M., Copley, R. R., ... Subramanian, G. M. (2002). Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science*, *298*(5591), 149–159.
 178. Zhou, Q., & Bachtrog, D. (2015). Ancestral Chromatin Configuration Constrains Chromatin Evolution on Differentiating Sex Chromosomes in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *11*(6), 1–21.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005331>

179. Zurovcova, M., & Eanes, W. F. (1999). Lack of nucleotide polymorphism in the Y-linked sperm flagellar dynein gene Dhc-Yh3 of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics*, *153*(4), 1709–1715. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1460849/>

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Σε αυτό το σημείο, θα ήθελα να ευχαριστήσω, πρώτο απ' όλους, τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ Ματθιόπουλο Κων/νο που με δέχτηκε στο εργαστήριό του, με εμπιστεύθηκε και μου ανέθεσε την εν λόγω εργασία. Η καθοδήγησή του και οι συζητήσεις μας επί των προβλημάτων που προέκυπταν κατά την εκπόνηση αυτής της εργασίας αποτελούν εφόδια για την μετέπειτα πορεία μου.

Επίσης, ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ στην διδάκτορα Γρηγορίου Μαριλένα η οποία ήταν δίπλα μου σε κάθε κομμάτι της εργασίας και μου μετέδωσε τις γνώσεις της και την εμπειρία της! Δεν παραλείπω να αναφέρω και την μεταδιδάκτορα Τσουμάνη Κων/να η οποία έβρισκε χρόνο να ασχοληθεί και μαζί μου παρά τον όλο φόρτο εργασίας της και για αυτό την ευχαριστώ πάρα πολύ!

Τέλος ευχαριστίες αναλογούν και στους έτερους δύο καθηγητές που απαρτίζουν την τριμελή συμβουλευτική επιτροπή, κ Καρπούζα Δημήτριο και κα Σαραφίδου Θεολογία.

Στον πατέρα μου για την βοήθειά του...

