

Διπλωματική εργασία

**Εφαρμογή barcoding στην ταυτοποίηση ειδών
εντόμων**



Τασσόγλου Σπυρίδων

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Μαμούρης Ζήσης

**Καθηγητής Γενετικής Ζωικών
Πληθυσμών στο Τμήμα
Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

Μούτου Αικατερίνη

**Αναπληρώτρια Καθηγήτρια
Βιολογίας Σπονδυλωτών στο
Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

Αμούτζιας Γρηγόριος

**Λέκτορας Βιοπληροφορικής
στη Γενωμική στο Τμήμα
Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας**

Περίληψη

Η χρήση μοριακών δεικτών και κυρίως του μιτοχονδριακού DNA αποτελεί πλέον μια διαδεδομένη μέθοδο για την ταυτοποίηση ειδών, τη μελέτη της βιοποικιλότητας, τη διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ οργανισμών, την ιχνηλασιμότητα τροφίμων κτλ. Η δυνατότητα αυτή του μιτοχονδριακού DNA προκύπτει από το γεγονός ότι εξελίσσεται ταχύτερα από το πυρηνικό γονιδίωμα (~10 φορές) και εμφανίζει τόσο συντηρημένες περιοχές μεταξύ των ειδών, ώστε να είναι δυνατός ο σχεδιασμός εκκινητών που θα ενισχύσουν τα αντίστοιχα τμήματα σε ένα μεγάλο εύρος οργανισμών, όσο και πολυμορφικές, ώστε να είναι δυνατός ο γενετικός διαχωρισμός τους. Το τμήμα που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως μέχρι σήμερα είναι ένα μέρος του γονιδίου της υπομονάδας I της οξειδάσης του κυτοχρώματος (COI). Παρόλα αυτά, υπάρχει η δυνατότητα ανάπτυξης νέων μοριακών δεικτών, οι οποίοι θα παρέχουν επιπλέον πληροφορίες και θα συνεισφέρουν στον αποτελεσματικότερο διαχωρισμό των ειδών. Για το σκοπό αυτό, επιλέχθηκε ένα τμήμα του μιτοχονδριακού γονιδίου που κωδικοποιεί για τη μεγάλη ριβοσωμική υπομονάδα (16S rRNA) ώστε να ελεγχθεί η καταλληλότητά του να διαχωρίσει διάφορα είδη εντόμων ως μοριακός δείκτης. Το συγκεκριμένο τμήμα έχει χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν με επιτυχία για το διαχωρισμό ειδών θηλαστικών, πτηνών, ερπετών, ψαριών και μαλακίων. Το εν λόγω τμήμα ενισχύθηκε με επιτυχία σε 62 είδη εντόμων, τα οποία προέρχονται από ξεχωριστές τάξεις (κολεόπτερα, ορθόπτερα, δίπτερα). Στη συνέχεια, τα προϊόντα της PCR αλληλουχήθηκαν για να μελετηθεί ο γενετικός πολυμορφισμός μεταξύ των ειδών. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν, φαίνεται ότι το τμήμα του γονιδίου 16S rRNA είναι ικανό να διαχωρίσει αποτελεσματικά τα διαφορετικά είδη εντόμων, ακόμα και αν ανήκουν στο ίδιο γένος, και να παρέχει πληροφορίες για τις εξελικτικές τους σχέσεις.

Abstract

The use of genetic markers, and especially those derived from mitochondrial DNA, is a widespread method to identify species and to investigate biodiversity and interspecific relationships, as well as food traceability. Mitochondrial DNA contains well conserved sequences, enabling the design of primers able to amplify the same region in a wide range of organisms, as well as highly variable sequences, that allow interspecific distinction. The most widely used genetic marker is part of the subunit I cytochrome oxidase gene (*COI*). However, the need to develop new, supplementary genetic markers that will contribute to more effective distinction of species still exists. On that cause, part of the *16S rRNA* gene has been selected to test its suitability to separate insect species. In the past, this sequence has been successfully used to separate mammal, bird, reptile, fish and mollusk species. In this recent study it was amplified successfully in 62 insect species originating from different taxa (coleoptera, orthoptera, diptera). The PCR products were sequenced in order to study the genetic variability between these species. The results indicate that the analyzed *16S rRNA* sequence can be used effectively to distinguish different insect species, even those sharing the same genus, and provide additional information concerning their evolutionary relationship.

Περιεχόμενα

| | |
|--|----|
| Εισαγωγή | 6 |
| Μοριακοί-Γενετικοί Δείκτες | 6 |
| DNA Barcoding | 8 |
| Χρησιμότητα του DNA Barcoding | 9 |
| Κριτήρια επιλογής ενός δείκτη ως DNA barcode | 10 |
| Τα χαρακτηριστικά του μιτοχondριακού DNA (mtDNA) | 11 |
| Γονίδιο της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (<i>COI</i>) | 13 |
| Φαινόμενα – παγίδες κατά τη χρήση mtDNA για DNA barcoding | 13 |
| Υλικά και Μέθοδοι | 16 |
| 1. Δείγματα εντόμων | 16 |
| 2. Απομόνωση DNA | 17 |
| 3. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA | 19 |
| 4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) | 19 |
| 5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης | 22 |
| 6. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism) | 23 |
| 7. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο | 25 |
| 8. Αλληλούχηση και ανάλυση αλληλουχιών | 26 |
| Αποτελέσματα και Συζήτηση | 29 |
| 1. Έλεγχος του διαειδικού πολυμορφισμού του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA | 29 |
| 2. Έλεγχος του ενδοειδικού πολυμορφισμού του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA. | 36 |
| 3. Ανάλυση της θέσης του τμήματος που ενισχύθηκε | 36 |
| Συμπεράσματα | 38 |
| Βιβλιογραφία | 39 |
| Ευχαριστίες | 41 |

Εισαγωγή

Κάθε οργανισμός, μονοκύτταρος και πολυκύτταρος, και στην περίπτωση των πολυκύτταρων κάθε κύτταρό τους, ξοδεύει σημαντικά ποσά ενέργειας για να διατηρήσει και να μεταβιβάσει στην επόμενη γενιά το γονιδίωμά του ανέπαφο. Είναι συναρπαστικό το γεγονός ότι η εξέλιξη, διαδικασία της οποίας κινητήριος δύναμη είναι οι μεταλλάξεις, έχει σχεδιάσει με αργά βήματα εργαλεία που αποτρέπουν την εμφάνιση πολλών μεταλλάξεων, ή, πιο σωστά, διατηρούν το ρυθμό εμφάνισής τους σε επίπεδα τέτοια ώστε να εξασφαλίζεται αφενός η γέννηση σταθερών, βιώσιμων ατόμων και η διατήρηση πολλών ειδών, εφετέρου δε, η συνέχιση της εξελικτικής πορείας. Από τα εργαλεία αυτά, κάποιες φορές θα ξεφύγει κάποια μετάλλαξη. Μπορεί να είναι θνησιγόνος· μπορεί να είναι κρυπτική· μπορεί και να αποτελεί το πρωταρχικό βήμα μίας μακριάς διαδικασίας, όπως η ειδογένεση. Βλέπουμε λοιπόν πως έχουμε, όλοι οι οργανισμοί διπτή φύση: είμαστε γρανάζια της εξελικτικής πορείας και ταυτόχρονα είμαστε ζωντανά αρχεία της ζωής στη γη. Άθελά μας είμαστε ιστοριογράφοι.

Η επιστήμη της Εξέλιξης, η ταξινομική και η φυλογένεση, έρχονται να αξιοποιήσουν τα κομμάτια που κρύβουμε μέσα μας, να τα αναλύσουν και να αποκρυπτογραφήσουν την Ιστορία της Ζωής. Στο παρελθόν χρησιμοποιήθηκαν αμιγώς μορφολογικά κριτήρια για να εξαχθούν συμπεράσματα και αξίζει το θαυμασμό μας το πόσο πολύ ωθήθηκε η εξελικτική σκέψη με τόσο πενιχρά μέσα. Σήμερα κατέχουμε μοριακά πια εργαλεία. Κάνουμε ανάλυση αλληλουχιών, έχουμε δηλαδή πρόσβαση στο αρχείο καθ'αυτό και η διακριτική μας ικανότητα διαρκώς αυξάνεται. Εξελισσόμαστε.

Μοριακοί-Γενετικοί Δείκτες

Ένας μοριακός δείκτης είναι μία αλληλουχία DNA με γνωστό εντοπισμό στο γονιδίωμα που χρησιμοποιείται με στόχο το διαχωρισμό, ή την ομαδοποίηση δειγμάτων. Επιλέγοντας τον ανάλογο δείκτη είναι δυνατόν να επιλυθούν ερωτήματα που αφορούν σε διαφορετικές ταξινομικές ομάδες και αυτό επειδή ο

ρυθμός μεταλλαξιγένεσης – και κατ'επέκταση ποικιλομορφίας και εξέλιξης – διαφέρει από τόπο (locus) σε τόπο. Έτσι γίνεται να μελετηθεί η πολυμορφικότητα κάποιου γονιδιακού τόπου μέσα σε έναν πληθυσμό, μεταξύ δύο γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών του ίδιου είδους, μεταξύ ειδών του ίδιου γένους κ.ο.κ..

Το κόστος της αλληλούχησης του DNA, τουλάχιστον όπως αυτή αναπτύχθηκε το 1977 από το Sanger και συναδέλφους, ήταν απαγορευτικό για αξιοποίηση σε ευρεία κλίμακα, οπότε το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε στις τεχνικές που βασίζονται στους μοριακούς δείκτες. Οι πιο γνωστές από αυτές περιγράφονται επιγραμματικά παρακάτω:

1) RFLP (Restriction fragment length polymorphism): Οι αλληλουχίες πέπτονται με ένζυμα περιορισμού και τα προϊόντα της πέψης ηλεκτροφορούνται και διαχωρίζονται ανάλογα με το μέγεθός τους, δημιουργώντας διαφορετικά προφίλ για αλληλουχίες που διαφέρουν ακόμα και σε ένα νουκλεοτίδιο.

2) RAPD (Random amplification of polymorphic DNA): Ενισχύονται με PCR τυχαίες αλληλουχίες από τα δείγματα χρησιμοποιώντας αρκετούς τυχαίους (arbitrary) εκκινητές. Οι εκκινητές σε κάποια δείγματα θα ενισχύσουν ένα τμήμα DNA, ενώ σε άλλα, όπου έχουν υποστεί κάποια μετάλλαξη και δεν εμφανίζεται συμπληρωματικότητα, όχι.

3) SSR (Single sequence repeat): Πρόκειται για επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA 2-6 bp. Τα άτομα ενός πληθυσμού φέρουν διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων.

4) SSCP (Single strand conformation polymorphism): Τα PCR προϊόντα υφίστανται μία διαδικασία αποδιάταξης και ηλεκτροφορούνται σε πηκτή. Τα μονόκλωνα, αποδιατεταγμένα τμήματα ανάλογα με τους πολυμορφισμούς τους αποκτούν διαφορετικές διαμορφώσεις στο χώρο και μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα στην πηκτή σχηματίζοντας ξεχωριστά πρότυπα.

Οι γενετικοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την πραγματοποίηση φυλογενετικών αναλύσεων, τη μελέτη εξελικτικών αποστάσεων μεταξύ ειδών και την ερμηνεία εξελικτικών φαινομένων (π.χ. στενωπός, φαινόμενο ιδρυτή κ.α.), την ανάλυση της βιοποικιλότητας μίας περιοχής και την ανάπτυξη στρατηγικών προστασίας της βιολογικής σταθερότητας, ή αναδόμησής της. Επίσης βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στη διαλεύκανση των αιτίων

πολλών γενετικών ασθενειών και στην εύρεση γονιδιακών θεραπειών.

DNA Barcoding

Με το σχεδιασμό μεθόδων συγκριτικής ανάλυσης αλληλουχιών και το κόστος της αλληλούχησης να φθίνει συνεχώς, έχει αυξηθεί σημαντικά η ικανότητά μας να ταυτοποιούμε είδη, να ανακαλύπτουμε νέα κρυπτικά και να χρησιμοποιούμε τα στοιχεία αυτά προς την επίλυση μεγάλων βιολογικών ζητημάτων. Η διατήρηση της βιοποικιλότητας, η διασφάλιση της βιοασφάλειας, η προστασία ειδών υπό εξαφάνιση, η αποφυγή πανδημιών, αλλά και πιο ακαδημαϊκής φύσης θέματα όπως η αποκρυπτογράφηση των κανόνων της εξέλιξης και η αποσαφήνιση των ορίων μεταξύ των ειδών αποτελούν ερωτήματα των οποίων η απάντηση εξαρτάται, άμεσα ή έμμεσα από την ταξινομική και τις δυνατότητες ταυτοποίησης.

Το DNA Barcoding είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιεί έναν, σχετικά μικρού μήκους, μοριακό δείκτη για να ταυτοποιήσει ότι ο υπό μελέτη οργανισμός ανήκει σε ένα συγκεκριμένο είδος. Βασίζεται στην ιδέα ότι αυτός ο μοριακός δείκτης εμφανίζει την κατάλληλη πολυμορφικότητα ώστε να διαφέρει σε όλα τα είδη. Επομένως, σε κάθε είδος αποδίδεται μία μοναδική μοριακή ταυτότητα.

Με το παραπάνω σκεπτικό, συγκροτήθηκε το 2004 το CBOL (Consortium for the Barcode Of Life), ένα διεθνές εγχείρημα που απαρτίζεται από περισσότερους από 150 οργανισμούς από 45 χώρες και συστάθηκε η βάση δεδομένων Barcode Of Life Data system (BOLD), όπου υποβάλλονται DNA barcodes από είδη που έχουν ήδη ταυτοποιηθεί. Έτσι, δίνεται σε ταξινομικούς, αλλά και σε λιγότερο ειδήμονες, πρόσβαση σε ένα αξιόπιστο, εύχρηστο και φτηνό εργαλείο ταυτοποίησης ειδών (Frezal & Leblois, 2008).

Αξίζει να παρατηρηθεί ότι το CBOL δεν αποσκοπεί στην κατασκευή του Δέντρου της Ζωής, ούτε και κάνει μοριακή ταξινόμηση (Ebach & Holdrege, 2005)· χρησιμεύει – μαζί με το BOLD – ως ένα απλό και αξιόπιστο διαγνωστικό εργαλείο που *βασίζεται* στα υπάρχοντα ταξινομικά δεδομένα (Schindel & Miller,

2005).

Χρησιμότητα του DNA Barcoding

Το DNA barcoding είναι ένα πολυχρηστικό εργαλείο με πολλές εφαρμογές στην οικολογία, την εξελικτική βιολογία, τη βιολογία συντήρησης, τη βιογεωγραφία, την επιδημιολογία και τη βιοϊατρική, καθώς και σε βιομηχανίες που σχετίζονται με βιολογικά προϊόντα. Έχει αναδειχθεί, τόσο η αξία του για την βιολογία και την υγεία, με τη χρήση του για την ανίχνευση άγνωστων ειδών και την ταυτοποίηση παθογόνων αντίστοιχα (Armstrong & Ball, 2006), όσο και η οικονομική του σημασία, καθώς έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την αξιολόγηση του μέτρου διασποράς πατενταρισμένων οργανισμών στην αγροτική βιοτεχνολογία (Rastogi et al., 2007).

Καθαρά στην ταξινόμηση των ειδών έχει βοηθήσει σε περιπτώσεις όπου μόνο τα μορφολογικά στοιχεία δεν επαρκούν για την ταξινόμηση (Litaker et al., 2007; Evans et al., 2007; είδη κόκκινων φυκών, Saunders, 2005), ή όταν τα είδη παρουσιάζουν έντονη φαινοτυπική πλαστικότητα (φαιοφύκη της τάξης Laminariales, Lane, 2007). Επίσης πολλά είδη είναι δύσκολο να ταυτοποιηθούν στα πρώιμα αναπτυξιακά τους στάδια, και με DNA barcodes έχει καταστεί δυνατή η αντιστοίχισή τους με τα ενήλικα (ψάρια, Pegg et al., 2006; κολεόπτερα, Caterino & Tishechkin, 2006; αμφίβια, Randrianiaina et al., 2007). Ακόμα, όταν ο υπό μελέτη οργανισμός έχει υποστεί επεξεργασία, ή είναι μερικώς κατεστραμμένος, για παράδειγμα σε δείγματα από τρόφιμα ή εκχυλίσματα του στομάχου, η κατάταξη καθαρά με μορφολογικά κριτήρια και χωρίς DNA barcodes είναι ανέφικτη (Frezal & Leblois, 2008). Τέλος, γίνεται προσπάθεια να αναπτυχθούν τεχνικές με βάση το DNA barcoding με στόχο την ταυτοποίηση παρασίτων σε περιπτώσεις συμβιωτικών σχέσεων (Besansky, 2003; Berkov, 2007).

Γενικότερα η φιλοσοφία του εγχειρήματος CBOL προωθεί την επεξεργασία από κοινού δεδομένων για το ίδιο είδος από πολλές

γεωγραφικές περιοχές, επομένως κατ' ανάγκη οδηγεί σε περαιτέρω πληθυσμιακή μελέτη (Hajibabaei, 2007) και ανακάλυψη νέων ειδών (DeSalle, 2005). Τα στοιχεία που συλλέγονται απαντούν κάποια ερωτήματα και ταυτόχρονα δημιουργούν καινούργια, των οποίων η επίλυση είναι πολύσημη, καθώς ευνοεί αφενός την ταξινομική, αφετέρου δε τη μοριακή φυλογένεση και την πληθυσμιακή γενετική (Hajibabaei, 2007).

Κριτήρια επιλογής ενός δείκτη ως DNA barcode

Ένας γενετικός τόπος για να θεωρηθεί κατάλληλος να χρησιμοποιηθεί ως DNA barcode πρέπει να πληροί ορισμένα βασικά κριτήρια: πρέπει να εμφανίζει κατάλληλο ρυθμό εξέλιξης, αρκετά ταχύ ώστε να εμφανίζονται πολυμορφισμοί διαειδικά – ιδανικά και μεταξύ των υποειδών – και ταυτόχρονα αρκετά αργό ώστε ενδοειδικά να παρατηρείται μονομορφισμός. Εκατέρωθεν του γενετικού τόπου υπό ενίσχυση πρέπει να υπάρχουν πολύ καλά συντηρημένες αλληλουχίες, ώστε να επιτρέπεται ο σχεδιασμός παγκόσμιων (universal) εκκινήτων, εκκινήτων δηλαδή που να μην είναι ειδοειδικοί και να μπορούν με αξιοπιστία να χρησιμοποιηθούν για να ενισχύσουν το συγκεκριμένο τόπο, και μόνο αυτόν, σε όλα, ή σε ικανοποιητικό αριθμό ειδών. Το μέγεθος της αλληλουχίας πρέπει να είναι αρκετά μεγάλο ώστε να προσφέρει αριθμό πολυμορφισμών ικανό να διαχωρίσει κάθε είδος αλλά και τόσο μικρό ώστε να είναι δυνατή η αλληλούχησή της σε μία μόνο αντίδραση (Ferri et al., 2009).

Τις προϋποθέσεις αυτές φέρονται να καλύπτουν επαρκώς κάποια τμήματα του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) με το γονίδιο που κωδικοποιεί για την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) να χρησιμοποιείται με μεγάλη επιτυχία σε πληθώρα φυλογενετικών μελετών και αναλύσεων σχετικών με το DNA barcoding των ζωικών οργανισμών.

Τα χαρακτηριστικά του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA)

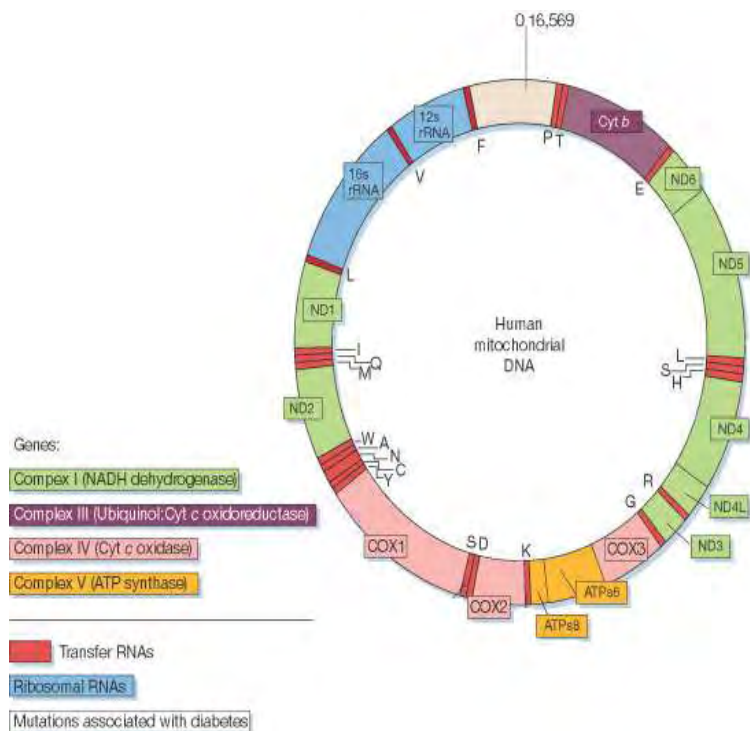
Το mtDNA είναι το DNA που βρίσκεται μέσα στα μιτοχόνδρια, υποκυτταρικά οργανίδια των ευκαρυωτικών με κύρια λειτουργία την οξειδωση των καταβολικών προϊόντων των τροφών προς παραγωγή ATP (αερόβια αναπνοή).

Το mtDNA χαρακτηρίζεται ως μητρικής προέλευσης, καθώς κληρονομείται σχεδόν αποκλειστικά από τη μητέρα (Hoeh et al., 1991). Το ωάριο περιέχει κατά μέσο όρο τρεις τάξεις μεγέθους περισσότερα μιτοχόνδρια από το σπερματοζώαριο. Τα περισσότερα μιτοχόνδρια στο σπερματοζώαριο τροφοδοτούν την προπελοειδή κίνηση της ουράς, η οποία συνήθως αποκόπτεται και δεν εισέρχεται στο ωάριο. Σε μερικά είδη, οι μιτοχονδριακές δομές πατρικής προέλευσης που τυγχάνει να βρεθούν στο εσωτερικό του ωαρίου έχει βρεθεί πως μαρκάρονται με τη διαδικασία της ουβικουιτινίωσης, ώστε στη συνέχεια να καταστραφούν (Sutovsky et al., 1999).

Στην πλειοψηφία των πολυκύτταρων οργανισμών, το mtDNA είναι δίκλωνο κυκλικό μόριο που υφίσταται σε πολλά αντίγραφα (στον άνθρωπο 100-100.000) με μήκος, στα θηλαστικά, 15.000-17.000 bp. Στερείται ιντρονίων και χαρακτηρίζεται από περιορισμένη έκθεση σε ανασυνδυασμό. Επίσης, χάρη στο γεγονός ότι κληρονομείται μόνο από τον ένα γονέα, το πιο σύνηθες είναι όλα τα mtDNA ενός κυττάρου να είναι ίδια, να παρατηρείται δηλαδή το φαινόμενο της ομοπλασμίας (Saccone, 1999), αν και υπάρχουν περιπτώσεις όπου συμβαίνει ετεροπλασμία (Terranova, 2007).

Δομικά, οι δύο κλώνοι του mtDNA διαφέρουν· η μία αλυσίδα είναι πλούσια σε γουανίνες και αποκαλείται βαριά (H-strand), ενώ η δεύτερη που πλούσια σε κυτοσίνες χαρακτηρίζεται ως ελαφριά αλυσίδα (L-strand). Η H-strand κωδικοποιεί 28 γονίδια και η L-strand 9. Από αυτά τα 37 γονίδια, 13 μεταφράζονται σε πρωτεΐνες, 22 μεταγράφονται σε tRNAs και τα εναπομείναντα 2 αντιστοιχούν στη μικρή (12S) και τη μεγάλη (16S) ριβοσωμική υπομονάδα

(Εικόνα 1.). Αυτό το μοτίβο εμφανίζεται με σπάνιες διαφοροποιήσεις σε όλα τα μετάζωα, ενώ στους μύκητες και τα φυτά παρουσιάζεται μεγαλύτερη ποσοτική και ποιοτική ποικιλομορφία στο mtDNA, αν και σε γενικές γραμμές τα παραπάνω γονίδια, ή ομόλόγά τους, είναι παρόντα (Russell, 2009).



Εικόνα 1. Η διάρθρωση του ανθρώπινου mtDNA

Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιεί το mtDNA είναι οι 7 υπομονάδες της αφυδρογονάσης του NADH (*ND1*, 2, 3, 4, 4*L*, 5, 6), οι τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος C (*COI*, *II*, *III*), οι δύο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (*ATP6*, 8) και το κυτόχρωμα b (*CYTb*).

Τα χαρακτηριστικά του mtDNA το καταδεικνύουν ως μία καλή δεξαμενή για εύρεση μοριακών δεικτών με ευρεία εφαρμογή σε φυλογενετικές μελέτες. Στα γονίδια του mtDNA δεν παρεμβάλλονται ιντρόνια, κληρονομείται απλοειδώς και παρατηρούνται σπάνια ανασυνδυασμοί, αντίθετα με το πυρηνικό DNA (nDNA), όπου όλες οι παραπάνω συνθήκες θα έπρεπε να ληφθούν υπ'όψιν στην εξαγωγή συμπερασμάτων. Απουσιάζουν δε και αρκετοί από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς που παρατηρούνται στο nDNA με αποτέλεσμα ο μέσος ρυθμός εξέλιξης του mtDNA να είναι περίπου 10 φορές μεγαλύτερος. Επιτρέπεται έτσι να βρεθούν πολυμορφισμοί στις χαμηλότερες ταξινομικές βαθμίδες οι οποίοι να αντικατοπτρίζουν διαφορές που με χρήση πυρηνικού DNA θα ήταν δυσδιάκριτες.

Γονίδιο της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI)

Το CBOL επέλεξε ως DNA barcode ένα τμήμα μήκους 648bp στο 5' άκρο του COI, του γονιδίου που κωδικοποιεί για την υπομονάδα I της κυτοχρωμικής οξειδάσης.

Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι ένα διαμεμβρανικό ενζυμικό σύμπλοκο που εδράζεται στη μεμβράνη του μιτοχονδρίου και καταλύει την αναγωγή του οξυγόνου σε νερό. Πρόκειται για το τελευταίο ενζυμικό σύμπλοκο-αποδέκτη ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα. Στα θηλαστικά αποτελείται από 14 υπομονάδες, 11 πυρηνικής και 3 μιτοχονδριακής προέλευσης.

Η υπομονάδα I είναι το καταλυτικό κέντρο του συμπλόκου, επομένως ήταν αναμενόμενο να είναι πολύ καλά συντηρημένη ανά τα είδη, ειδικά αφού εμπλέκεται σε μία τόσο σημαντική διαδικασία όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση. Εντούτοις, κυρίως χάρη στον εκφυλισμό του γενετικού κώδικα, παρατηρούνται πολυμορφισμοί και ο εξελικτικός ρυθμός της κρίνεται κατάλληλος για μελέτες στο επίπεδο του είδους.

Φαινόμενα – παγίδες κατά τη χρήση mtDNA για DNA barcoding

- Έχουν καταγραφεί από μελετητές περιπτώσεις όπου άτομα του ίδιου είδους με διαφορετικές διατροφικές συνήθειες, παρουσιάζουν διαφορετικό μιτοχονδριακό προφίλ (*H. mermerodes*, Hulcr et al, 2007). Το γεγονός αυτό μπορεί να σηματοδοτεί την απαρχή μίας διαδικασίας ειδογένεσης και σίγουρα αναδεικνύει πώς το DNA barcoding μπορεί να συνδράμει και σε άλλους κλάδους της βιολογίας (π.χ. μοριακή οικολογία), μα ταυτόχρονα υπογραμμίζει τη σημασία της ανάλυσης σε βάθος των εκάστοτε δεδομένων για την αποφυγή εξαγωγής λάθος συμπερασμάτων.

- Επίσης, έχουν παρατηρηθεί εξαιρέσεις στον κανόνα της μητρικής κληρονομικότητας. Ενώ θεωρείται πως το μητρικό και το πατρικό mtDNA δεν αναμειγνύονται στους απογόνους, έχουν υπάρξει περιπτώσεις ετεροπλασμίας στις οποίες υπάρχει η πιθανότητα γενετικού ανασυνδυασμού μεταξύ των mtDNA μητρικής και πατρικής προέλευσης (Terranova, 2007, Russell, 2009). Πρέπει λοιπόν κανείς να εξετάζει με ιδιαίτερη προσοχή συμπεράσματα που εξάγονται με βάση τη θεώρηση ότι το mtDNA κληρονομείται αποκλειστικά από το θηλυκό γονέα.
- Ένα ακόμα σημείο που απαιτεί την προσοχή των ερευνητών που χρησιμοποιούν mtDNA είναι η επιμόλυνση από μικροοργανισμούς. Έχει αποδειχτεί ότι ενδοσυμβιωτικά βακτήρια, όπως η *Wolbachia*, είναι συχνά υπεύθυνα για διαειδική γονιδιακή ροή μιτοχονδριακών γονιδίων. (Dasmahapatra, 2006). Ακόμα, ο Hurst και συνάδελφοι (1999), έχουν εξετάσει περιπτώσεις ψευδούς ενδοειδικής ποικιλομορφίας στο mtDNA που οφειλόταν σε συμβίωση του ξενιστή με τρία διαφορετικά παθογόνα (*Spiroplasma*, *Rickettsia* και *Wolbachia*).
- Στους ευκαρυώτες είναι δυνατόν αντίγραφα του mtDNA να μετατεθούν μέσα στο πυρηνικό DNA (Nuclear Mitochondrial DNAs, NUMTs), με ποικιλία στα μεγέθη και τον αριθμό των αντιγράφων ανά είδος. Η παρουσία των NUMTs περιπλέκει ιδιαίτερα τόσο την ταυτοποίηση των δειγμάτων, όσο και τη δημιουργία μίας βάσης δεδομένων, όπως αυτή του CBOL (Willams & Knowlton, 2001).
- Ο ρυθμός εξέλιξης διαφέρει μεταξύ των ειδών. Το mtDNA στα μαλάκια εξελίσσεται ταχέως, ενώ στα κνιδόζωα τόσο αργά που είναι αδύνατος ο διαχωρισμός κάτω από το επίπεδο της οικογένειας με χρήση του *COI* γονιδίου. Η διαχωριστική αδυναμία που χαρακτηρίζει το εν λόγω γονίδιο σε κάποιες περιπτώσεις ωθεί το CBOL να αλλάξει πολιτική και να στραφεί, όπου κρίνεται απαραίτητο, από την καθιερωμένη μέθοδο barcoding μίας περιοχής (*COI* – barcoding), προς ένα σύστημα πολλαπλών περιοχών (non *COI* – barcoding)

(Baker, 2007).

- Ένας παράγοντας που αποτελεί πρόκληση για την όλη λογική του εγχειρήματος του CBOL είναι η υψηλή ενδοειδική ποικιλομορφία που εμφανίζεται κάποιες φορές μεταξύ γεωγραφικά απομονωμένων πληθυσμών. Το DNA barcoding αναδεικνύει τη δυσκολία της επιστημονικής κοινότητας να αποδώσει στο είδος έναν θεωρητικό ορισμό που να είναι εναρμονισμένος με τα εκάστοτε επιστημονικά δεδομένα (Frezal & Leblois, 2008).

Το DNA barcoding αποτελεί έναν ισχυρό δείκτη ταυτοποίησης δειγμάτων για τους καλά ταξινομημένους κλάδους του δέντρου της ζωής (Meyer & Paulay, 2005). Μέχρι στιγμής έχουν χαρακτηριστεί και ταξινομηθεί περίπου 1.2 εκατομμύρια είδη. Ωστόσο, υπολογίζεται ότι περίπου το 86% της εδαφικής και το 91% της θαλάσσιας βιοποικιλότητας παραμένει αχαρτογράφητο (Mora et al., 2011).

Υλικά και Μέθοδοι

1. Δείγματα εντόμων

Στην εργασία μελετήθηκαν 62 δείγματα εντόμων από 3 τάξεις [Κολεόπτερα (*Coleoptera*), Ορθόπτερα (*Orthoptera*) και Δίπτερα (*Diptera*)]. Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν, ομαδοποιημένα κατά τάξη και οικογένεια.

Πίνακας 1. Κατηγοριοποίηση των δειγμάτων

| Coleoptera | | |
|---|----------------------------------|---------------------------------|
| Scarabaeidae | Cerambycidae | Orthoptera |
| <i>Melolontha hippocastani a</i> | <i>Ergates sp. 1 a</i> | Tettigoniidae |
| <i>Melolontha hippocastani b</i> | <i>Ergates sp. 1 b</i> | <i>Saga nataliae</i> |
| <i>Melolontha melolontha</i> | <i>Dorcadion sp.1</i> | <i>Saga rhodiensis</i> |
| <i>Hanneton sp.</i> | <i>Dorcadion sp.2</i> | <i>Saga ranmei</i> |
| <i>Cyclocephala melanocephala rubiginosa sp.1 a</i> | <i>Dorcadion sp.3</i> | <i>Saga hellenica</i> |
| <i>Cyclocephala melanocephala rubiginosa sp.1 b</i> | <i>Dorcadion fuliginator</i> | <i>Bradyporus dasypus</i> |
| <i>Cyclocephala melanocephala rubiginosa sp.2</i> | <i>Dorcadion aethiops</i> | Diptera |
| <i>Cyclocephala tridentata sp.1</i> | <i>Neodorcadion sp.</i> | Culicidae |
| <i>Cyclocephala tridentata sp.2 a</i> | <i>Plagionotus arcuatus 1</i> | <i>Ochlerotatus caspius a</i> |
| <i>Cyclocephala tridentata sp.2 b</i> | <i>Plagionotus arcuatus 2</i> | <i>Ochlerotatus caspius b</i> |
| <i>Cyclocephala tridentata tridentata</i> | <i>Aegosoma scabricorne a</i> | <i>Ochlerotatus caspius c</i> |
| <i>Cyclocephala insulicola</i> | <i>Aegosoma scabricorne b</i> | <i>Culex pipiens pipiens</i> |
| <i>Cyclocephala mafaffa</i> | <i>Oberea oculata</i> | <i>Culex modestus</i> |
| <i>Macraspis tristis</i> | <i>Oberea bipunctata</i> | <i>Coquillettidia richardii</i> |
| <i>Amphimallon solstitiale</i> | <i>Obezema pupillata</i> | <i>Anopheles labranchiae</i> |
| <i>Anomala solide</i> | <i>Niphona grisea</i> | <i>Aedes vexans</i> |
| <i>Haplidia transversa</i> | <i>Phytoecia nigricornis</i> | <i>Chironomus plumosus</i> |
| <i>Philleurus deshave</i> | <i>Morimus asper</i> | |
| <i>Oryctes nasicornis</i> | <i>Morimus funereus</i> | |
| <i>Rhizotrogus sp.</i> | <i>Monochamus sutor</i> | |
| <i>Scarabaeus sp.</i> | <i>Vadonia imitatrix</i> | |
| Curculionidae | <i>Pedostrangalia verticalis</i> | |
| <i>Eupotosia mirifica</i> | <i>Saperda scalaris</i> | |
| Tenebrionidae | <i>Leptura maculata</i> | |
| <i>Blaps sp.</i> | <i>Parmena sp.</i> | |

2. Απομόνωση DNA

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Budowle (1990), με κατάλληλες τροποποιήσεις. Τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα εξής :

CH₃COONa 0,2M (200ml)

- 3,28 gr CH₃COONa
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

Sodium Dodecyl Sulphate 5% (SDS)

- 5 gr SDS
- ddH₂O μέχρι τα 200 ml

➤ Για κάθε απομόνωση τοποθετούνται 50-100 mg καλά τεμαχισμένου ιστού σε σωληνάκι των 2 ml και προστίθενται 500μl CH₃COONa 0,2 M, 50 μl SDS 5% και 10 μl πρωτεΐνάση K 10 mg/ml.

➤ Τα δείγματα επωάζονται υπό ανάδευση στους 55° C για μία ώρα.

Προστίθενται 500μl φαινόλη και 500μl χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1), ακολουθεί ανάδευση σε συσκευή vortex και φυγοκέντριση στις 13000 στροφές σε θερμοκρασία 4° C για 10 λεπτά.

➤ Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι, όπου προστίθεται 1ml χλωροφόρμιο/ισοαμυλική αλκοόλη (24:1) και ακολουθεί ανάδευση με vortex και φυγοκέντριση στις 13000rpm στους 4° C για 5 λεπτά.

➤ Το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωληνάκι, προστίθεται 1ml παγωμένη ισοπροπανόλη τα δείγματα αναδεύονται ήπια και τοποθετούνται στους -20° C για 20 λεπτά.

➤ Ακολουθεί φυγοκέντριση στις 13000rpm στους 4° C για 20 λεπτά και απομάκρυνση του υπερκείμενου με προσοχή ώστε η πελέτα να παραμείνει στο σωληνάκι. Προστίθεται 1ml αιθανόλη 70% και τα δείγματα αναδεύονται ήπια και φυγοκεντρώνονται εκ νέου στις 13000rpm στους 4° C για 5 λεπτά.

- Απομακρύνεται το υπερκείμενο και τα δείγματα τοποθετούνται στους 37° C, ώστε να εξατμιστεί εντελώς η αιθανόλη. Στη συνέχεια προστίθενται 100μl ddH₂O για να επαναδιαλυθεί το ίζημα και τα δείγματα φυλάσσονται, είτε στο ψυγείο, στους 4° C, είτε στην κατάψυξη, στους -20° C.

Το διάλυμα οξικού νατρίου προκαλεί λύση των κυτταρικών μεμβρανών μεταβάλλοντας την οσμωτική πίεση. Το SDS είναι ένα ιονικό απορρυπαντικό που συμβάλλει στη διάσπαση της πυρηνικής μεμβράνης και στην αποδιάταξη των πρωτεϊνών, προστατεύοντας το DNA από τη δράση των νουκλεασών. Η πρωτεΐνάση K διασπά τις πρωτεΐνες σε μικρά θραύσματα, εμποδίζοντας επίσης τη δράση των νουκλεασών. Η φαινόλη χρησιμοποιείται για την αποδιάταξη των πρωτεϊνών και τον διαχωρισμό λιπιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων. Το διάλυμα φαινόλης pH7 που χρησιμοποιείται είναι εξισορροπημένο ώστε το DNA να κατανέμεται στην υπερκείμενη υδάτινη φάση. Η προσθήκη χλωροφορμίου υποβοηθά τον καλύτερο διαχωρισμό των φάσεων και συμβάλλει στη μετουσίωση των πρωτεϊνών και στην απομάκρυνση της διαλυμένης φαινόλης από την υδάτινη φάση. Η ισοαμυλική αλκοόλη σταθεροποιεί το χλωροφόρμιο. Η κατακρήμνιση του DNA με ισοπροπανόλη και η ακόλουθη πλύση του με αιθανόλη 70% βασίζεται στο γεγονός ότι το DNA είναι αδιάλυτο στους συγκεντρωμένους οργανικούς διαλύτες σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 70%.

3. Ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός του DNA

Η συνολική ποσότητα του DNA στο εκάστοτε δείγμα ελέγχεται είτε με φωτομέτρηση του δείγματος είτε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 2% w/v.

Η φωτομέτρηση βασίζεται στο γεγονός ότι τα νουκλεϊκά οξέα απορροφούν σε μήκος κύματος 260nm. Η φωτομέτρηση πραγματοποιείται μετά από αραιώση 1μl διαλύματος DNA σε 49 μl ddH₂O. Στη συνέχεια, οι προκύπτουσες τιμές της απορρόφησης στα 260nm ανάγονται σε συγκέντρωση DNA. Ο λόγος της τιμής της απορρόφησης στα 260nm προς την αντίστοιχη τιμή στα 280nm είναι ένας δείκτης καθαρότητας του DNA που αναμένεται να έχει τιμή περίπου 1,8 σε δείγματα υψηλής καθαρότητας, κατάλληλα για χρήση.

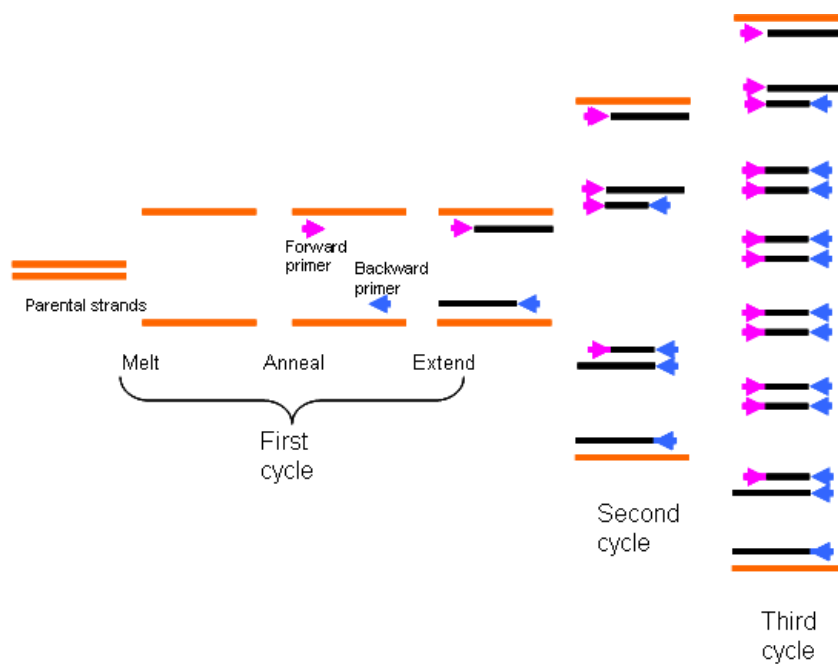
4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης είναι μία μέθοδος που επιτρέπει την παραγωγή *in vitro* από κάποιο μίγμα DNA ενός εξαιρετικά μεγάλου αριθμού αντιγράφων μίας συγκεκριμένης αλληλουχίας.

Για την αντίδραση χρησιμοποιείται ένα κατάλληλο ζεύγος εκκινητών (primers), οι οποίοι είναι συνθετικά μονόκλινα ολιγονουκλεοτίδια μήκους περίπου 20 νουκλεοτιδίων. Οι εκκινητές προσδένονται εκατέρωθεν της αλληλουχίας-στόχου, ο ένας στη μία αλυσίδα και ο άλλος στην άλλη, με βάση τους κανόνες συμπληρωματικότητας. Στη συνέχεια η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση, η Taq, παρουσία ιόντων μαγνησίου, πραγματοποιεί την αντίδραση πολυμερισμού τοποθετώντας κάθε φορά το συμπληρωματικό από τα τέσσερα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια (dATP, dCTP, dGTP και dTTP), στο 3' άκρο της νεοσυντιθέμενης αλυσίδας. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές, με αποτέλεσμα η αλληλουχία-στόχος στο τέλος της μεθόδου να υπάρχει σε εκατομμύρια αντίτυπα.

Κάθε κύκλος PCR περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- **Αποδιάταξη:** Με θέρμανση στους 94° - 95° C το δίκλωνο DNA που περιέχει την αλληλουχία που πρέπει να ενισχυθεί αποδιατάσσεται.
- **Υβριδοποίηση εκκινήτων:** Οι εκκινήτες προσδένονται στις αποδιατεταγμένες αλυσίδες του DNA. Η θερμοκρασία της φάσης αυτής ποικίλλει, ανάλογα με το μέγεθος και την περιεκτικότητα των εκκινήτων σε C, G, A, T (37° - 65° C).
- **Επιμήκυνση εκκινήτων:** Συντίθεται DNA με επιμήκυνση από την Taq πολυμεράση των υβριδισμένων εκκινήτων με κατεύθυνση $5' \rightarrow 3'$, χρησιμοποιώντας τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και έχοντας ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA.



Εικόνα 2. Τα στάδια της PCR

Στην εργασία χρησιμοποιήθηκε το ανάλογο ζεύγος εκκινήτων:

Forward primer: $5' - \text{AYAAGACGAGAAGACCC} - 3'$

Reverse primer: $5' - \text{GATTGCGCTGTTATTCC} - 3'$

Όπου $Y = C$ ή T

Οι εκκινητές αυτοί προέρχονται από τη μεταπτυχιακή διατριβή «Ταυτοποίηση ειδών σε τυποποιημένα κρέατα με ανάλυση γενετικών δεικτών» του Βασίλη Δ. Γκοντοσόπουλου. Οι εκκινητές σχεδιάστηκαν σε συντηρημένες περιοχές του 16S rRNA συγκρίνοντας *in silico* αλληλουχίες από θηλαστικά, πτηνά και ψάρια. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν στην διπλωματική εργασία της Κωνσταντίνας Σαρρή, όπου μελετήθηκε και διαπιστώθηκε επιτυχώς η διαχωριστική ικανότητα του τμήματος του 16S rRNA γονιδίου σε πτηνά, θηλαστικά, ψάρια, ερπετά, μαλάκια και αρθρόποδα.

Τα συστατικά της αντίδρασης PCR φαίνονται στον πίνακα 2.

Πίνακας 2. Συστατικά αντίδρασης PCR.

| Συστατικά αντίδρασης PCR | Ποσότητες συστατικών αντίδρασης PCR |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| DNA εκμαγείο | ~ 200 ng |
| Ρυθμιστικό διάλυμα 10X | 5 μ l |
| MgCl ₂ (50mM) | 2 μ l |
| dNTPs (10mM each) | 1 μ l |
| Εκκινητής Forward (50 μ mol/ml) | 1 μ l |
| Εκκινητής Reverse (50 μ mol/ml) | 1 μ l |
| Taq DNA πολυμεράση (5U/ μ l) | 0,2 μ l |
| ddH ₂ O | έως τα 50 μ l |

Οι συνθήκες ενίσχυσης του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA είναι:

- Αρχική αποδιάταξη : 95° C για 4 min
 - Αποδιάταξη: 95° C για 40 sec
 - Υβριδοποίηση: 53° C για 40 sec
 - Επιμήκυνση: 72° C για 40 sec
- } 35 κύκλοι
- Τελική επιμήκυνση: 72° C για 10 min

5. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης

Για να διαχωριστούν τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους, ή τοπολογικά ισομερή (γραμμικό DNA, ή κυκλικό που φέρει θετικές/αρνητικές υπερσπειρώσεις) πραγματοποιείται ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή αγαρόζης. Η μέθοδος αυτή βασίζεται ακριβώς στο γεγονός ότι τμήματα DNA διαφορετικού μεγέθους, ή στερεοδιαμόρφωσης για όσο η πηκτή διατρέχεται με ηλεκτρικό ρεύμα μετακινούνται προς το θετικό πόλο της συσκευής ηλεκτροφόρησης με διαφορετική ταχύτητα. Με την προσθήκη μιας φθορισμογόνου ουσίας (βρωμιούχο αιθίδιο) καθίσταται δυνατή η οπτικοποίηση της θέσης του εκάστοτε τμήματος.

Στο στάδιο της ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω αντιδραστήρια:

TAE 50x (500ml)

Tris Base 2 M

Acetic Acid 7,7%

EDTA 0,05 M

ddH₂O έως τα 500ml

Loading buffer 6x (10ml)

Bromophenol blue 0,1% w/v

TBE 1X

Glycerol 8,7%

ddH₂O έως τα 10ml

- Αρχικά, παρασκευάζεται διάλυμα TAE 1x αραιώνοντας το πυκνό διάλυμα 50x (20ml σε τελικό όγκο 1lt). Για την προετοιμασία της πηκτής διαλύονται 0,6gr αγαρόζης σε 40ml TAE 1x (τελική συγκέντρωση 2% w/v) με θέρμανση και προστίθενται 4μl βρωμιούχου αιθιδίου σε τελική συγκέντρωση 1 μg/ml. Η συγκέντρωση της πηκτής σε αγαρόζη διαφοροποιείται ανάλογα με το μέγεθος των τμημάτων DNA που μελετώνται. Το βρωμιούχο αιθίδιο προστίθεται για να είναι εμφανείς οι ζώνες

του DNA κατά την παρατήρηση της πηκτής υπό υπεριώδες φως. Η πηκτή τοποθετείται σε ειδικό καλούπι όπου και πολυμερίζεται.

- Της τοποθέτησης των δειγμάτων στο πήκτωμα προηγείται η προσθήκη loading buffer. Το διάλυμα αυτό διευκολύνει, χάρη στην παρουσία γλυκερόλης, της καθίζηση των δειγμάτων στα πηγαδάκια της πηκτής και παράλληλα επιτρέπει την παρατήρηση της πορείας των δειγμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση.
- Σε 5 μl προϊόντος PCR (το 10% της συνολικής ποσότητας) προστίθεται loading buffer τελικής συγκέντρωσης 1X. Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται στα 100volts και ακολουθεί παρατήρηση και φωτογράφιση των δειγμάτων υπό υπεριώδες φως.

Στην παρούσα εργασία, η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε αφενός για να αξιολογηθεί η ποιότητα της απομόνωσης DNA από τα δείγματα εντόμων (με χρήση πηκτώματος αγαρόζης συγκέντρωσης 1% w/v) και έπειτα από την PCR (με πήκτωμα 2% w/v) για να ελεγχθεί η επιτυχία της.

6. Ανάλυση πολυμορφισμού διαμόρφωσης μονόκλωνης αλυσίδας (Single Strand Conformation Polymorphism)

Η ανάλυση SSCP βασίζεται στο γεγονός ότι μονόκλιωνα τμήματα DNA που διαφέρουν στη νουκλεοτιδική τους αλληλουχία διαμορφώνονται διαφορετικά στο χώρο, επομένως εμφανίζουν και διαφορετική ηλεκτροφορητική συμπεριφορά.

Επομένως αν για ένα τμήμα DNA που έχει ενισχυθεί με PCR υπάρχουν πολυμορφισμοί μεταξύ των δειγμάτων, από την ανάλυση SSCP θα προκύψουν διαφορετικά προφίλ ζωνών για κάθε πολυμορφισμό.

Η ανάλυση SSCP αποτελείται από τρία στάδια: την αποδιάταξη των προϊόντων της PCR, την ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης και τη χρώση της πηκτής.

Για την αποδιάταξη των τμημάτων DNA χρησιμοποιείται αποδιατακτικό διάλυμα:

Αποδιατακτικό διάλυμα

Formamide 95%

Bromophenol blue 0,05%

Xylene Cyanol 0,05%

NaOH 10 mM

- Σε 5-7 μl προϊόντος PCR (ανάλογα με τη συγκέντρωσή του) προστίθενται 10 μl αποδιατακτικού διαλύματος και τα δείγματα αποδιάσσονται για 7 min στους 99°C. Τα μονόκλιωνα τμήματα που προκύπτουν από την αποδιάταξη διατηρούνται σε αυτήν την κατάσταση τοποθετώντας τα δείγματα στον πάγο.

Για την παρασκευή των πηκτών πολυακρυλαμίδης χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα :

Διάλυμα ακρυλαμίδης 12% (100ml)

Ακρυλαμίδη 37,5gr

Bis-acrylamide 1gr

ddH₂O έως τα 100ml

TBE 10x (2lt)

Tris Base 0,5 M

Boric acid 0,04 M

EDTA 0,02 M

ddH₂O έως τα 2lt

Glycerol 50% v/v

APS 20% w/v

Ammonium Persulfate 2gr
ddH₂O έως τα 10ml

TEMED (Tetramethylethylenediamine)

Για την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε πηκτή πολυακρυλαμίδης που έχει πυκνότητα 12%.

Οι ποσότητες των συστατικών που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή πηκτών πολυακρυλαμίδης 12% αναγράφονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3 : Σύσταση πηκτής πολυακρυλαμίδης 12%

| | Ποσότητα | Τελικές συγκεντρώσεις |
|---------------------------|----------------|-----------------------|
| Διάλυμα ακρυλαμίδης 38,5% | 19,5 ml | 12% |
| Glycerol 50% | 6,25 ml | 5% |
| TBE 10x | 5 ml | 0,8% |
| TEMED | 62,5 μl | |
| APS 20% | 310 μl | 0,1% |
| ddH ₂ O | Έως τα 62,5 ml | |
| Συνολικός όγκος | 62,5 ml | |

7. Χρώση των πηκτών πολυακρυλαμίδης με νιτρικό άργυρο

Μετά την ηλεκτροφόρηση, για να παρατηρηθούν οι ζώνες που προέκυψαν πρέπει οι πηκτές να χρωματιστούν με νιτρικό άργυρο. Η ουσία αυτή προσδένεται στο DNA και σε βασικό περιβάλλον αντιδρά με τη φορμαλδεΰδη. Από την αντίδραση παρατηρείται καφέ χρωματισμός των σημείων του πηκτώματος όπου βρίσκεται το DNA.(Sambrook et al, 2000). Για τη χρώση χρησιμοποιούνται τα εξής διαλύματα :

Διάλυμα 1 (400ml)

EtOH 2%
Acetic Acid 0,125%
ddH₂O ως τα 400ml

Διάλυμα 2 (200ml)
Διάλυμα AgNO₃ 1gr/lit

Διάλυμα 3 (200ml)
NaOH 0,015 M
NaBH₄ 50 μM
Formaldehyde 0,2%
ddH₂O έως τα 200ml

- Στο πρώτο στάδιο της χρώσης, η πηκτή εμβαπτίζεται σε 200ml του διαλύματος 1 και αναδεύεται για 3 min. Το διάλυμα 1 απομακρύνεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται. Ακολουθεί πλύση της πηκτής με ddH₂O για 1 min υπό ανάδευση.
- Στο δεύτερο στάδιο προστίθεται το διάλυμα νιτρικού αργύρου και η πηκτή επωάζεται για 15 min υπό ανάδευση. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται 2 πλύσεις με ddH₂O, διάρκειας 1 min η κάθε μία, υπό ανάδευση.
- Στο τρίτο και τελευταίο στάδιο προστίθεται το διάλυμα 3 και πραγματοποιείται ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν ευδιάκριτες ζώνες στην πηκτή.

8. Αλληλούχηση και ανάλυση αλληλουχιών

Τα προϊόντα PCR που επιλέγονται, καθαρίζονται με τη χρήση κατάλληλου kit (PureLink PCR Purification Kit, Invitrogen) ώστε να απομακρυνθούν εκκινητές, διαλύματα, Taq πολυμεράση κτλ, και στη συνέχεια αποστέλλονται σε εταιρείες που πραγματοποιούν αλληλούχηση. Τα αποτελέσματα λαμβάνονται με τη μορφή χρωματογραφήματος, μέσω του οποίου μπορούμε να εξάγουμε την αλληλουχία.

Η τεχνική της αλληλούχησης σήμερα βασίζεται σε μια παραλλαγή της μεθόδου Sanger. Η αλληλούχηση γίνεται σε μια αντίδραση, όπου κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs (ddATP, ddGTP, ddCTP, ή ddTTP) σημαίνεται με διαφορετική φθορίζουσα χρωστική, οπότε και εκπέμπουν σε διαφορετικό μήκος κύματος. Έτσι με τη χρήση ενός ανιχνευτή laser, καταγράφεται ο φθορισμός και τελικά λαμβάνεται η αλληλουχία, με τη μορφή χρωματογραφήματος.

Η ανάλυση των χρωματογραφημάτων της αλληλούχησης πραγματοποιείται με τη χρήση του προγράμματος BioEdit. Η αλληλούχηση των συγκεκριμένων δειγμάτων έγινε με τη χρήση μόνο του forward εκκινητή.

Για τη σύγκριση των αλληλουχιών και τον εντοπισμό διαφορών μεταξύ τους, καθώς και για την απεικόνιση των αποτελεσμάτων της σύγκρισης μέσω φυλογενετικού δέντρου, χρησιμοποιείται το πρόγραμμα MEGA 5.2. Με τη χρήση αυτού του προγράμματος, είναι δυνατή η πολλαπλή ομοπαράθεση των αλληλουχιών, η στοίχισή τους και η εύρεση των πολυμορφικών και συντηρημένων θέσεων. Το πρόγραμμα προσφέρει την δυνατότητα της κατασκευής φυλογενετικού δέντρου με το επιθυμητό μοντέλο (NJ: neighbor-joining, UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages, MP: maximum parsimony), όπως και τον έλεγχο bootstrap για το κατασκευασμένο δέντρο, ο οποίος είναι ενδεικτικός για την αξιοπιστία των δέντρων που προκύπτουν.

Συνοπτικά, οι μέθοδοι για κατασκευή εξελικτικών δέντρων αναλύονται σε δύο ομάδες, την κατηγορία μητρών απόστασης (distance matrix methods), με συνηθέστερες τη UPGMA και τη Neighbor joining, και την κατηγορία που βασίζεται στην παρουσία/απουσία πληροφοριακών χαρακτήρων που απαρτίζεται από τις μεθόδους μέγιστης φειδωλότητας (maximum parsimony) και μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum likelihood).

Η μέθοδος συσχέτισης μη σταθμισμένων ομάδων ανά ζεύγη με αριθμητικούς μέσους όρους (UPGMA: unweighted pair group method with arithmetic averages) είναι η πιο απλή και προϋποθέτει σταθερούς ρυθμούς εξέλιξης μεταξύ των

γενεαλογικών γραμμών. Έτσι υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ των εξελικτικών αποστάσεων και του χρόνου διάσπασης .

Αντίθετα, η μέθοδος σύνδεσης γειτόνων (NJ: neighbor joining) δε βασίζεται σε ίσους ρυθμούς εξέλιξης των αλληλουχιών DNA των υπό διερεύνηση γενεαλογικών γραμμών.

Η μέθοδος μέγιστης φειδωλότητας, βασίζεται στην αρχή της αξιοποίησης των μικρότερων εξελικτικών αλλαγών που απαιτούνται για την αιτιολόγηση των διαφορών που παρατηρούνται μεταξύ των ταξινομικών μονάδων (ξυράφι του Οκαμ). (Οι θέσεις διακρίνονται σε πληροφοριακές και μη)

Η μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας είναι μια πιο πολύπλοκη διερευνητική μέθοδος που είτε χρησιμοποιεί αλγόριθμους που βασίζονται σε ίσους ρυθμούς εξέλιξης (μονοπαραμετρικό μοντέλο), είτε άλλα μοντέλα που θεωρούν πως οι ρυθμοί εξέλιξης μεταξύ των ταξινομικών μονάδων διαφέρουν. Ανάλογα με τον αλγόριθμο που θα επιλεγεί, υπολογίζεται η πιθανότητα των παρατηρούμενων δεδομένων με βάση τη μέγιστη πιθανοφάνεια και η καλύτερη εκτίμηση της φυλογένειας εξάγεται από το δέντρο που μεγιστοποιεί αυτήν την πιθανότητα. Η μέθοδος μέγιστης πιθανοφάνειας χρησιμοποιήθηκε σε αυτή την εργασία.

Ο γενικός κανόνας για το έλεγχο της αξιοπιστίας των φυλογενετικών δέντρων είναι ότι, αν από τη μια ομάδα δεδομένων προκύπτει το ίδιο δέντρο (ή πανομοιότυπα δέντρα) μετά από ανάλυση με δυο ή τρεις διαφορετικές μεθόδους κατασκευής δέντρων, τότε αυτό το δέντρο μπορεί να θεωρηθεί αρκετά αξιόπιστο. Είναι επίσης πιθανό διαφορετικά τμήματα των δέντρων να προσδιοριστούν με διαφορετικό βαθμό εμπιστοσύνης. Οι δοκιμασίες bootstrap επιτρέπουν την κατά προσέγγιση εκτίμηση αυτού του βαθμού εμπιστοσύνης με ποσοτικό τρόπο. Η διαδικασία μιας δοκιμασίας bootstrap είναι απλή: ένα υποσύνολο των αρχικών δεδομένων επιλέγεται με τυχαίο τρόπο από την αρχική ομάδα δεδομένων και κατασκευάζεται ένα δέντρο με τα δεδομένα αυτού του υποσυνόλου. (Αλαχιώτης, 2007)

Αποτελέσματα και Συζήτηση

1. Έλεγχος του διαειδικού πολυμορφισμού του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA

Τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε πηκτή αγαρόζης 2% για να επαληθευτεί η πετυχημένη ενίσχυσή τους.

Ακολούθησε ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 12%, ακολουθώντας το πρωτόκολλο για τη μέθοδο SSCP, ούτως ώστε να ελεγχθεί η ποικιλομορφία που παρουσιάζεται διαειδικά.

Τα δείγματα εμφάνισαν διαφορετικό ηλεκτροφορητικό πρότυπο, χαρακτηριστικό για κάθε είδος, γεγονός που υποδεικνύει πως τα είδη παρουσιάζουν ποικιλομορφία στο τμήμα που ενισχύθηκε. Από την ανάλυση SSCP δεν είναι δυνατόν να αποφανθούμε αν πρόκειται για ποικιλομορφία μεγέθους, ή αλληλουχίας, παρόλα αυτά σε προηγούμενες μελέτες έχει παρατηρηθεί σε ζωικά είδη πολυμορφισμός μεγέθους.

Στη συνέχεια, τα PCR προϊόντα καθαρίστηκαν με χρήση kit και στάλθηκαν για αλληλούχηση (500ng από το κάθε δείγμα) με το forward εκκινητή. Παρακάτω παρουσιάζονται οι αλληλουχίες που προέκυψαν μετά την επεξεργασία των χρωματογραφημάτων της αλληλούχησης.

| | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
|---------------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1_A1_Melolontha_hippocastani_a | 1 | | | | | | |
| 2_B1_Morimus_funereus | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 3_C1_Phillureus_deshave | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 5_E1_Phytoecia_nigricornis | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 6_F1_Aegosoma_scabricorne_a | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 7_G1_Melolontha_hippocastani_b | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 9_A2_Macraspis_tristis | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 11_C2_Amphimallon_solstitiale | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 12_D2_Dorcadion_aethiops | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 13_E2_Leptura_maculata | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 14_F2_Plagionotus_arcuatus_1 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 15_G2_Dorcadion_sp.1 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 16_H2_Blaps_sp. | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 19_C3_Hanneton_sp. | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 20_D3_Cyclocephala_mafaffa | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 22_F3_Cucl._insoulicah | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 23_Dorcadion_sp.2 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 24_H3_Oberea_bipunctata | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 25_A4_Morimus_asper | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 29_E4_Anomala_solide | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 30_F4_Ergates_sp.1_b | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 31_G4_Dorcadion_sp.3 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 33_A5_Parmena_sp. | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 36_D5_Rhizotrogus_sp. | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 38_F5_Ergates_sp.1_a | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 45_E6_Eupotosia_mirifica | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 46_F6_Neodorcadion_sp. | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 49_A7_Aegosoma_scabricorne_b | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 52_D7_Cyclocephala_tridentata_1 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 53_E7_Plagionotus_arcuatus_2 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 54_F7_Obezema_pupillata | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 56_A8_Monochamus_sutor | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 61_F8_Niphona_grisea | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 64_B9_Oryctes_nasicornis | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 66_D9_Cyclocephala_tridentata_1 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 68_F9_Saperda_scalaris | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 70_A10_Vadonia_imitatrix | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 71_B10_Cyclocephala_melanoceph | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 75_F10_Cyclocephala_melanoceph | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 77_A11_Dorcadion_fuliginator | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 78_B11_Scarabaeus_sp. | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 80_D11_Cyclocephala_tridentata | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 81_E11_Haplidia_transversa | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 82_F11_Cyclocephala_melanoceph | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 85_B12_Pedostrangalia_vertical | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 87_D12_Cyclocephala_tridentata | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 88_E12_Oberea_oculata | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 89_F12_Melolontha_melolontha | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 86_C12_Saga_hellenica | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 60_E8_Saga_ranmei_32 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 67_E9_Saga_rhodiensis | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 32_H4_Bradyporus_dasyopus | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 74_E10_Saga_nataliae | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 47_G6_Coquillettia_richardii | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 55_G7_Culex_picipiens_picipiens | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 62_G8_Ochlerotatus_caspicus_98 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 69_G9_Ochlerotatus_caspicus_78 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 76_G10_Ochlerotatus_caspicus_99 | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 83_G11_Culex_modestus | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 90_G12_Aedes_vexans | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 8_H1_Anopheles_labranchiae | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |
| 48_H6_Chiron. plumosus | 1 | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- | ----- |

| | | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
|--------------------------------|----|-----------|----------|------------|--------------|------------|-----------------------------|
| 1_A1_Melolontha_hippocastani_a | 43 | ATAG-AAAA | ATTAAA | GGA | ACTTTTTTTT | TA | TTA AGTCATTAAT GTATGAATA |
| 2_B1_Morimus_funereus | 37 | ATTG-AAAA | ATTAAA | AAA | ACTTTTTTTT | TT | GTA GTTCATTGAG ATATGAATA |
| 3_C1_Philleurus_deshave | 36 | GTAG-AAAA | ATTGTT | TTA | ACTTTTTTTT | TT | ATA CTTTCATTGAT TGATGTTTC |
| 5_E1_Phytoecia_nigricornis | 43 | ATTA-AAAA | ATTAAAT | TAA | ACTTTTTT | TTG AA | TTA AACCATAGAT TTATGAGTA |
| 6_F1_Aegosoma_scabricorne_a | 32 | ACTG-AAAA | ATTAAAG | TTA | ACTTTTTTCT | TA | TTT TTACACTGAT TAGTGAATT |
| 7_G1_Melolontha_hippocastani_b | 34 | ATAG-AAAA | ATTAAA | GGA | ACTTTTTTTT | TA | TTA AGTCATTAAT GTATGAATA |
| 9_A2_Macraspis_tristis | 43 | ACAG-GAAA | ATTTAG | TAA | ACTTTTTTCT | TT | GAA AACCATGAT TTATGAATA |
| 11_C2_Amphimallon_solstitiale | 24 | ACAG-GAAA | ATAGAT | ATA | ACTTTTCCCTA | TA | TTA GTACATTAAT TTATGAATA |
| 12_D2_Dorcadion_aethiops | 11 | ATTG-AAAA | ATTAAA | TTA | ACTTTTTTTT | TA | TTA GTCCATTAAT ATATGAGTA |
| 13_E2_Leptura_maculata | 42 | ATTG-AAAA | ATTAAAT | AAA | ACTTTTTTTT | TA | TAA ATACATTAAT TTATGAATA |
| 14_F2_Plagionotus_arcuratus_1 | 15 | ATTG-AAAA | ATTGAT | TAA | ACTTTTTTTT | TT | TTT TTACATTTAT TTATGGAAT |
| 15_G2_Dorcadion_sp.1 | 9 | ATKG-GAAA | ATTAAA | ATA | ACTTTTTTTT | TT | TAA AACCATTAAT ATATGAATA |
| 16_H2_Blaps_sp. | 44 | ATGT-GAAA | ATTGTT | TTA | ACTTTTTTAAAT | TT | TTT TTACACTAAT GATGAATG |
| 19_C3_Hanneton_sp. | 35 | ACAG-AAAA | ATTGAA | GGA | ACTTTTTTTT | TA | TTA AGTCATTAAT ATATGAATG |
| 20_D3_Cyclocephala_maffa | 1 | | TTAA | TGA | ACTTTTTTTT | AT | TTA AAAC-CAAGT TTAATATTG |
| 22_F3_Cucl._insoulicah | 7 | ACAG-AAAA | ATTAAAT | TTA | ACTTTTTTTT | TA | TATG TACCATAAAT TAATGAGTT |
| 23_Dorcadion_sp.2 | 31 | ATTG-AAAA | ATTAAA | TTA | ACTTTTTTTT | TA | TTA GTACATTAAT ATATGAGTA |
| 24_H3_Oberea_bipunctata | 33 | ATAA-TAAA | ATTAA | TAA | ACTTTTATTT | AA | TAA ATACATAAAT TTATGAATA |
| 25_A4_Morimus_asper | 42 | ATTG-AAAA | ATTAAA | AAA | ACTTTTTTTT | TT | GTA GTTCATTGAT ATATGAATA |
| 29_E4_Anomala_solide | 51 | GCAG-AAAA | ATTAGA | TAA | ACTTTTTTTT | TA | TTT TTACATTGAT TTATGGTTT |
| 30_F4_Ergates_sp.1_b | 41 | ATCA-AAAA | ATTGAT | ATA | ACTTTTTTTT | TA | TAA TTACATAGAT TAATGTTTA |
| 31_G4_Dorcadion_sp.3 | 43 | ATTG-GAAA | ATTAAA | ATA | ACTTTTTTTT | TT | TAA RACCATTAAT ATATGAATA |
| 33_A5_Parmena_sp. | 19 | AT-T-GATT | ATYAAA | TTA | ACTTTTTTTT | TA | TTA AACCATTAAT AAATGAATG |
| 36_D5_Rhizotrogus_sp. | 51 | ACAG-GAAA | ATAGAT | ATA | ACTTTTCCCTA | TA | TTA GTACATTAAT TTATGAATA |
| 38_F5_Ergates_sp.1_a | 43 | ATCA-AAAA | ATTGAT | ATA | ACTTTTTTTT | TA | TAA TTACATAGAT TAATGTTTA |
| 45_E6_Eupotosia_mirifica | 29 | ACAG-AAAA | ATTAAA | TTA | ACTTTTTTTT | TT | TAT TAACATTAAT TTATGAGTA |
| 46_F6_Neodorcadion_sp. | 38 | ATTG-AAAA | ATTAA | AAA | ACTTTTTTTT | TA | TAG GACCATTAT ATATGAATA |
| 49_A7_Aegosoma_scabricorne_b | 43 | ACTG-AAAA | ATTAAAG | TTA | ACTTTTTTCT | TA | TTT TTACACTGAT TAGTGAATT |
| 52_D7_Cyclocephala_tridentata | 43 | ACAG-AAAA | ATTAAAT | TTA | ACTTTTTTTT | TA | CATATA TACCATAGAT TTATGAGTT |
| 53_E7_Plagionotus_arcuratus_2 | 26 | ATGG-AAAA | ATTGAT | TAA | ACTTTTTTTT | GT | TTT TTACATTTAT TTATGGAAT |
| 54_F7_Obezema_pupillata | 38 | ATAA-TAAA | ATTAA | TAA | ACTTTTATTT | AA | TAG ATACATAAAT TTATGAATA |
| 56_A8_Monochamus_sutor | 40 | ATTG-AAAA | ATTGTC | TAA | ACTTTTTTTT | TA | TAA GAACATTAAT TTATGAATT |
| 61_F8_Niphona_grisea | 32 | ATTG-AAAA | ATTAA | AAA | ACTTTTTTTT | TA | TTT TTACATTTAT TTATGAATT |
| 64_B9_Oryctes_nasicornis | 28 | ATTG-AAAA | ATTAA | TTA | ACTTTTTTTT | TA | CTT TTTTCATTGAT TTATGTGTT |
| 66_D9_Cyclocephala_tridentata | 36 | ACAG-AAAA | ATTAAAT | TTA | ACTTTTTTTT | TA | TTAA TATCATAGAT TAATGAGTT |
| 68_F9_Saperda_scalaris | 40 | ATTG-AAAA | ATTAAAT | TAA | ACTTTTTTTT | AG AA | TTT AACCATTTAT TTATGAATA |
| 70_A10_Vadonia_imitatrix | 19 | ATTG-AAAA | ATTAA | TAA | ACTTTTTTTT | TA | TAA GTTCATTGAT ATATGAATA |
| 71_B10_Cyclocephala_melanoceph | 36 | ATGG-AAAA | ATTGAA | TAA | ACTTTTTTTT | TA | TAG AATCATTGAT TTATGAGTT |
| 75_F10_Cyclocephala_melanoceph | 36 | ATGG-AAAA | ATTGAA | TAA | ACTTTTTTTT | TA | TAG AATCATTGAT TTATGAGTT |
| 77_A11_Dorcadion_fuliginator | 1 | -CG-AAAA | ACTTCT | TTT | ACTTTTTTTT | TT | AAA AATCATTAA ATATGAATA |
| 78_B11_Scarabaeus_sp. | 45 | ACTA-AAAA | ATTAAA | TTA | ACTTTTTTTT | TA | TTA AAACATTTAT TTATGAATA |
| 80_D11_Cyclocephala_tridentata | 27 | ACAG-AAAA | ATTAAAT | TTA | ACTTTTTTTT | TA | TTAA TATCATAGAT TAATGAGTT |
| 81_E11_Haplidia_transversa | 53 | ACAA-AAAA | ATTAAA | CTA | ACTTTTTTTT | TA | TGT TTACATTAAT TTATGAGTG |
| 82_F11_Cyclocephala_melanoceph | 37 | ATGG-AAAA | TCGAA | TAA | CTTTTTTTT | TA | TAC AATCATTGAT TTATGAGTT |
| 85_B12_Pedostrangalia_vertical | 34 | ATTG-AAAA | ATTAA | AAA | ACTTTTTTTT | TT | AAA AATCATTAA TTATGAAAT |
| 87_D12_Cyclocephala_tridentata | 28 | ACAG-AAAA | ATTAAAT | TTA | ACTTTTTTTT | TATACATATA | TATCATAGAT TTATGAGTT |
| 88_E12_Oberea_oculata | 41 | ATAA-TAAA | ATTAA | TAA | ACTTTTATTT | AA | TAA ATACATAAAT TTATGAGTA |
| 89_F12_Melolontha_melolontha | 40 | ACAG-AAAA | ATTGAA | GGA | ACTTTTTTTT | TA | TTA AGTCATTAAT GTATGAATG |
| 86_C12_Saga_hellenica | 43 | ACAT-GGAG | ATATAA | AGA | ACTCTTTAAT | AT | AGA AAACATGAAT TAATGGATA |
| 60_E8_Saga_ranmei_32 | 32 | ACAT-AAAG | ATAAAA | TAA | ACTCTTTAAT | AT | ATG AAACATGAGT TAATGGATA |
| 67_E9_Saga_rhodiensis | 30 | ACAT-GGAG | ATATAA | AAA | ACTCTTTAAA | AA | GG AAACATGAAT TAATGGATG |
| 72_H4_Bradyporus_dasyopus | 47 | ACAT-GAAG | ATATAA | ATA | ACTCTTTT | AT AA | TTA AAACATTGAT TTATGAATA |
| 74_E10_Saga_nataliae | 28 | ACAT-GGAG | ATATAA | AAA | ACTCTTTAAT | AA | GGT GAACATGAAT TAATGGATA |
| 47_G6_Coquillettia_richardii | 30 | ATAT-TAAA | ATTAA | TTA | ACTTTTATTA | TTT | TTTT TAACATTGAT ATATGAATA |
| 55_G7_Culex_pipiens_pipiens | 30 | ATAT-TAAA | ATTAA | AAA | ACTTTTAAAA | TTT | ATTA -ACATAAAT ATATGAATA |
| 62_G8_Ochlerotatus_caspius_98 | 30 | GTAT-TAAA | ATTAA | ATA | ACTTTTATTA | TTT | ATTT -ACATTAAT ATATGAATA |
| 69_G9_Ochlerotatus_caspius_78 | 38 | GTAT-TAAA | ATTAA | ATA | ACTTTTATTA | TTT | ATTT -ACATTAAT ATATGAATA |
| 76_G10_Ochlerotatus_caspius_99 | 39 | GTAT-TAAA | ATTAA | ATA | ACTTTTATTA | TTT | ATTT -ACATTAAT ATATGAATA |
| 83_G11_Culex_modestus | 21 | ATAT-TAAA | ATTAA | AAA | ACTTTTAAAA | TTT | TTTA -ACATTAAT ATATGAATA |
| 90_G12_Aedes_vexans | 7 | GTAT-TAAA | ATTTTTAA | ACTTTTATTA | TTT | ATTT | -ACATTAAT ATATGAATA |
| 8_H1_Anopheles_labranchiae | 14 | GTAT-TAAA | ATTAA | TAA | ACTTTTATTT | TAT | ATTT AACATTGAT TTATGAATT |
| 48_H6_Chiron. plumosus | 7 | ATTT-AAAG | ATTTAT | TTA | ACTCTTTATA | GAA | TTT TTTTAAATAAT A-GTTAATA |

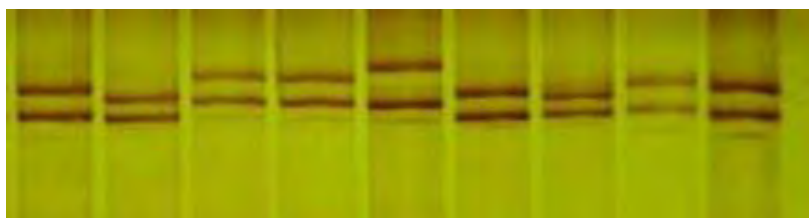
| | | 130 | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 |
|---------------------------------|-----|------------|-------------|-------------|------------|------------|-------------|
| 1_A1_Melolontha_hippocastani_a | 94 | AATGAT-CCG | TTTTT-TACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 2_B1_Morimus_funereus | 88 | TTTGAT-CCA | T-ATGTTATG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCACAAA- |
| 3_C1_Philleurus_deshave | 87 | TATGAT-CCG | TTTTT-TACG | ATTATAAGAT | AAAATTACCT | TAGGG-A-AA | CAGCACAAATC |
| 5_E1_Phytoecia_nigricornis | 93 | TTTGAT-CCA | TAAATTA-TG | ATTAAAAAGAA | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 6_F1_Aegosoma_scabricorne_a | 82 | GTTGAT-CCA | TAATT-TATG | ATTAAAAAGAT | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 7_G1_Melolontha_hippocastani_b | 85 | AATGAT-CCG | TTTTT-TACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 9_A2_Macraspis_tristis | 94 | TTTGAT-CCA | TTTAAGTTTG | ATTAAAAAGAT | ATAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 11_C2_Amphimallon_solstitiale | 75 | GATGAT-CCG | TTAGT-AACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 12_D2_Dorcadion_aethiops | 62 | TATGAT-CCA | TAATTTTATG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 13_E2_Leptura_maculata | 93 | TTTGAT-CCA | TAAAT-TATG | ATTAAAAAGAT | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGMAATC |
| 14_F2_Plagionotus_arcuratus_1 | 66 | ATTGAT-CCA | TTTTT-TGTG | ATTATAAGAA | TTAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 15_G2_Dorcadion_sp.1 | 61 | TTTGAT-CCA | TAAAGTTATG | ATTATAAAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 16_H2_Blaps_sp. | 94 | GTTGAT-CC | TTTTT-A-G | ATTACAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 19_C3_Hanneton_sp. | 86 | AATGAT-CCG | TTATT-TACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 20_D3_Cyclocephala_maffa | 41 | AATGAT-CCC | WTTTT-TACK | AAATACAAA | TAAATTACCT | TAAGG-AAAA | CCATCCCAATC |
| 22_F3_Cucl._insoulicah | 59 | ATTGAT-CCG | TTTTT-TACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 23_Dorcadion_sp.2 | 82 | TATGAT-CCA | TAATTTTATG | ATTAAAAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 24_H3_Oberera_bipunctata | 84 | TTTGAT-CCA | TTATTTT-TG | ATTAAAAAGAA | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAAT- |
| 25_A4_Morimus_asper | 93 | TTTGAT-CCA | T-ATGTTATG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 29_E4_Anomala_solide | 102 | AATGAT-CCA | TTTTT-TATG | ATTACAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 30_F4_Ergates_sp.1_b | 92 | TTTGAT-CCA | CATTT-CGTG | ATTATAAGAT | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 31_G4_Dorcadion_sp.3 | 94 | TATGAY-CCA | TATAGTTATG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CASCCCAATC |
| 33_A5_Parmena_sp. | 69 | TWYGAT-CCA | ATAATTT-TG | ATTGTTAGAT | TAAAYTACCT | TAGGG-CTAM | CCGSCCAATC |
| 36_D5_Rhizotrogus_sp. | 102 | GATGAT-CCG | TTAGT-AACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 38_F5_Ergates_sp.1_a | 94 | TTTGAT-CCA | CATTT-CGTG | ATTATAAGAT | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 45_E6_Eupotosia_mirifica | 80 | TTTGAT-CCA | TT-AATATG | ATTAAAAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATA |
| 46_F6_Neodorcadion_sp. | 89 | TATGAT-CCA | TGATAGCGTG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 49_A7_Aegosoma_scabricorne_b | 93 | GTTGAT-CCA | TAATT-TATG | ATTAAAAAGAT | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 52_D7_Cyclocephala_tridentata_ | 97 | ATTGAT-CCG | TTTTT-TACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 53_E7_Plagionotus_arcuratus_2 | 77 | ATTGAT-CCA | TTTTT-TGTG | ATTATAAGAA | TTAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 54_F7_Obezema_pupillata | 89 | TTTGAT-CCA | TTTTTTA-TG | ATTAAAAAGAA | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 56_A8_Monochamus_sutor | 91 | TTTGAT-CCA | TAAATGTATG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAAT- |
| 61_F8_Niphona_grisea | 83 | TTTGAT-CCA | TTAAT-AATG | ATTATAAGAT | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 64_B9_Oryctes_nasicornis | 79 | TTTGAT-CCA | CTTGT-TGTG | ATTATAAGAA | AAAATTACCT | TAGGG-A-AA | CAGCGCAATC |
| 66_D9_Cyclocephala_tridentata_ | 88 | ATTGAT-CCG | TTTAT-TACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 68_F9_Saperda_scalaris | 91 | TTTGAT-CCG | TAGTTTTGCG | ATTAAAGAA | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 70_A10_Vadonia_imitatrix | 70 | TATGAT-CCA | T-AAATATG | ATTATAARAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGC---- |
| 71_B10_Cyclocephala_melanoceph | 87 | ATTGAT-CCA | TTTTT-TATG | ATTAAAAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 75_F10_Cyclocephala_melanoceph | 87 | ATTGAT-CCA | TTTTT-TATG | ATTAAAAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 77_A11_Dorcadion_fuliginator | 50 | GTTGAT-CCA | TGTTT-TATG | ATTAAAAAGAT | TGAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCA-TC |
| 78_B11_Scarabaeus_sp. | 96 | AGTGAT-CCA | TATTT-TATG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 80_D11_Cyclocephala_tridentata | 79 | ATTGAT-CCG | TTTAT-TACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 81_E11_Haplidia_transversa | 104 | CATGAT-CCG | TTATT-AACG | ATTATAAGAT | CAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 82_F11_Cyclocephala_melanoceph | 87 | ATTGAT-CCA | TTTTT-TAAG | ATTAAAAARAT | TACCTTACCT | TACGG-ATAA | CACCCCAMTC |
| 85_B12_Pedostrangalia_vertical | 85 | GTTGAT-CCA | TTGTT-TATG | ATTAAAAAGAT | TGAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 87_D12_Cyclocephala_tridentata | 84 | ATTGAT-CCG | TTTTT-TACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 88_E12_Oberera_oculata | 92 | TTTGAT-CCA | TTATTTT-TG | ATTAAAAAGAA | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 89_F12_Melolontha_melolontha | 91 | AATGAT-CCG | TTATT-TACG | ATTATAAGAT | TAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 86_C12_Saga_hellenica | 94 | ATTGAT-CCA | GTAGTAT-TG | ATTGTTAGAT | GAAGTTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 60_E8_Saga_ranmei_32 | 83 | ATTGAT-CCA | GTAGTAT-TG | ATTGTTAGAT | GAAGTTACCT | TAGGG-A-AA | CAGCGCAATC |
| 67_E9_Saga_rhodiensis | 80 | ACTGAT-CCA | GTAGTAT-TG | ATTGTTAGAT | GAAGTTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 32_H4_Bradyporus_dasyopus | 97 | TTTGAT-CCA | TTATTTA-TG | ATTATAARAT | AAAATTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCSCAATC |
| 74_E10_Saga_nataliae | 79 | AGTGAT-CCA | GTAKTAT-TG | ATTGTTAGAT | GAAGTTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 47_G6_Coquillettia_richardii | 83 | AATGAT-CCA | ATTTTAT-TG | ATTAAAAAAT | TAAGTTACCT | TAGGG-A-AA | CAGCGCAATC |
| 55_G7_Culex_picipiens_picipiens | 81 | AATGAT-CCA | GTTTTAT-TG | ATTAAAAAAT | TAAGTTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 62_G8_Ochlerotatus_caspius_98 | 81 | ATTGAT-CCA | GTTATAT-TG | ATTAAAAAAT | TAAGTTACCT | TAGGG-A-AA | CAGCGCAATC |
| 69_G9_Ochlerotatus_caspius_78 | 89 | ATTGAT-CCA | GTTATAT-TG | ATTAAAAAAT | TAAGTTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 76_G10_Ochlerotatus_caspius_99 | 90 | ATTGAT-CCA | GTTATAT-TG | ATTAAAAAAT | TAAGTTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 83_G11_Culex_modestus | 72 | AATGAT-CCA | GTTTTAT-TG | ATTAAAAAAT | TAAGTTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCSCAATC |
| 90_G12_Aedes_vexans | 59 | TTTGAT-CCA | GTTTTAT-TG | ATTAAAAAAT | TAAGTTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 8_H1_Anopheles_labranchiae | 65 | TAAGAT-CC | GTATTTAT-GG | ATTAAAAAAT | TAAGTTACCT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |
| 48_H6_Chiron.plumosus | 59 | AGAGAT-CC | GAAATTTTGG | ATTTAAAAAT | TAAGTTACTT | TAGGG-ATAA | CAGCGCAATC |


```

      ....
1_A1_Melolontha_hippocastani_a 151 A---
2_B1_Morimus_funereus          143 ----
3_C1_Philleurus_deshave        143 A---
5_E1_Phytoecia_nigricornis     149 ----
6_F1_Aegosoma_scabricorne_a    139 A---
7_G1_Melolontha_hippocastani_b 141 ----
9_A2_Macraspis_tristis         152 CA--
11_C2_Amphimallon_solstitiale  132 A---
12_D2_Dorcadion_aethiops       120 A---
13_E2_Leptura_maculata         150 A---
14_F2_Plagionotus_arcuratus_1  123 A---
15_G2_Dorcadion_sp.1           119 A---
16_H2_Blaps_sp.                149 A---
19_C3_Hanneton_sp.             143 C---
20_D3_Cyclocephala_mafaffa     98  AA--
22_F3_Cucl._insoulicah         116 ATCA
23_Dorcadion_sp.2              140 A---
24_H3_Obera_bipunctata         139 ----
25_A4_Morimus_asper            150 A---
29_E4_Anomala_solide           159 A---
30_F4_Ergates_sp.1_b          149 A---
31_G4_Dorcadion_sp.3           152 A---
33_A5_Parmena_sp.              126 A---
36_D5_Rhizotrogus_sp.          159 A---
38_F5_Ergates_sp.1_a           151 A---
45_E6_Eupotosia_mirifica       137 CA--
46_F6_Neodorcadion_sp.         146 ----
49_A7_Aegosoma_scabricorne_b   150 A---
52_D7_Cyclocephala_tridentata  154 A---
53_E7_Plagionotus_arcuratus_2  134 A---
54_F7_Obezema_pupillata        146 A---
56_A8_Monochamus_sutor         147 ----
61_F8_Niphona_grisea           140 A---
64_B9_Oryctes_nasicornis       135 A---
66_D9_Cyclocephala_tridentata  145 A---
68_F9_Saperda_scalaris         149 A---
70_A10_Vadonia_imitatrix       122 ----
71_B10_Cyclocephala_melanoceph 144 A---
75_F10_Cyclocephala_melanoceph 144 A---
77_A11_Dorcadion_fuliginator    106 A---
78_B11_Scarabaeus_sp.          153 A---
80_D11_Cyclocephala_tridentata  136 A---
81_E11_Haplidia_transversa      161 A---
82_F11_Cyclocephala_melanoceph 144 A---
85_B12_Pedostrangalia_vertical  142 A---
87_D12_Cyclocephala_tridentata  141 A---
88_E12_Obera_oculata           149 A---
89_F12_Melolontha_melolontha  148 AA--
86_C12_Saga_hellenica          151 A---
60_E8_Saga_ranmei_32           139 A---
67_E9_Saga_rhodiensis           137 AA--
32_H4_Bradyporus_dasyptus      154 AA--
74_E10_Saga_nataliae            136 A---
47_G6_Coquillettidia_richardii  139 A---
55_G7_Culex_pipiens_pipiens     138 A---
62_G8_Ochlerotatus_caspius_98  137 A---
69_G9_Ochlerotatus_caspius_78  146 A---
76_G10_Ochlerotatus_caspius_99 147 A---
83_G11_Culex_modestus           129 A---
90_G12_Aedes_vexans             116 A---
8_H1_Anopheles_labranchiae     121 ----
48_H6_Chiron. plumosus         117 A---

```

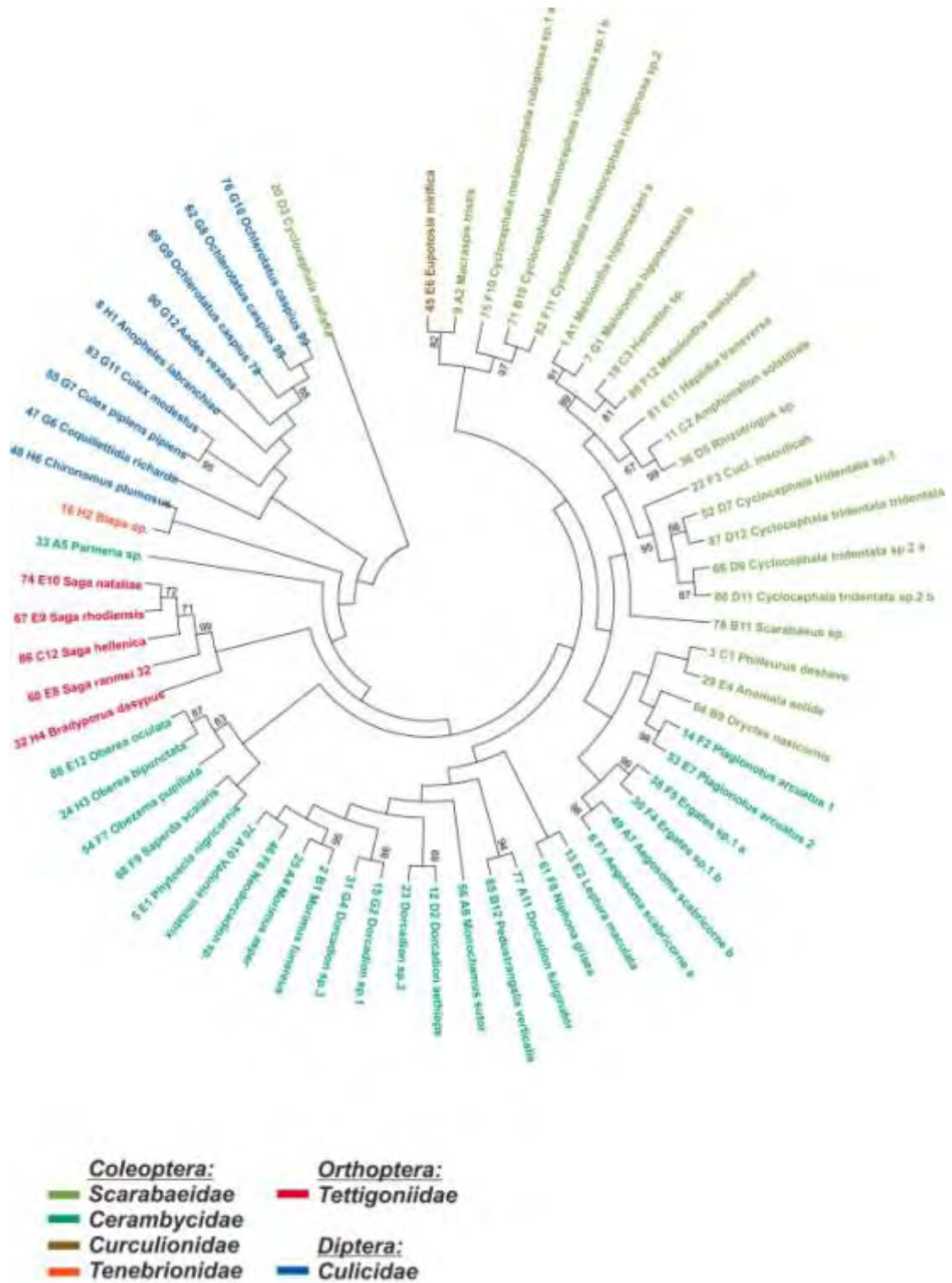
Καθώς δεν πραγματοποιήθηκε αλληλούχηση και με τους δύο εκκινητές, δεν είναι δυνατή η μελέτη του πολυμορφισμού μεγέθους μεταξύ των υπό μελέτη ειδών. Παρόλα αυτά, τόσο κατά την SSCP, όσο και στην αλληλούχηση, ήταν φανερό ότι τα δείγματα των διαφορετικών ειδών εμφανίζουν στο υπό ενίσχυση τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* το καθένα διαφορετική αλληλουχία. Αυτό ενισχύει την υπόθεση ότι το εν λόγω τμήμα είναι ικανό να διαχωρίζει ικανοποιητικά τα είδη των εντόμων.



Εικόνα 3. Διαειδική ανάλυση SSCP

Το αποτέλεσμα ήταν ο ικανός διαχωρισμός των ειδών, με την ανάλυση PCR-SSCP. Με αυτή τη μέθοδο είναι δυνατός ο διαχωρισμός των ειδών αλλά όχι η ταυτοποίησή τους.

Με το λογισμικό του MEGA5, έγινε ανάλυση των αλληλουχιών και βρέθηκε πως η ιδανική μέθοδος για κατασκευή φυλογενετικού δέντρου για τα συγκεκριμένα δεδομένα είναι αυτή της μέγιστης πιθανοφάνειας (maximum-likelihood), με χρήση του αλγόριθμου Hasegawa-Kishino-Yano. Στο δέντρο που κατασκευάστηκε παρατηρείται πως τα δείγματα ομαδοποιούνται, όχι άριστα, μα σε ικανοποιητικό βαθμό κατά τάξη και οικογένεια (Εικόνα 4).

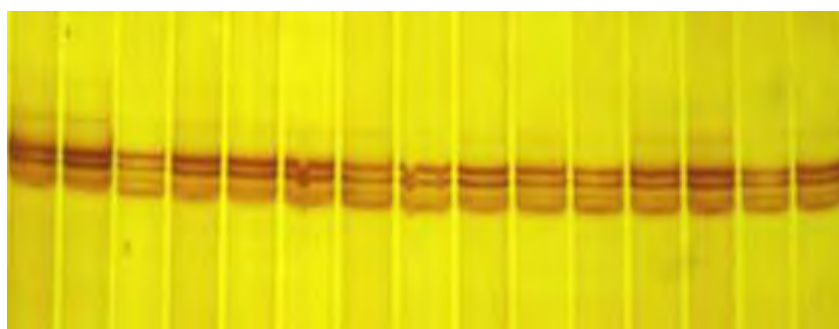


Εικόνα 4. Φυλογενετικό δέντρο (Maximum-Likelihood, Hasegawa-Kishino-Yano +G). Παρατηρείται ομαδοποίηση, με κάποιες εξαιρέσεις, κατά οικογένεια.

2. Έλεγχος του ενδοειδικού πολυμορφισμού του τμήματος του γονιδίου 16S rRNA.

Για να μελετηθεί ο ενδοειδικός πολυμορφισμός πραγματοποιήθηκε ανάλυση PCR-SSCP σε μερικά από τα είδη.

Τα άτομα του ίδιου είδους φέρονται, στο βαθμό που μελετήθηκαν, να παρουσιάζουν γενετικό μονομορφισμό, δηλαδή να εμφανίζουν το ίδιο πρότυπο μεταξύ τους για το τμήμα του 16S rRNA γονιδίου (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Ενδοειδική ανάλυση SSCP σε πληθυσμό *Melolontha melolontha*

3. Ανάλυση της θέσης του τμήματος που ενισχύθηκε

Η ανάλυση BLAST έδειξε κατ' αρχήν ότι το τμήμα που ενισχύθηκε βρίσκεται κοντά στην 5' περιοχή του 16S rRNA γονιδίου, αντίθετα με το τμήμα που ενίσχυαν οι ίδιοι εκκινητές σε ζωικά είδη σε προηγούμενες έρευνες, το οποίο εδραζόταν πλησίον της 3' περιοχής.

Ακόμα, κάνοντας BLAST τους εκκινητές και αναζητώντας τους συμπληρωματικούς τους τόπους σε mtDNA εντόμων, παρατηρήθηκε πως αρκετά συχνά δεν ήταν εξ' ολοκλήρου συμπληρωματικοί και μάλιστα η απουσία συμπληρωματικότητας εμφανιζόταν στο 3' άκρο τους. Το γεγονός αυτό ίσως εξηγεί σε κάποιο βαθμό τη δυσκολία ενίσχυσης του τμήματος, καθώς είναι σημαντικό ειδικά το 3' άκρο των εκκινητών να είναι συμπληρωματικό για να αρχίσει ομαλά η PCR.

Συνοψίζοντας, το τμήμα του γονιδίου 16S *rRNA* που ενισχύθηκε φαίνεται πως είναι ικανό να χρησιμοποιηθεί ως DNA barcode για είδη εντόμων, καθώς εμφανίζει διαειδικούς πολυμορφισμούς και ενδοειδικό μονομορφισμό.

Επισημαίνεται ξανά ότι το τμήμα αυτό **δε** βρίσκεται στο ίδιο σημείο του γονιδίου με το τμήμα που έχει μελετηθεί προηγουμένως στο εργαστήριό μας αναφορικά με την επάρκειά του να διαχωρίζει ζωικά είδη. Το γεγονός αυτό πιθανά μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το γονίδιο 16S *rRNA* στο σύνολό του αποτελεί μία χρήσιμη, μικρής έκτασης, δεξαμενή μοριακών δεικτών με καλή διαχωριστική ικανότητα, πράγμα ευχάριστο, αφού τα δεδομένα του CBOL μέχρι στιγμής υποδεικνύουν πως είναι πολλές οι περιπτώσεις όπου δεν αρκεί η χρήση μόνο ενός μοριακού δείκτη για να διαχωριστούν με επιτυχία τα είδη.

Συμπεράσματα

Σε αυτή την εργασία, ελέγχθηκε η καταλληλότητα ενός τμήματος του γονιδίου *16S rRNA* ως παγκόσμιου μοριακού δείκτη για την ταυτοποίηση ειδών εντόμων και προέκυψαν οι παρακάτω παρατηρήσεις:

- Το τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* εμφανίζει πολυμορφισμό μεταξύ των ειδών, όπως αποδεικνύουν τα δεδομένα της ανάλυσης SSCP και της αλληλούχησης.
- Δεν εμφανίστηκαν ταυτόσημες αλληλουχίες μεταξύ διαφορετικών ειδών, γεγονός που θα πει ότι το συγκεκριμένο τμήμα είναι ικανό να διαχωρίσει τα είδη.
- Δείγματα που ανήκουν στο ίδιο είδος έχουν το ίδιο προφίλ, κατά την ανάλυση SSCP, επομένως είναι δυνατόν να διακριθούν δύο δείγματα που δεν ανήκουν στο ίδιο είδος και χωρίς αλληλούχηση.

Συνεπώς, το συγκεκριμένο τμήμα του γονιδίου *16S rRNA* πληροί τις προϋποθέσεις για να χρησιμοποιηθεί ως DNA barcode για την ταυτοποίηση ειδών εντόμων.

Βιβλιογραφία

- Frézal, L., & Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727-736.
- Ebach, M.C., Holdrege, C., 2005. DNA barcoding is no substitute for taxonomy. *Nature* 434, 697.
- Schindel, D.E., Miller, S.E., 2005. DNA barcoding a useful tool for taxonomists. *Nature* 435, 17–117.
- Ball, S.L., Armstrong, K.F., 2006. DNA barcodes for insect pest identification: a testcase with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Can. J. For. Res.* 36, 337–350.
- Rastogi, G., Dharne, M.S., Walujkar, S., Kumar, A., Patole, M.S., Shouche, Y.S., 2007. Species identification and authentication of tissues of animal origin using mitochondrial and nuclear markers. *Meat Sci.* 76, 666–674.
- Litaker, R.W., Vandersea, M.W., Kibler, S.R., Reece, K.S., Stokes, N.A., Lutzoni, F.M., Yonish, B.A., West, M.A., Black, M.N.D., Tester, P.A., 2007. Recognizing dinoflagellate species using ITS rDNA sequences. *J. Phycol.* 43, 344–355.
- Evans, K.M., Wortley, A.H., Mann, D.G., 2007. An assessment of potential diatom “barcode” genes (cox1, rbcL, 18S and ITS rDNA) and their effectiveness in determining relationships in Sellaphora (Bacillariophyta). *Protist* 158, 349–364.
- Saunders, G.W., 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 360, 1879–1888.
- Lane, C.E., Lindstrom, S.C., Saunders, G.W., 2007. A molecular assessment of northeast Pacific Alaria species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Mol. Phylogenet. Evol.* 44, 634–648.
- Pegg, G.G., Sinclair, B., Briskey, L., Aspden, W.J., 2006. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Sci. Mar.* 70, 7–12.
- Caterino, M.S., Tishechkin, A.K., 2006. DNA identification and morphological description of the first confirmed larvae of Hetaeriinae (Coleoptera: Histeridae). *Syst. Entomol.* 31, 405–418.
- Randrianiaina, R.-D., Glaw, F., Thomas, M., Glos, J., Raminosa, N., Vences, M., 2007. Descriptions of the tadpoles of two species of Gephyromantis, with a discussion of the phylogenetic origin of direct development in mantellid frogs. *Zootaxa* 1401, 53–61.
- Besansky, N.J., Severson, D.W., Ferdig, M.T., 2003. DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don’t know can hurt you. *Trends Parasitol.* 19, 545–546.
- Berkov, A., Feinstein, J., Small, J., Nkamany, M., 2007. Yeasts isolated from neotropical wood-boring beetles in SE Peru. *Biotropica* 39, 530–538.
- Hajibabaei, M., Singer, G.A.C., Hebert, P.D.N., Hickey, D.A., 2007. DNA

barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends Genet.* 23, 167–172

- DeSalle, R., Egan, M.G., Siddall, M., 2005. The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. B* 360, 1905–1916.
- Ferri G, Alù M, Corradini B., Licata M., Beduschi G., 2009. Species identification through DNA "barcodes". *Genetic Testing and Molecular Biomarkers* ;13(3):421-6.
- Hoeh, W. R., K. H. Blakley, and W. M. Brown. 1991. "Heteroplasmy Suggests Limited Biparental Inheritance of *Mytilus* Mitochondrial DNA." *Science* 251 (5000): 1488-1490.
- Sutovsky, P., R. D. Moreno, J. Ramalho-Santos, T. Dominko, C. Simerly, and G. Schatten. 1999. "Ubiquitin Tag for Sperm Mitochondria." *Nature* 402 (6760): 371-372.
- Saccone, C., DeCarla, G., Gissi, C., Pesole, G. & Reyes, A. 1999 Evolutionary genomics in the Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. *Gene* 238, 195–210.
- Terranova, M.S., Brutto, S.L., Arculeo, M., Mitton, J.B., 2007. A mitochondrial phylogeography of *Brachidontes variabilis* (Bivalvia: Mytilidae) reveals three cryptic species. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 45 (4), 289–298.
- Russell, P. 2009 *iGenetics: A Mendelian approach*
- Hulcr, J., Miller, S.E., Setliff, G.P., Darrow, K., Mueller, N.D., Hebert, P.D.N., Weiblen, G.D., 2007. DNA barcoding confirms polyphagy in a generalist moth, *Homona mermerodes* (Lepidoptera: Tortricidae). *Mol. Ecol. Notes* 7, 549–557.
- Dasmahapatra, K.K., Mallet, J., 2006. DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity* 97, 254–255.
- Willams, S.T., Knowlton, N., 2001. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the snapping shrimp genus *Alpheus*. *Mol. Biol. Evol.* 18, 1484–1493.
- Bakker, Second International Barcode of Life Conference, TAIPEI, September 2007
- Meyer, C.P., Paulay, G., 2005. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *Plos Biol.* 3, 2229–2238.
- Mora C, Tittensor DP, Adl S, Simpson AGB, Worm B (2011) How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biol* 9(8): e1001127. doi:10.1371/journal.pbio.1001127
- Αλαχιώτης Σ. (2007). Εισαγωγή στην Εξέλιξη
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, and Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).

Ευχαριστίες

Η διπλωματική αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γενετικής, Συγκριτικής και Εξελικτικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών, κ. Ζήση Μαμούρη, τον οποίο ευχαριστώ θερμά που μου την ανέθεσε και, κατά την πραγματοποίησή της και τη συγγραφή, ήταν ανοικτός για συζήτηση και έκανε χρήσιμες παρατηρήσεις. Ευχαριστώ επίσης την κ. Αικατερίνη Μούτου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιολογίας Σπονδυλωτών και τον κ. Γρηγόριο Αμούτζια, για τη συμμετοχή τους στην τριμελή εξεταστική επιτροπή, την υποψήφια διδάκτορα Κωνσταντίνα Σαρρή για τη βοήθειά της κατά την εκτέλεση των πειραμάτων, την καλή της διάθεση και τη μεγάλη της υπομονή, τον υποψήφιο διδάκτορα Γιαννούλη Θεμιστοκλή, για τις συμβουλές του κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων και τη συγγραφή, και το διδάκτορα Σταμάτη Κωνσταντίνο, ο οποίος, πέρα από την ικανότητά του να λύνει οποιοδήποτε πρόβλημα προκύπτει στο εργαστήριο, θεωρώ ότι, χωρίς να το ξέρει, μας παραδίδει στην καθημερινότητά του μαθήματα ήθους και ευγένειας και τον εκτιμώ αφάνταστα για αυτό. Χάρηκα επίσης πολύ που βρεθήκαμε μαζί και συνεργαστήκαμε με τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου σε ένα ιδιαίτερα φιλικό και όμορφο κλίμα που έχει διαμορφωθεί μέσα στο εργατήριο. Εύχομαι να παραμείνει έτσι.

Τέλος, μα εξίσου σημαντικά, θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου προς τους ανθρώπους που βρέθηκαν γύρω μου τα χρόνια της προπτυχιακής φοιτητικής μου ζωής. Καθόρισαν, ο καθένας με το δικό του μοναδικό τρόπο, άλλος λίγο, άλλος πολύ, έτσι γίνονται αυτά, την οπτική μου για τα πράγματα και τη διάθεσή μου να δρω. Δε υπάρχει χώρος, μα ούτε και λόγος πιστεύω, να τους αναφέρω ονομαστικά. Να'στε καλά.