

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**

**Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών  
του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας  
«ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ - ΜΟΡΙΑΚΗ ΓΕΝΕΤΙΚΗ,  
ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ»**

**Κυτταρογενετική χαρτογράφηση  
ικριωμάτων αλληλούχησης (scaffolds)  
στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae***

**Τσαμαδού Σοφία**

Βιολόγος

**ΛΑΡΙΣΑ 2016**

**Κυτταρογενετική χαρτογράφηση ικριωμάτων αλληλούχησης  
(scaffolds) του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae***

**Cytogenetic mapping of sequencing scaffolds of the olive fruit fly,  
*Bactrocera oleae***

**Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή:**

**Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων Καθηγητής)**

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

**Δροσοπούλου Ελένη**

Επίκουρη καθηγήτρια Μοριακής Βιολογίας–Κυτταρογενετικής Ζωικών Οργανισμών

Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

**Σαραφίδου Θεολογία**

Επίκουρη καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών

Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς είναι ένα έντομο με μεγάλη οικονομική σημασία, καθώς οι απώλειες που προκαλεί στις ελαιοκαλλιέργειες είναι σημαντικές. Έχουν γίνει διάφορες έρευνες για το έντομο αυτό, επειδή η μελέτη του είναι απαραίτητη ώστε να αναπτυχθούν νέες μέθοδοι αντιμετώπισής του φιλικές προς το περιβάλλον.

Στα πλαίσια της μελέτης του εντόμου αυτού έχει γίνει πρόσφατα αλληλούχηση του γονιδιώματός του (GCF\_001188975.1, [https://i5k.nal.usda.gov/Bactrocera\\_oleae](https://i5k.nal.usda.gov/Bactrocera_oleae)) συνδυάζοντας ισχυρές τεχνικές αλληλούχησης (Illumina short reads, Illumina mate pairs και PacBio long reads) όπως επίσης de novo συναρμολόγηση του ολικού τρανσκριπτόματος μέσω Illumina RNA αλληλούχησης. Από την αλληλούχηση που έχει πραγματοποιηθεί προέκυψαν 36.198 scaffolds από τα οποία 52 είχαν σημαντικό μέγεθος, πάνω από 1 Mb. Τα scaffolds αυτά συναρμολογήθηκαν με υπολογιστικά προγράμματα χωρίς να έχουν συμπεριληφθεί δεδομένα κυτταρογενετικής χαρτογράφησης.

Η ύπαρξη πολυταινικών χρωμοσωμάτων στα είδη της τάξης Δίπτερα, όπως ο δάκος, διευκολύνει τη φυσική χαρτογράφηση. Συγκεκριμένα για το δάκο υπάρχουν ήδη διαθέσιμοι φωτογραφικοί χάρτες (Mavragani-Tsipidou *et al.*, 1992), που έχουν αξιοποιηθεί για τον προσδιορισμό των κυτταρογενετικών θέσεων μοριακών δεικτών. Στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η χαρτογράφηση των scaffolds που προέκυψαν από την αλληλούχηση στα πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου. Για να πραγματοποιηθεί η χαρτογράφηση χρησιμοποιήθηκαν οι ήδη χαρτογραφημένοι μοριακοί δείκτες και πραγματοποιήθηκαν *in situ* υβριδισμοί με νέους ανιχνευτές για scaffolds για τα οποία δεν υπήρχε διαθέσιμη πληροφορία. Με αυτόν τον τρόπο χαρτογραφήθηκαν 21 scaffolds αλληλούχησης μεγαλύτερα από 1 Mb που αντιστοιχούν στο 9,9% της αλληλουχίας του γονιδιώματος του δάκου. Επιπλέον, τα δεδομένα της χαρτογράφησης μπορούν να αξιοποιηθούν στην εξελικτική μελέτη διερεύνησης της συνταϊνιακότητας του δάκου με τον συγγενικό οργανισμό *Drosophila melanogaster*.

## ABSTRACT

The olive fruit fly is considered an insect of great economic importance, since it causes great damage in olive tree cultivations. Several projects were made for this insect because studies are essential to develop contemporary, environmental friendly population control methods.

Recently, sequencing of the olive fruit fly genome was completed using a combination of powerful sequencing technologies (Illumina short reads, Illumina mate pairs and PacBio long reads) as well as de novo assembly of whole transcriptome by Illumina RNA sequencing. The sequencing was assembled into 36,198 scaffolds. Of these scaffolds 52 had significant size, over 1 Mb. The scaffolds were assembled with computer programs, while cytogenetic mapping data was not included.

The existence of polytene chromosomes in species of the order Diptera such as the olive fruit fly facilitate physical mapping. Specifically for the olive fruit fly, photographic maps are already available (Mavragani-Tsipidou *et al.*, 1992) that enable determining the position of molecular markers. The present study aims at mapping scaffolds obtained by genome sequencing on the polytene chromosomes of the olive fruit fly. For this purpose the already mapped molecular markers were used. Furthermore, new probes corresponding to segments of scaffolds for which there was no information available were generated. In this way mapping of 21 scaffolds that correspond at 9.9% of the genome of the fruit fly has been achieved. In addition, the sequencing mapping data generated can be proved useful in evolution studies that explore synteny across phylogenetically distant species such between the olive fruit fly and *Drosophila melanogaster*.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στα εργαστήρια Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, και Γενετικής του τομέα Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, του τμήματος Βιολογίας, του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Η εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος Εφαρμογές Μοριακής Βιολογίας - Μοριακή Γενετική - Διαγνωστικοί Δείκτες κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016.

Αρχικά, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο για την εποπτεία του έργου μου. Χωρίς τη βοήθεια του δε θα μπορούσα να ολοκληρώσω την εργασία αυτή. Η εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά την ανάθεση της παρούσας διπλωματικής και το θεωρητικό υπόβαθρο που μου προσέφερε με βοήθησαν στο να εμβαθύνω στο αντικείμενο που αγαπώ.

Ένα θερμό ευχαριστώ στην Κωνσταντίνα Τσουμάνη, μεταδιδακτορική ερευνήτρια του τμήματος. Η βοήθεια και η καθοδήγησή της καθ' όλη την διάρκεια εκπόνησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής ήταν καθοριστική. Οι εύστοχες παρατηρήσεις της συνέβαλαν σε πολύ μεγάλο βαθμό στην ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, τόσο σε πειραματικό επίπεδο, όσο και στη συγγραφή.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Δροσοπούλου Ελένη, επίκουρη καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας του ΑΠΘ, που προσέφερε γενναιόδωρα μεγάλο μέρος του πολύτιμου χρόνου της και την εμπειρία της γύρω από τα θέματα της κυτταρογενετικής. Οι συμβουλές της ήταν πολύτιμες για τη διεξαγωγή όλων των πειραματικών διαδικασιών. Την ευχαριστώ επίσης για τη φιλοξενία που μου προσέφερε στο εργαστήριό της.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Μαυραγάνη-Τσιπιδου Πηνελόπη, καθηγήτρια του τμήματος Βιολογίας του ΑΠΘ, για τη βοήθειά της στις κυτταρογενετικές τεχνικές, αλλά και για την πνευματική καθοδήγηση και τη συνεχή ενθάρρυνση που μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια, από την προπτυχιακή μου εκπαίδευση μέχρι και σήμερα.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Σαραφίδου Θεολογία, επίκουρη καθηγήτρια του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, η οποία δέχτηκε να είναι

μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, για το χρόνο που διέθεσε στην ανάγνωση και την κρίση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ μέσα απ' την καρδιά μου όλους τους εκλεκτούς συναδέλφους που αποτέλεσαν καθημερινούς συμμάχους και συμπαραστάτες κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής, για το φιλικό κλίμα στα εργαστήρια και την υποστήριξη τους.

Ευχαριστώ επίσης όλους τους ανθρώπους που με στήριξαν, την οικογένεια και τους φίλους μου, οι οποίοι στάθηκαν δίπλα μου σε αυτό το ταξίδι της επιστήμης.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....	1
1.1 Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ .....	1
1.1.1 Κατανομή του δάκου .....	1
1.1.2 Κύκλος ζωής .....	2
1.1.3 Οικονομική σημασία-Προβλήματα .....	4
1.1.4 Μέθοδοι αντιμετώπισης.....	5
1.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ.....	7
1.2.1 Τεχνικές αλληλούχησης γονιδιωμάτων .....	8
1.2.2 Χαρτογράφηση γονιδιωμάτων .....	10
1.2.3 Προβλήματα στην αλληλούχηση γονιδιωμάτων.....	14
1.2.4 Συναρμολόγηση ικριωμάτων αλληλούχησης.....	15
1.2.5 Γονιδιακή οντολογία.....	15
1.2.6 Αλληλούχηση στον δάκο .....	16
1.3 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ .....	17
1.3.1 Μιτωτικά χρωμοσώματα.....	17
1.3.2 Πολυταινικά χρωμοσώματα.....	17
1.3.3 Κυτταρογενετική ανάλυση στο δάκο .....	20
2. ΣΚΟΠΟΣ .....	24
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	25
3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ .....	25
3.2 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΜΕ PCR .....	25
3.2.1 Σχεδιασμός εκκινητών .....	25
3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR) .....	28
3.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	31
3.2.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR .....	33
3.3 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ .....	34



3.3.1	Σύνδεση του DNA στον φορέα .....	36
3.3.2	Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση .....	38
3.3.3	Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων .....	39
3.3.4	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (minipreps) .....	40
3.3.5	Δοκιμαστικές πέψεις.....	41
3.3.6	Εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση .....	42
3.4	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΟΛΥΤΑΙΝΙΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ .....	43
3.5	<i>IN SITU</i> ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΣΕ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΠΟΛΥΤΑΙΝΙΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ .....	44
3.5.1	Επισήμανση των ανιχνευτών .....	46
3.5.2	Έλεγχος επισήμανσης ανιχνευτών .....	46
3.5.3	Προετοιμασία παρασκευασμάτων πολυταινικών χρωμοσωμάτων για υβριδισμό .....	47
3.5.4	Υβριδισμός.....	48
3.5.5	Ανίχνευση σήματος .....	49
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ .....	50
4.1	ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΒΑΣΕΙ ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ .....	50
4.2	ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΒΑΣΕΙ ΝΕΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ .....	55
4.2.1	Δημιουργία νέων ανιχνευτών.....	55
4.2.2	<i>In situ</i> υβριδισμοί.....	58
4.2.3	Κυτταρογενετικός χάρτης των scaffolds αλληλούχησης.....	63
5.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	66
5.1	ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ SCAFFOLDS ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ.....	66
5.2	ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ.....	70
6.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	74

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) αποτελεί τον κυριότερο εχθρό των ελαιοκαλλιεργειών. Είναι ένα ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην τάξη Δίπτερα και συγκεκριμένα στην οικογένεια Tephritidae. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει σχεδόν 4.500 γνωστά είδη (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) πολλά από τα οποία έχουν οικονομική σημασία καθώς προκαλούν μεγάλες απώλειες στον χώρο της γεωργίας. Αρχικά, ο δάκος περιγράφηκε το 1790 από τον Rossi με το όνομα *Musca oleae*. Στη συνέχεια ακολούθησαν διαφορετικές ονομασίες, ώσπου σήμερα κατατάσσεται στο γένος *Bactrocera* (White & Elson-Harris, 1992, White & Wang, 1992), που περιλαμβάνει 629 είδη (Drew, 2004). Η συστηματική του κατάταξη είναι η εξής:

**Πίνακας 1: Συστηματική κατάταξη του *B.oleae***

Φύλο	Αρθρόποδα
Κλάση	Insecta
Διαίρεση	Holometabola
Τάξη	Diptera
Οικογένεια	Tephritidae
Γένος	<i>Bactrocera</i>
Είδος	<i>oleae</i>

### 1.1.1 Κατανομή του δάκου

Το έντομο *B. oleae* έχει ως φυτά-ξενιστές την καλλιεργούμενη ελιά (*Olea europaea*) και την αγριελιά (*Olea silvestris*). Δεδομένου ότι αποκλειστική διατροφική πηγή των προνυμφών είναι ο καρπός της ελιάς, η γεωγραφική εξάπλωσή του ακολουθεί την εξάπλωση της ελιάς.

Η Μεσογειακή λεκάνη αποτελεί την περιοχή όπου ο δάκος εμφανίζει έντονη παρουσία, καθώς το 98% των καλλιεργειών ελαιόδεντρων βρίσκονται εκεί (Montiel-Bueno and Jones 2002). Εκτός από τις μεσογειακές περιοχές της νότιας Ευρώπης, το έντομο απαντάται επίσης στη Βόρεια και Νότια Αφρική, στα Κανάρια Νησιά, στη Εγγύς και τη Μέση Ανατολή, την Κεντρική Ασία, τη Νότια και Κεντρική Αμερική, καθώς και στην πολιτεία της Καλιφόρνια των Η.Π.Α (Rice, 2000, Augustinos *et al.*,

2002, Daane & Johnson, 2010) (Εικόνα 1). Ο δάκος της ελιάς έχει εισβάλλει σε όλες αυτές τις περιοχές, και γενικά μπορεί να εμφανιστεί σε σχεδόν όλες τις περιοχές όπου φύονται ελαιόδεντρα. Ωστόσο, δεν έχει παρατηρηθεί εμφάνισή του στην Αυστραλία (Rice, 2000).



Εικόνα 1: Η εξάπλωση του δάκου σε παγκόσμιο επίπεδο.

### 1.1.2 Κύκλος ζωής

Ο δάκος είναι ολομετάβολο έντομο, δηλαδή περιλαμβάνει τέσσερα βασικά αναπτυξιακά στάδια τα οποία εναλλάσσονται. Αυτά είναι: το εμβρυικό στάδιο, το προνυμφικό στάδιο που περιλαμβάνει τρία επιμέρους στάδια, η νύμφη και το ενήλικο άτομο. Συμβαίνουν δύο μεταμορφώσεις, η πρώτη είναι από το στάδιο της προνύμφης σε νύμφη και η δεύτερη από το στάδιο της νύμφης στο ακμαίο άτομο.

Τα χαρακτηριστικά των επιμέρους σταδίων είναι:

- Αυγό: λευκό, επίμηκες και ελλειψοειδές. Έχει μήκος περίπου 0,8 mm. Εναποτίθεται στο μεσοκάρπιο της ελιάς (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Αυγό του εντόμου *B. oleae*.

- Προνύμφη: υπόλευκη ή ανοιχτοκίτρινη, ακέφαλη και άποδη. Το μήκος της τελικά φτάνει τα 7-8 mm. Το πρόσθιο μέρος της είναι πιο στενό από το οπίσθιο (εικόνα 3).



**Εικόνα 3: Προνύμφη του εντόμου *B. oleae*.**

- Νύμφη: αρχικά λευκή αλλά καταλήγει σε καστανοκίτρινο χρώμα τις τελευταίες μέρες του σταδίου. Έχει σχήμα ελλειψοειδές. Το μήκος της κυμαίνεται στα 3,5-4,5 mm, ενώ το πλάτος στα 1,5-2 mm (εικόνα 4).



**Εικόνα 4: Νύμφη του εντόμου *B. oleae*.**

- Ενήλικο ή Ακμαίο: έχει μήκος 4-5 mm. Η κεφαλή του είναι κιτρινοκόκκινη, ενώ έχει δύο μαύρες κηλίδες κάτω από τις κεραίες και σύνθετους κυανοπράσινους ιριδίζοντες οφθαλμούς. Ο θώρακας είναι κιτρινοκόκκινος. Το ραχιαίο τμήμα του είναι μαύρο και έχει τέσσερις επιμήκεις γκριζες ταινίες. Οι πτέρυγες του είναι ιριδίζουσες με μια μικρή καστανή κηλίδα στην κορυφή. Ο ωοαποθέτης, που έχουν τα θηλυκά άτομα, είναι ευδιάκριτος με μήκος 1 mm και έχει το βασικό του τμήμα μαύρο (εικόνα 5).



**Εικόνα 5: Αρσενικό (αριστερά) και θηλυκό (δεξιά) ενήλικο άτομο *B. oleae*.**

Η πολυκυκλικότητα, δηλαδή η ικανότητα να συμπληρώνει περισσότερες από μια γενεές ανά έτος, είναι ένα χαρακτηριστικό του εντόμου. Στις παραμεσόγειες περιοχές παρατηρούνται σε διάστημα ενός έτους από 2 έως 5 γενεές (Kapatos & Fletcher, 1984). Στις περισσότερες περιοχές της Ελλάδας παρατηρούνται 3-4 γενεές δάκου το χρόνο (Tzanakakis, 2006). Ο βιολογικός κύκλος του δάκου επηρεάζεται άμεσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Οι πιο αντιπροσωπευτικοί είναι η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία. Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες εξαρτάται και ο αριθμός των βιολογικών κύκλων που θα ολοκληρωθούν ανά έτος. Η θερμοκρασία στην οποία μπορεί ο πληθυσμός του δάκου να αναπτυχθεί κυμαίνεται από 10°C ως 32°C, με ευνοϊκότερες τις θερμοκρασίες από 20°C ως 25°C. Ευνοϊκότερες τιμές για τη σχετική ατμοσφαιρική υγρασία είναι από 60% έως 80% (Tsitsipis, 1980, Fletcher & Kapatos, 1983).

### **1.1.3 Οικονομική σημασία-Προβλήματα**

Η προσβολή των ελαιοκάρπων από δάκο έχει αρνητικές συνέπειες είτε ποσοτικές είτε ποιοτικές, που οδηγούν στην καταστροφή της παραγωγής ή τη μείωση της εμπορευματικής της αξίας. Οι οικονομικές ζημιές που προκαλεί υπολογίζεται ότι φτάνουν στο 15% της ελαιοπαραγωγής, παρόλη την εφαρμογή εντομοκτόνων για τον έλεγχο του πληθυσμού (Mazomenos *et al.*, 2002). Η καταστροφή μπορεί να επιτευχθεί είτε σε προνυμφικό επίπεδο είτε σε στάδιο ενηλικίωσης (Daane & Johnson, 2010).

Τα θηλυκά άτομα προσελκύονται όταν οι ελιές είναι κατάλληλες για ωοαπόθεση, δηλαδή ώριμες, μεγάλες και πλούσιες σε υγρασία. Ο ωοαποθέτης είναι το όργανο του εντόμου που χρησιμοποιείται για να δημιουργηθεί οπή, έτσι ώστε να γίνει η ωοαπόθεση και στη συνέχεια να απλώσει τον χυμό που εκλύεται για να μη χρησιμοποιήσουν άλλα θηλυκά τον ίδιο καρπό (Fiestas *et al.*, 1972, Girolami *et al.*, 1983). Αρχικά, ζημία μπορεί να προκληθεί κατά τη διαδικασία της ωοαπόθεσης. Τα ενήλικα θηλυκά άτομα που ωοαποθέτουν τρυπούν το επικάρπιο μέσω του ωοθέτη, τον οποίο φέρουν στην άκρη της κοιλίας τους. Κατά συνέπεια δημιουργείται νύγμα, που μειώνει την εμπορική αξία της ελιάς. Τα νύγματα αυτά εμφανίζονται εξωτερικά ως σκούρες κηλίδες (Εικόνα 6). Επίσης, το σημείο της οπής είναι επιρρεπές σε προσβολές από μικροοργανισμούς και μύκητες, γεγονός που οδηγεί στην αυξημένη οξύτητα του λαδιού, και άρα υποβάθμιση ποιότητας του (Neuenschwander & Michelakis, 1978).



**Εικόνα 6:** Ελιές με νύγματα από το έντομο *B. oleae*.

Το προνυμφικό είναι το στάδιο κατά το οποίο παρατηρείται η μεγαλύτερη ζημία. Οι προνύμφες τρέφονται από ιστούς του μεσοκάρπιου, γεγονός που οδηγεί στη δημιουργία στοών στο εσωτερικό του καρπού (Εικόνα 7). Με αυτό τον τρόπο μπορεί να προκληθεί πρόωρη πτώση ή ελάττωση της μάζας των καρπών, επειδή καταλάνώνεται από τις προνύμφες έως και το  $\frac{1}{4}$  του μεσοκάρπιου (Neuenschwander & Michelakis, 1978). Στην Ελλάδα, οι απώλειες μπορούν να φτάσουν και το 30-40% της παραγωγής. Λόγω της χρήσης εντομοκτόνων όμως, περιορίζονται στο 5% (Economidou, 1979). Βέβαια, η χρήση των εντομοκτόνων έχει πολλές αρνητικές συνέπειες.



**Εικόνα 7:** Προνύμφη στο εσωτερικό του καρπού της ελιάς.

#### **1.1.4 Μέθοδοι αντιμετώπισης**

Η επικρατέστερη μέθοδος για την καταπολέμηση του δάκου είναι η χημική καταπολέμηση. Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για τους ψεκασμούς τις τελευταίες δεκαετίες αποτελούνται από οργανοφωσφορικές ουσίες, όπως οι dimethoate και fenthion (Scouras *et al.*, 2007). Άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι τα πυρεθροειδή (Margaritopoulos *et al.*, 2008) και η μακροκυκλική λακτόνη spinosad (GF-120) (Thomas & Mangan, 2005).

Η χρήση των εντομοκτόνων σε υπέρμετρο βαθμό έχει οδηγήσει σε δυσάρεστες συνέπειες. Τα αποτελέσματα φαίνονται λόγω της περιβαλλοντικής ρύπανσης. Χημικά κατάλοιπα έχουν εντοπιστεί στα προϊόντα και το περιβάλλον της ελιάς, γεγονός το οποίο επιβαρύνει την τροφική αλυσίδα, καθώς και την ανθρώπινη

υγεία (Denholm & Rowland 1992). Επιπλέον, η αλόγιστη χρήση των εντομοκτόνων έχει και άλλα μειονεκτήματα. Έχει βρεθεί ότι ορισμένα έντομα εμφανίζουν μεταλλάξεις που τους προσδίδουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, παρεμποδίζοντας τη δράση τους στα έντομα αυτά (Vontas *et al.*, 2001, 2002, Skouras *et al.*, 2007, Kakani *et al.*, 2008, Pereira-Castro *et al.*, 2015). Ακόμη, η δράση τους δεν είναι εκλεκτική, οπότε έχουν ως αποτέλεσμα τη θανάτωση και άλλων ωφέλιμων εντόμων που βρίσκονται στο ίδιο οικοσύστημα.

Εναλλακτικά, ένα μέσο για την παρακολούθηση των πληθυσμών του δάκου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως μέθοδος καταπολέμησης του εντόμου είναι η χρήση δακοπαγίδων. Η μαζική εφαρμογή τους οδηγεί στην καταπολέμηση του δάκου. Η προσέλκυση του εντόμου επιτυγχάνεται μέσω διαφόρων ερεθισμάτων (οσμής, τροφής, φύλου, οπτικά) (Montiel-Bueno & Jones, 2002). Μια ακόμη μέθοδος καταπολέμησης είναι ο βιολογικός έλεγχος. Υπάρχουν πληθυσμοί που δρουν ως παράσιτα, θηρευτές ή παθογόνα ενάντια στο δάκο. Με κατάλληλη διαχείριση μπορούν να περιορίσουν τους πληθυσμούς του εντόμου (για ανασκόπηση: Daane & Johnson, 2010).

Στις σύγχρονες μεθόδους καταπολέμησης των παρασίτων περιλαμβάνεται η Τεχνική Στείρων Εντόμων [Sterile Insect Technique (SIT)]. Αυτή η τεχνική βασίζεται στη μείωση του μεγέθους του πληθυσμού μέσω της μείωσης της μέσης γονιμότητας των θηλυκών εντόμων (Knippling 1955). Στην κλασική SIT αρχικά γίνεται μαζική παραγωγή ατόμων, στη συνέχεια στείρωνονται με εφαρμογή ακτινοβολίας γ και απελευθερώνονται στο πεδίο. Όταν γίνεται σύζευξη των στείρων αυτών αρσενικών ατόμων με τα γόνιμα θηλυκά στο πεδίο, δεν παράγονται απόγονοι, με συνέπεια την κατάρρευση του πληθυσμού του εντόμου στο πεδίο (Robinson, 2002 a, b). Τέτοια πειράματα έγιναν στην Ελλάδα τα έτη 1973-74 και 1979-81 (Economopoulos, 1981, Economopoulos *et al.*, 1977), χωρίς ωστόσο επιτυχή αποτελέσματα.

Γενικά, η κλασική εφαρμογή της SIT παρουσίαζε ορισμένα προβλήματα, όπως ο διαχωρισμός των αρσενικών ατόμων από τα θηλυκά στα έντομα που δεν παρουσιάζουν σεξουαλικό διμορφισμό. Επίσης, τα στείρα θηλυκά άτομα προκαλούν προβλήματα, λόγω των δευτερογενών μολύνσεων στα σημεία των νυγμάτων. Συνήθως τα εργαστηριακά στελέχη προτιμούν να ζευγαρώνουν μεταξύ τους, οπότε

είναι μειωμένος ο αριθμός των επιθυμητών συζεύξεων και μικρότερο ποσοστό στειρότητας εισάγεται στον άγριο πληθυσμό (Frantz, 2005).

Η εξέλιξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA βοήθησε στο να ξεπεραστούν τα προβλήματα της κλασσικής προσέγγισης της SIT. Για να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα του φυλετικού διαχωρισμού, αρχικά αναπτύχθηκαν τα στελέχη γενετικού φυλοδιαχωρισμού [Genetic Sexing Strains (GSS)]. Αυτή η ιδέα βασίστηκε σε μετατοπίσεις επιλέξιμων υπολειπόμενων γενετικών δεικτών που βρίσκονται στο φυλετικό χρωμόσωμα Y των αρσενικών ατόμων (Whitten, 1969) και έχει ως σκοπό την απομάκρυνση των θηλυκών ατόμων πριν την απελευθέρωση, ή τη θανάτωσή τους σε κάποιο αναπτυξιακό στάδιο (Robinson, 1999). Η γενετική μηχανική αξιοποιήθηκε για να δημιουργηθούν βελτιστοποιημένα GSS στελέχη με τη χρήση μεταθετών στοιχείων ως φορείς. Έτσι, δημιουργήθηκαν διαγονιδιακά συστήματα που εστιάζουν στο φυλετικό διαχωρισμό, τη στείρωση και την παρακολούθηση του πληθυσμού (για ανασκόπηση Scolari *et al.*, 2008).

## 1.2 ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΩΝ

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη της Μοριακής Βιολογίας βοήθησε στη μελέτη των γονιδιωμάτων. Η γονιδιωματική ανάλυση αφορά τη μελέτη του συνόλου των γονιδίων ενός οργανισμού, που περιλαμβάνει τη χαρτογράφηση και αλληλούχηση του γονιδιώματος. Η εφαρμογή της συνδυάζει την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA με τεχνικές αλληλούχησης και τη βιοπληροφορική ανάλυση.

Ο καθορισμός της αλληλουχίας του γονιδιώματος αποτελεί το πρώτο βήμα στη γονιδιωματική ανάλυση. Η αλληλούχηση δίνει χρήσιμες πληροφορίες και αποτελεί εργαλείο για την περαιτέρω γενετική ανάλυση των οργανισμών. Η δημιουργία γενετικών και φυσικών χαρτών διευκολύνει την αλληλούχηση, καθώς μπορεί να παρέχει ορόσημα προκειμένου να γίνει η συναρμολόγηση των επιμέρους τμημάτων. Εφόσον υπάρχει διαθέσιμη η πληροφορία για την αλληλουχία του γονιδιώματος, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περαιτέρω μελέτη των οργανισμών. Έτσι, μπορεί να γίνει χαρακτηρισμός της λειτουργίας γονιδίων, εξελικτική σύγκριση αλληλουχιών μεταξύ των οργανισμών, καθώς και διερεύνηση τριτοταγών πρωτεϊνικών δομών (Ruszel, 2009).



### 1.2.1 Τεχνικές αλληλούχησης γονιδιωμάτων

Η τεχνική αλληλούχησης που αναπτύχθηκε από τους Sanger *et al.* το 1997 έκανε εφικτή την αλληλούχηση στα εργαστήρια και έθεσε τα θεμέλια για τη δημιουργία αυτόματων αναλυτών αλληλουχιών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην ενζυμική σύνθεση σημασμένου DNA η οποία τερματίζεται με τη χρήση τροποποιημένων νουκλεοτιδίων. Τα τροποποιημένα νουκλεοτίδια είναι διδεόξυ-νουκλεοτίδια (ddNTPs) στα οποία η 3'-OH ομάδα έχει αντικατασταθεί με H. Χρησιμοποιείται DNA πολυμεράση που έχοντας μια μήτρα DNA συνθέτει την αλυσίδα DNA αρχίζοντας από έναν εκκινητή στο 3' άκρο. Γίνονται 4 ξεχωριστές αντιδράσεις για κάθε βάση. Όταν η DNA πολυμεράση προσθέσει τυχαία ένα διδεόξυ-νουκλεοτίδιο αντί για το κανονικό νουκλεοτίδιο η αντίδραση σταματάει. Τελικά, τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Τα πρώτα μηχανήματα αλληλούχησης που δημιουργήθηκαν βασίζονταν στη μέθοδο κατά Sanger. Γινόταν επισημάνση των τεσσάρων διδεόξυ-νουκλεοτιδίων με τέσσερις διαφορετικές φθορίζουσες χρωστικές και σάρωση της ηλεκτροφόρησης με λέιζερ για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων.

Με την εξέλιξη της τεχνολογίας αλληλούχησης δημιουργήθηκαν πλατφόρμες Next Generation Sequencing με μηχανήματα δεύτερης και τρίτης γενιάς. Τα κυριότερα παραδείγματα είναι οι πλατφόρμες 454 (Roche), Illumina (Illumina), SOLiD (Life technologies) HeliScope (Helicos), Ion Torrent (Life Technologies), PacBio (PacificBiosciences). Στον Πίνακα 2 γίνεται σύγκριση των μεθόδων αυτών (για ανασκόπηση Glenn, 2011).

**Πίνακας 2: Σύγκριση 6 βασικών πλατφορμών αλληλούχησης δεύτερης και τρίτης γενιάς ως προς τη μέθοδο αλληλούχησης, τη μέθοδο ενίσχυσης υποστρώματος, το λόγο επιτυχίας και τις βασικές εφαρμογές (Glenn, 2011).**

Πλατφόρμες αλληλούχησης	Εταιρεία	Μέθοδος αλληλούχησης	Μέθοδος ενίσχυσης υποστρώματος	Λόγος επιτυχίας	Βασικές εφαρμογές
454	Roche	Σύνθεση (κλώνου)	emPCR	Πρώτο μηχανήμα νέας γενιάς, μεγάλο μέγεθος διαβασμάτων	1,2,3,4,7,8
Illumina	Illumina	Σύνθεση	BridgePCR	Πρώτο μηχανήμα βραχέων διαβασμάτων, λιγότερα λάθη, μεγαλύτερη παραγωγή δεδομένων	1,2,3,4,5,6,7,8

SOLiD	Life Technologies	Υβριδισμός	emPCR	Δεύτερο μηχάνημα βραχέων διαβασμάτων, πολύ χαμηλό ποσοστό λαθών	3,5,6,8
Heliscope	Helicos	Σύνθεση	Όχι	Πρώτο μηχάνημα αλληλούχησης μεμονωμένου μορίου DNA	5,8
Ion Torrent	Life Technologies	Σύνθεση (ανίχνευση H <sup>+</sup> )	emPCR	Πρώτο μηχάνημα αλληλούχησης που δε βασίζεται στην εκπομπή φωτός, κόστος < \$100.000	1,2,3,4,8
PacBio	Pacific Biosciences	Σύνθεση	Όχι	Πρώτο μηχάνημα αλληλούχησης μεμονωμένου μορίου DNA σε πραγματικό χρόνο	1,2,3,7,8

#### Εφαρμογές

1 = *de novo* αλληλούχηση σε BACs και βακτηριακά γονιδιώματα , 2 = χαρακτηρισμός μεταγραφώματος, 3 = στοχευόμενη επανααλληλούχηση, 4 = *de novo* αλληλούχηση σε ευκαρυωτικά γονιδιώματα , 5 = επανααλληλούχηση και καταμέτρηση μεταγραφών , 6 = ανίχνευση μεταλλάξεων, 7 = μεταγονιδιωματικές αναλύσεις, 8 = άλλα (ChIP-Seq, microRNA-Seq, Methyl-Seq)

Υπάρχουν δύο προσεγγίσεις για την αλληλούχηση του γονιδιώματος ενός οργανισμού, η ιεραρχημένη στρατηγική αλληλούχησης (hierarchical shotgun sequencing strategy) και η ολική-γονιδιωματική στρατηγική αλληλούχησης (whole-genome shotgun sequencing strategy - WGS). Και στις δύο χρησιμοποιείται ο όρος shotgun, που αναφέρεται στο γεγονός ότι οι αλληλουχήσεις γίνονται σε μικρά επικαλυπτόμενα κομμάτια DNA, που έχουν προκύψει τυχαία με τη βοήθεια υπερήχων ή μερικών πένσεων με ένζυμα περιορισμού. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αλληλούχησης είναι η αλληλούχηση του ανθρώπινου γονιδιώματος, η οποία επιτεύχθηκε ταυτόχρονα από δημόσιους φορείς μέσω του προγράμματος Human Genome Project (I.H.G.S.C., 2001), καθώς και από την ιδιωτική εταιρεία βιοτεχνολογίας Celera Genomics (Venter *et al.*, 2001). Στην πρώτη περίπτωση χρησιμοποιήθηκε η ιεραρχημένη προσέγγιση, ενώ στην δεύτερη η WGS.

Στη WGS τα κομμάτια της αλληλούχησης προκύπτουν από το σύνολο του γονιδιώματος και δημιουργούνται δύο βιβλιοθήκες, με περίπου 2 kb και 10 kb αντίστοιχα. Αντίθετα, στην ιεραρχημένη προσέγγιση έχει προηγηθεί γενετική και φυσική χαρτογράφηση και τα κομμάτια προκύπτουν από κλώνους με πολύ μεγάλα

ενθέματα τα οποία ήδη έχουν τοποθετηθεί σε φυσικούς χάρτες. Στη συνέχεια, η συναρμολόγηση επιτυγχάνεται με τη βοήθεια των χαρτών αυτών. Πλέον η στρατηγική της ολικής γονιδιωματικής αλληλούχησης χρησιμοποιείται περισσότερο, καθώς είναι πιο γρήγορη και φθηνή δεδομένου ότι δεν είναι απαραίτητο να προηγηθεί η κατασκευή γενετικών και φυσικών χαρτών. Με αυτόν τον τρόπο όμως, η συναρμολόγηση γίνεται σε υπολογιστικά προγράμματα και παραλείπονται οι πληροφορίες για το γονιδίωμα που προσφέρει η φυσική χαρτογράφηση. Μια εναλλακτική προσέγγιση που εφαρμόζεται είναι ο συνδυασμός δεδομένων χαρτογράφησης στη WGS. Με αυτόν τον τρόπο, δεδομένα που προέκυψαν από την χαρτογράφηση άκρων σε κλώνους BAC χρησιμοποιούνται ως μοριακοί δείκτες για τη τοποθέτηση των κομματιών της αλληλούχησης στην κατάλληλη θέση (Meyers *et al.*, 2014). Στην οικογένεια Terphritidae, στην οποία ανήκει ο δάκος, λόγω της ύπαρξης πολυταινικών χρωμοσωμάτων, είναι εφικτή η χαρτογράφηση εκ των υστέρων, ακόμα και αν προηγηθεί η αλληλούχηση.

Μέχρι σήμερα έχουν αλληλουχηθεί πολλά έντομα είτε υγειονομικής είτε οικονομικής σημασίας. Την ίδια εποχή με το Human Genome Project αλληλουχήθηκε και το γονιδίωμα του εντόμου *D. melanogaster* που αποτελεί οργανισμό - μοντέλο (Adams *et al.*, 2000). Στη συνέχεια αλληλουχήθηκαν πολλά ακόμα οικονομικά σημαντικά έντομα. Το 2011 ανακοινώθηκε για πρώτη φορά η πρωτοβουλία για το πρόγραμμα 5,000 Insect Genome Project (i5k). Το πρόγραμμα αυτό στοχεύει στην αλληλούχηση των γονιδιωμάτων 5.000 εντόμων και αρthropόδων με οικονομική σημασία (i5K Consortium, 2013). Για να είναι εφικτή η εύκολη πρόσβαση σε αυτά τα δεδομένα, έχει δημιουργηθεί η πλατφόρμα i5k Workspace@NAL (<https://i5k.nal.usda.gov>). Η συγκεκριμένη πλατφόρμα παρέχει τη δυνατότητα επεξεργασίας και οπτικοποίησης των δεδομένων, γεγονός που βοηθάει στην προώθηση της γνώσης στον αγροδιατροφικό τομέα. Από την οικογένεια Terphritidae στην οποία ανήκει ο δάκος, σημαντική ήταν η αλληλούχηση του συγγενικού εντόμου *C. capitata*, που αποτελεί οργανισμό μοντέλο για τα διαγονιδιακά συστήματα φυλετικού διαχωρισμού ([https://i5k.nal.usda.gov/Ceratitis\\_capitata](https://i5k.nal.usda.gov/Ceratitis_capitata)).

### 1.2.2 Χαρτογράφηση γονιδιωμάτων

Ουσιαστικά η χαρτογράφηση αφορά τη δημιουργία ενός χάρτη με στοιχεία για τα χρωμοσώματα. Ο χρωμοσωμικός χάρτης που προκύπτει μπορεί να είναι γενετικός ή φυσικός ανάλογα με τον τύπο χαρτογράφησης που ακολουθήθηκε. Οι διαφορές των

δύο χαρτών έχουν σχέση με τον καθορισμό των αποστάσεων των δεικτών τους και τη διακριτική τους ικανότητα. Επιπλέον, μέσω συγκριτικής χαρτογράφησης μπορεί να δημιουργηθούν χάρτες που δείχνουν τις φυλογενετικές σχέσεις συγγενικών ειδών (Ashburner, 1992). Για να επιτευχθεί η χαρτογράφηση χρειάζονται μοριακοί δείκτες ως σημεία αναφοράς στο γονιδίωμα.

### Μοριακοί δείκτες

Ως δείκτες για τη χαρτογράφηση μπορούν να χρησιμοποιηθούν χαρακτηριστικά που είναι διακριτά είτε σε επίπεδο φαινοτύπου είτε με χρήση μοριακών τεχνικών. Στο παρελθόν χρησιμοποιούνταν και βιοχημικοί δείκτες, όπως ισοένζυμα που είχαν διαφορές στην ηλεκτροφορητική τους ικανότητα (Markert & Moller, 1959), όμως συνοδεύονταν από περιορισμούς που οδήγησαν στο να σταματήσουν να χρησιμοποιούνται. Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι απαραίτητο να είναι πολυμορφικοί και διάσπαρτοι στο γονιδίωμα. Προσπαθώντας να τηρήσουν αυτά τα χαρακτηριστικά δημιουργήθηκαν DNA δείκτες με μοριακές τεχνικές. Αρχικά, από τους πρώτους DNA δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικού θραύσματος (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs). Χρησιμοποιούνται σε πειράματα γενετικής για διάφορους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των εντόμων (Ferdig *et al.*, 1998, Severson *et al.*, 2002). Αυτοί οι δείκτες αφορούν πολυμορφισμούς που δημιουργούνται λόγω μεταλλάξεων στις θέσεις αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού. Κληρονομούνται ως συνεπερέχοντες μεντελικοί δείκτες. Οι απλές σημειακές μεταλλάξεις που προκαλούνται έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ή την καταστροφή θέσεων αναγνώρισης ενζύμου περιορισμού, που αντανακλάται στο μέγεθος των θραυσμάτων DNA μετά από πέψη, που φαίνεται με ηλεκτροφόρηση.

Άλλη κατηγορία γενετικών δεικτών είναι οι απλοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) (Wang *et al.*, 1998). Αυτοί είναι πολυμορφισμοί στους οποίους συμβαίνει αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου. Υπάρχει μεγάλος αριθμός SNPs στο γονιδίωμα του κάθε οργανισμού. Αναλύονται είτε με σύγκριση των αλληλουχιών είτε με υβριδοποίηση με την αλληλουχία στόχο με μεθόδους όπως οι μικροσυστοιχίες.

Μια διαδεδομένη κατηγορία μοριακών δεικτών είναι οι πολυμορφισμοί μήκους απλών αλληλουχιών, ή αλλιώς επαναλήψεις απλών αλληλουχιών, ή απλές

διαδοχικές επαναλήψεις (Simple Sequence Length Polymorphisms, SSLPs ή Simple Sequence Repeats, SSRs, ή Simple Tandem Repeats STRs) (Schletterer, 1998). Τα STRs είναι αλληλουχίες DNA με διαδοχικές επαναλήψεις μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας. Οι πολυμορφισμοί ανιχνεύονται καθώς οι δείκτες διαφοροποιούνται ανάλογα με τον αριθμό των επαναλαμβανόμενων μονάδων. Κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες μεντελικοί χαρακτήρες και εμφανίζουν περισσότερα από δύο αλληλόμορφα στον πληθυσμό. Σε αυτή την κατηγορία δεικτών υπάρχουν οι μινι- και οι μικρο- δορυφόροι. Οι μινιδορυφόροι ονομάζονται και εν σειρά επαναλήψεις μεταβλητού αριθμού (Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs) και έχουν επαναλήψεις 10-60 bp (Ashburner, 1991). Επειδή είναι μεγάλοι σε μέγεθος συνήθως δεν μπορούν να ελεγχθούν με PCR. Επίσης, έχουν το μειονέκτημα ότι συγκεντρώνονται σε ορισμένες περιοχές, όπως τα τελομερή (Brown, 2002). Οι μικροδορυφόροι έχουν επαναλήψεις 1-5 bp, απομονώνονται εύκολα και μπορούν να χαρτογραφηθούν με *in situ* υβριδισμό για γενετικές και πληθυσμιακές αναλύσεις (Ashburner, 1992).

Τέλος, ως μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (ESTs). Αυτές αποτελούν τμήματα DNA με δυνατότητα έκφρασης (Parkinson & Blaxter 2009). Έχουν μέσο μήκος 500bp και προκύπτουν όταν έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία του 5' ή/και του 3' άκρου τμημάτων cDNA. Χρησιμοποιούνται ως δείκτες, καθώς είναι ικανές να προσδένονται λόγω συμπληρωματικότητας σε μοναδικές περιοχές του γονιδιώματος. Έτσι, με *in situ* υβριδισμό μπορεί να καθοριστεί ακριβώς η θέση ενός εκφραζόμενου γονιδίου (Adams *et al.*, 1991).

### Γενετικοί χάρτες

Οι γενετικοί χάρτες χρησιμοποιούν ορισμένους μοριακούς δείκτες κατά μήκος του χρωμοσώματος και δείχνουν τη σειρά και τη σχετική απόσταση των δεικτών αυτών. Για να γίνει η χαρτογράφηση είναι απαραίτητο να υπάρχουν τουλάχιστον δύο διαφορετικά αλληλόμορφα για κάθε δείκτη. Αυτός ο τρόπος χαρτογράφησης δημιουργήθηκε στις αρχές του 20<sup>ου</sup> αιώνα από τον T.H Morgan, που μελετούσε το πειραματόζωο *Drosophila melanogaster*. Ο Morgan παρατήρησε ότι δύο ή περισσότερα γονίδια του ίδιου χρωμοσώματος έχουν την τάση να συγκληρονομούνται. Το φαινόμενο αυτό το ονόμασε σύνδεση (linkage). Επίσης, διαπίστωσε το φαινόμενο του διασκελισμού, δηλαδή της ανταλλαγής γονιδιακού

υλικού μεταξύ μη αδελφών χρωματίδων ομόλογων χρωμοσωμάτων, για να δώσει ερμηνεία στα μη αναμενόμενα αποτελέσματα. Στη συνέχεια ο μαθητής του A. Sturtevant κατέληξε στην υπόθεση ότι ο διασκελισμός είναι τυχαίος και η συχνότητα με την οποία διαχωρίζονται δύο γονίδια που είναι συνδεδεμένα είναι ανάλογη της απόστασής τους. Η απόσταση μεταξύ δύο γενετικών δεικτών που δίνει 1% ανασυνδυασμένα προϊόντα ονομάζεται μονάδα γενετικού χάρτη (map unit) ή centimorgan (cM). Έτσι, μπορούν να κατασκευαστούν γενετικοί χάρτες με βάση τη γενετική απόστασή τους, η οποία όμως δεν συμπίπτει απαραίτητα με την πραγματική απόσταση. Είναι περισσότερο ακριβείς όταν οι γενετικοί δείκτες που επιλέγονται να εξεταστούν βρίσκονται κοντά μεταξύ τους.

### Φυσικοί χάρτες

Οι φυσικοί χάρτες δείχνουν την πραγματική θέση ενός δείκτη ή την πραγματική απόσταση που χωρίζει δύο δείκτες. Χρησιμοποιούνται όταν χρειάζεται να εντοπιστεί η ακριβής θέση μια αλληλουχίας στα χρωμοσώματα ή η απόσταση μεταξύ δύο σημείων. Η φυσική χαρτογράφηση έχει υψηλή διακριτική ικανότητα και μπορεί να δώσει την ακριβή διαδοχή των βάσεων του DNA στα χρωμοσώματα (Casey 1992). Ένας φυσικός χάρτης μπορεί να κατασκευαστεί με διάφορες μεθόδους. Αρχικά, μια μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για φυσική χαρτογράφηση είναι ο *in situ* υβριδισμός. Με αυτή την τεχνική είναι εφικτός ο εντοπισμός της ακριβούς χρωμοσωματικής θέσης DNA αλληλουχιών (Pardue & Gall, 1975). Άλλη μέθοδος χαρτογράφησης βασίζεται στη βοήθεια περιοριστικών ενδονουκλεασών. Με συνδυασμούς διαφορετικών περιοριστικών ενδονουκλεασών και πειράματα μερικής και πλήρους πέψης γίνεται εφικτός ο υπολογισμός των σχετικών αποστάσεων μεταξύ των σημείων όπου υπάρχει θέση αναγνώρισης για κάποιο ένζυμο περιορισμού. Φυσική χαρτογράφηση μπορεί επίσης να γίνει με τη χρήση STSs (Sequence Tagged Sites). Τα STSs είναι αλληλουχίες μεγέθους 100-500 βάσεων με μοναδική θέση στο γονιδίωμα. Μπορούν να ανιχνευτούν με PCR και χαρτογραφούνται, αν υπάρχει ένα σύνολο αλληλοεπικαλυπτόμενων DNA τμημάτων από ένα χρωμόσωμα ή το γονιδίωμα.

### Χάρτες συνταινιακότητας

Κατά την εξέλιξη των οργανισμών συμβαίνουν διάφορες χρωμοσωμικές ανακατατάξεις που αφορούν αλλαγές ενός χρωμοσωμικού τμήματος, όπως διπλασιασμοί ή τριπλασιασμοί, ελλείμματα, αναστροφές και μεταθέσεις (Nussbaum

*et al.*, 2011). Υπάρχουν όμως περιοχές στις οποίες η σειρά διάταξης και ο προσανατολισμός των γονιδίων είναι συντηρημένα ανάμεσα στα είδη (Watson *et al.*, 2007). Ο όρος συνταϊνιακότητα αναφέρεται στην ύπαρξη τέτοιων ορθόλογων γονιδιωματικών περιοχών (Zdobnov & Bork, 2007). Οι χάρτες συνταϊνιακότητας οδηγούν στην ταυτοποίηση συνταϊνιακών ενοτήτων (syntenic blocks), δηλαδή περιοχών με υψηλή συντηρητικότητα συνταϊνιας. Επιπλέον, οι χάρτες αυτοί βοηθάνε στη διαφοροποίηση των ορθόλογων από τα παράλογα γονίδια και επιτρέπουν τον προσδιορισμό του βαθμού συγγένειας των οργανισμών (Watson *et al.*, 2007).

### 1.2.3 Προβλήματα στην αλληλούχηση γονιδιωμάτων

Αρχικά, ένα πρόβλημα που παρουσιάζεται στην αλληλούχηση είναι η ύπαρξη ποσοστού λάθους στα μηχανήματα αλληλούχησης. Επιπλέον στα γονιδιώματα υπάρχουν πολυμορφισμοί νουκλεοτιδίων, οι οποίοι για παράδειγμα στον άνθρωπο υπολογίζονται 1/500 βάσεις. Για την αποφυγή λαθών και το διαχωρισμό των πολυμορφισμών από τα λάθη είναι απαραίτητες οι πολλαπλές αλληλουχήσεις. Έχει υπολογιστεί ότι χρειάζεται να αλληλουχηθούν τουλάχιστον 10 διαφορετικοί κλώνοι, δηλαδή όλο το γονιδίωμα διαβάζεται 10 ανεξάρτητες φορές, οπότε γίνεται δεκαπλάσια κάλυψη (10 X) της αλληλουχίας.

Παρόλο που γίνεται τουλάχιστον δεκαπλάσια κάλυψη του γονιδιώματος εξακολουθούν να υπάρχουν προβλήματα στην αλληλούχηση. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που βρίσκονται σε υψηλά ποσοστά στα γονιδιώματα είναι ένας βασικός λόγος για τον οποίο δεν μπορεί να ολοκληρωθεί η συναρμολόγηση των αλληλουχημένων τμημάτων. Τέτοιες είναι οι μικροδορυφορικές και μινιδορυφορικές αλληλουχίες, καθώς και τα μεταθετά στοιχεία τα οποία εντοπίζονται σε διάσπαρτες θέσεις στο γονιδίωμα. Η επαναληψιμότητα των αλληλουχιών αυτών μπορεί να φτάσει τα πολλά εκατομμύρια αντίγραφα. Το πρόβλημα με τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες έγκειται στο ότι δεν είναι δυνατόν να βρεθεί εύκολα ακριβώς ποιο αντίγραφο αναλύεται όταν οι ίδιες επαναλήψεις βρίσκονται σε πολλά σημεία του γονιδιώματος.

Επίσης, ένα ακόμα πρόβλημα που δημιουργείται στις μεθόδους αλληλούχησης είναι ότι υπάρχουν τμήματα DNA που δεν κλωνοποιούνται. Έχει βρεθεί ότι ιδιαίτερα οι ετεροχρωματικές περιοχές του DNA δεν κλωνοποιούνται εύκολα σε φορείς

κλωνοποίησης. Αν δεν μπορεί να γίνει κλωνοποίηση δεν γίνεται οι περιοχές αλληλουχηθούν.

#### **1.2.4 Συναρμολόγηση ικριωμάτων αλληλούχησης**

Οι επικαλυπτόμενοι κλώνοι που συναρμολογούν ένα συνεχές κομμάτι γονιδιώματος αποτελούν ένα contig. Η συναρμολόγηση επιτυγχάνεται είτε με τη βοήθεια φυσικών χαρτών για την ιεραρχημένη στρατηγική αλληλούχησης είτε με τη βοήθεια υπολογιστικών εργαλείων για τη WGS. Συνήθως για τη WGS γίνεται αλληλούχηση paired-end, δηλαδή αλληλούχηση των δύο άκρων του κάθε κομματιού. Η γνώση της αλληλουχίας στα άκρα καθώς και του μεγέθους των κομματιών επιτρέπει τη συναρμολόγηση κομματιών σε contig.

Μετά τη συναρμολόγηση προκύπτουν μεγαλύτερα κομμάτια τα οποία ονομάζονται ικριώματα αλληλούχησης (scaffolds) και αποτελούνται από επικαλυπτόμενα contigs. Λόγω των προβλημάτων που παρουσιάζονται στην αλληλούχηση δεν είναι εφικτή η ολοκλήρωση της συναρμολόγησης του γονιδιώματος και τα scaffolds που προέκυψαν είναι χωρισμένα με κενά γνωστών μεγεθών. Στη προσπάθεια για την κάλυψη των κενών μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες τεχνικές. Για παράδειγμα, όταν τα κενά είναι μικρά, μπορεί να γίνει ενίσχυση PCR, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τα γνωστά άκρα των αλληλουχιών. Επίσης, τα άκρα των κομματιών μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως νέοι μοριακοί δείκτες για έλεγχο των κλώνων στην ιεραρχημένη προσέγγιση. Μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στη WGS, έτσι ώστε, με υβριδισμό στα χρωμοσώματα δεικτών που βρίσκονται στα άκρα των κομματιών, να βρεθεί η σχετική θέση και κατεύθυνση τους. Αυτό διευκολύνεται στα είδη της τάξης Δίπτερα, όπως ο δάκος, λόγω της ύπαρξης πολυταινικών χρωμοσωμάτων και κατ' επέκταση της δυνατότητας λεπτομερούς φυσικής χαρτογράφησης.

#### **1.2.5 Γονιδιακή οντολογία**

Η γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος προσφέρει τη δυνατότητα διερεύνησης της λειτουργίας των γονιδίων στα πλαίσια της λειτουργικής γονιδιωματικής. Για τη διευκόλυνση αυτού του σκοπού έχει αναπτυχθεί η Βάση Δεδομένων της Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology, GO). Η βάση αυτή αποτελεί ένα δομημένο λεξικό βιολογικών όρων στο οποίο ταξινομούνται μοριακά και κυτταρικά βιολογικά χαρακτηριστικά, ώστε να είναι εφικτός ο λειτουργικός



χαρακτηρισμός ενός γονιδιώματος (Gene Ontology Consortium, 2004). Η χρήση ενός κοινού λεξιλογίου για τη γονιδιακή οντολογία διευκολύνει την ταυτοποίηση των λειτουργιών και των σχέσεων των υποθετικών πρωτεϊνικών προϊόντων ανάμεσα σε διαφορετικά είδη.

Με την *in silico* ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας μπορεί να γίνει πρόγνωση της λειτουργίας των γονιδίων βασιζόμενη σε ομάδες ορθόλογων γονιδίων από καλά χαρακτηρισμένα γονιδιώματα. Υπάρχουν τρεις βασικές λειτουργικές κατηγορίες για την ταξινόμηση των αλληλουχιών: η βιολογική διαδικασία, η μοριακή λειτουργία και η κυτταρική σύσταση. Με την γονιδιωματική αυτή ανάλυση κατανοείται η βιολογία των οργανισμών.

### 1.2.6 Αλληλούχηση στον δάκο

Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου θα προσφέρει σημαντικές πληροφορίες για τον έλεγχο του πληθυσμού του. Η προσπάθεια αυτή είναι σε εξέλιξη καθώς ήδη έχει αλληλουχηθεί το γονιδίωμα και τα δεδομένα που προέκυψαν βρίσκονται σε επεξεργασία. Στις 29/07/2015 κατατέθηκε στη βάση δεδομένων GeneBank το γονιδίωμα του εντόμου (GCF\_001188975.1). Επίσης, έχει γίνει κατάθεση της αλληλουχίας στην πλατφόρμα i5k Workspace@NAL ([https://i5k.nal.usda.gov/Bactrocera\\_oleae](https://i5k.nal.usda.gov/Bactrocera_oleae)). Για να πραγματοποιηθεί η αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνολογίες Illumina short reads, Illumina mate pairs και PacBio long και έγινε κάλυψη 50x του γονιδιώματος. Επιπλέον έγινε *de novo* συναρμολόγηση του ολικού τρανσκριπτόματος μέσω Illumina RNA αλληλούχησης.

Σύμφωνα με τα δεδομένα που κατατέθηκαν στη βάση δεδομένων GeneBank, το συνολικό μέγεθος της αλληλουχίας ήταν 471.780.370 βάσεις, ενώ προέκυψαν 49.755 contigs, που συναρμολογήθηκαν σε 36.198 scaffolds. Από αυτά 52 είχαν σημαντικό μέγεθος πάνω από 1 Mb. Η τιμή N50 για τα scaffolds που χαρακτηρίζει το ελάχιστο μέγεθος scaffolds στο οποίο περιλαμβάνονται οι μισές βάσεις της αλληλούχησης μετά από *de novo* assembly, ήταν N50=139.566. Το L50, δηλαδή ο μικρότερος αριθμός scaffolds των οποίων το μήκος δίνει την τιμή N50 ήταν L50=474.

## 1.3 ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ

### 1.3.1 Μιτωτικά χρωμοσώματα

Το γενετικό υλικό των ευκαρυωτικών οργανισμών οργανώνεται σε χρωμοσώματα, που βρίσκονται στον πυρήνα των κυττάρων τους. Όταν υφίσταται η κυτταρική διαίρεση παρατηρείται έντονη συσπείρωση του γενετικού υλικού λόγω της δυνατότητας της χρωματίνης να αλλάζει μορφή, με αποτέλεσμα το σχηματισμό διακριτών χρωμοσωμάτων (Moser and Swedlow, 2011). Κατά τη μετάφαση της μίτωσης και της μείωσης η χρωματίνη βρίσκεται στην πιο συμπυκνωμένη μορφή. Ο αριθμός και η μορφολογία των μεταφασικών χρωμοσωμάτων αποτελούν τον καρυότυπο και είναι χαρακτηριστικά για κάθε είδος.

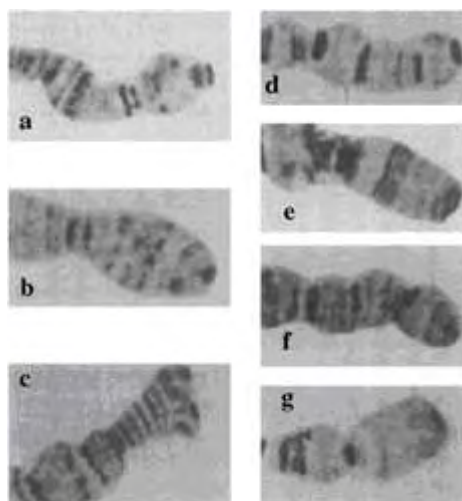
### 1.3.2 Πολυταινικά χρωμοσώματα

Εκτός από τα μιτωτικά χρωμοσώματα, στα Δίπτερα έντομα εμφανίζονται και τα πολυταινικά χρωμοσώματα. Αυτά είναι ειδικά μεσοφασικά χρωμοσώματα τα οποία αποτελούνται από χιλιάδες μόρια DNA. Παρατηρήθηκαν πρώτη φορά από τον Balbiani το 1881 σε προνύμφες *Chironomus plumosus*. Έχουν παρατηρηθεί σε ιστούς διαφόρων οργανισμών, κυρίως σε Δίπτερα αλλά και σε ορισμένους άλλους οργανισμούς όπως κολλέμβολα έντομα (Cassagnau 1971), πρωτόζωα (Ammerman 1971) και αγγειόσπερμα φυτά (Nagl 1969), που όμως υστερούν στην ποιότητα της δομής τους (Clark and Wall 1996). Τα πολυταινικά χρωμοσώματα υπάρχουν σε ιστούς που ιστολύονται κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης (π.χ. σιελογόνοι αδένες, λιπαρά σωματίδια), καθώς και ιστούς που μένουν ίδιοι ως την ενηλικίωση (π.χ. μαλπιγγειανά σωληνάκια) (για ανασκόπηση Zhimulev *et al.* 2004). Η πολυταινία εμφανίζεται όταν υπάρχει αυξημένη ανάγκη ταχείας ανάπτυξης ενός οργάνου (Zhimulev & Koryakov, 2009).

Τα χρωμοσώματα αυτά έχουν χαρακτηριστική μορφολογία. Είναι γιγαντιαία και η δομή τους είναι κυλινδρική επιμήκης. Το μέγεθός του φτάνει τις χίλιες φορές μεγαλύτερο από το μέγεθος των χρωμοσωμάτων στη μείωση και στους πυρήνες των σωματικών κυττάρων (Russel 2009). Σχηματίζονται με ενδομίτωση, η οποία αποτελεί μια μορφή πυρηνοδιάρεσης. Ο κυτταρικός κύκλος αποτελείται από δύο φάσεις, την S και τη G (G1 – G2). Στο τέλος της αντιγραφής τα δύο νέα μόρια DNA παραμένουν συνδεδεμένα μεταξύ τους σε διαφορετικό βαθμό. Κατά τη διάρκεια των κύκλων της αντιγραφής η πυρηνική μεμβράνη και ο πυρηνίσκος παραμένουν ανέπαφα. Όταν η

σύναψη των ομόλογων χρωματίδων επιτυγχάνεται στον μέγιστο βαθμό, μορφολογικά ο αριθμός των χρωμοσωμάτων που παρατηρείται είναι ίδιος με τον αντίστοιχο αριθμό στα απλοειδή αυτοσωμικά χρωμοσώματα (Zhimulev & Koryakov, 2009).

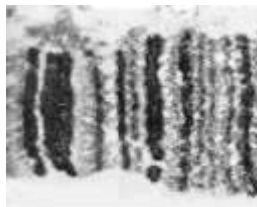
Δομικά, τα πολυταινικά χρωμοσώματα αποτελούνται από δύο βραχίονες. Ο μεγάλος βραχίονας συμβολίζεται με το γράμμα «L» (Left arm), ενώ ο μικρότερος βραχίονας συμβολίζεται με το γράμμα «R» (Right arm). Στην αρχή κάθε χρωμοσωμικού βραχίονα βρίσκεται η άκρη (tip) η οποία είναι χαρακτηριστική για κάθε χρωμόσωμα. Το γεγονός αυτό επιτρέπει την αναγνώριση και την ταυτοποίηση κάθε χρωμοσώματος (Εικόνα 8). Εκτός από τις άκρες των χρωμοσωμάτων, υπάρχουν και άλλες χαρακτηριστικές περιοχές που αποτελούν διαγνωστικά στοιχεία για τα χρωμοσώματα. (Zacharopoulou *et al.*, 1987).



**Εικόνα 8:** Χαρακτηριστική άκρη (tip) για το είδος *B. oleae* που αντιστοιχεί στους βραχίονες: IR(a, b), IIR (c), IIIL (d), IIIR (e), IVL(f), VR (g) (Mavragani- Tsipidou *et al.*, 2002).

Στα πολυταινικά χρωμοσώματα εμφανίζεται ένα πρότυπο ζώνωσης. Η ζώνες (bands) προκύπτουν λόγω της στενής επαφής των πολλαπλών αντιγράφων των χρωματίδων. Οι περιοχές στις οποίες η χρωματίνη εμφανίζεται σε υψηλή συγκέντρωση ονομάζονται χρωμομερή. Τα χρωμομερή εμφανίζονται ως σκουρόχρωμες περιοχές και ακολουθούνται από τις ανοιχτόχρωμες μεσοζώνες (Εικόνα 9). Το πρότυπο των ζωνών, δηλαδή ο αριθμός, η μορφή και η κατανομή τους στα πολυταινικά χρωμοσώματα, είναι χαρακτηριστικό για κάθε είδος, ιστό και αναπτυξιακό στάδιο. Το πρότυπο αυτό είναι σταθερό, αν και έχουν παρατηρηθεί μεταβολές όταν οι ενδό- ή οι εξωκυτταρικές συνθήκες μεταβάλλονται. Σύμφωνα με διάφορες μελέτες οι ζώνες που είναι πιο σημαντικές για το κάθε είδος και όργανο εμφανίζονται σταθερές (Zhimulev and Koryakov, 2009). Η επαναληψιμότητα του

προτύπου των ζωνώσεων έκανε εφικτό το σχεδιασμό χαρτών από πολύ νωρίς (Painter, 1933). Οι χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και ο υβριδισμός *in situ* στα πολυταινικά χρωμοσώματα επιτρέπουν πλέον την χαρτογράφηση των γονιδίων σε ανάλυση των μερικών δεκάδων χιλιάδων βάσεων.



**Εικόνα 9: Διάκριση των σκουρόχρωμων και ανοιχτόχρωμων ζωνών σε τμήμα του πολυταινικού βραχίονα IIR του είδους *Drosophila melanogaster* (Zhimulev and Koryakov, 2009).**

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα χρησιμοποιούνται ευρέως για κυτταρογενετικές μελέτες που αφορούν την ανάλυση της γενετικής οργάνωσης των χρωμοσωμάτων και του συνολικού γονιδιώματος (Zhimulev *et al.*, 2004). Μέσω των πολυταινικών χρωμοσωμάτων μπορούν να εντοπιστούν οι ενεργά μεταγραφικές περιοχές καθώς και να βρεθεί η θέση γονιδίων και μοριακών δεικτών. Η ανάπτυξη του *in situ* υβριδισμού βοήθησε στον εντοπισμό της θέσης αλληλουχιών στα χρωμοσώματα (Pardue and Gall, 1975). Έτσι, μπορούν να κατασκευαστούν κυτταρογενετικοί χάρτες με τις χρωμοσωμικές ανακατατάξεις και τις θέσεις γονιδίων (Mavragani- Tsipidou *et al.*, 2002, Gariou-Alexiou *et al.*, 2002). Οι χάρτες αυτοί συμβάλουν στη μελέτη οργάνωσης των χρωμοσωμάτων, καθώς και σε άλλες εφαρμογές, όπως προγράμματα ολοκληρωμένης διαχείρισης εντόμων και προγράμματα αποκρυπτογράφησης του γονιδιώματος (Stratikopoulos *et al.*, 2008). Έχουν ήδη κατασκευαστεί χάρτες πολυταινικών χρωμοσωμάτων για περισσότερα από 270 είδη της οικογένειας Drosophilidae και άλλα 250 Δίπτερα (Ashburner, 1992).

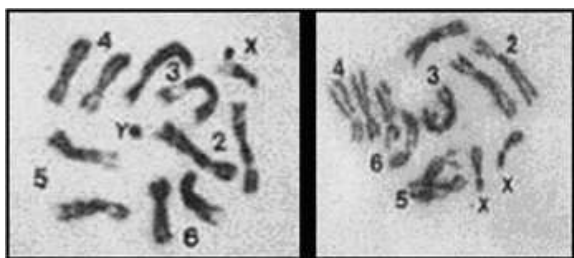
Μεγάλη είναι επίσης η συνεισφορά των πολυταινικών χρωμοσωμάτων σε εξελικτικές μελέτες. Λόγω του ενδοειδικού προτύπου ζωνώσεων που παρουσιάζουν έχουν χρησιμοποιηθεί ως εργαλεία για μελέτες φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα σε είδη (Carson & Yoon, 1982, Lacovaara & Saura, 1982, Lemeunier *et al.*, 1986) καθώς και σε συμπλέγματα ειδών (Clayton & Guest, 1986, Zhimulev *et al.*, 2004).

Επιπλέον, τα πολυταινικά χρωμοσώματα έχουν συμβάλει στη βελτίωση τεχνικής στείρωσης των εντόμων (SIT), μέσω της ανάλυσης των μετατοπίσεων στα GSSs (Robinson *et al.*, 1999). Στην *C. Capitata*, που αποτελεί οργανισμό - μοντέλο

για την SIT, έχει βρεθεί ότι συνήθως τα προβλήματα που αντιμετωπίζουν οι GSSs σχετίζονται με ανασυνδυασμούς που συμβαίνουν στα αρσενικά άτομα στις χρωμοσωμικές περιοχές μεταξύ των αυτοσωμικών σημείων θραύσεων και των περιοχών στις οποίες βασίζεται ο μηχανισμός φυλογενετικού διαχωρισμού (Zacharopoulou & Franz, 2013).

### 1.3.3 Κυτταρογενετική ανάλυση στο δάκο

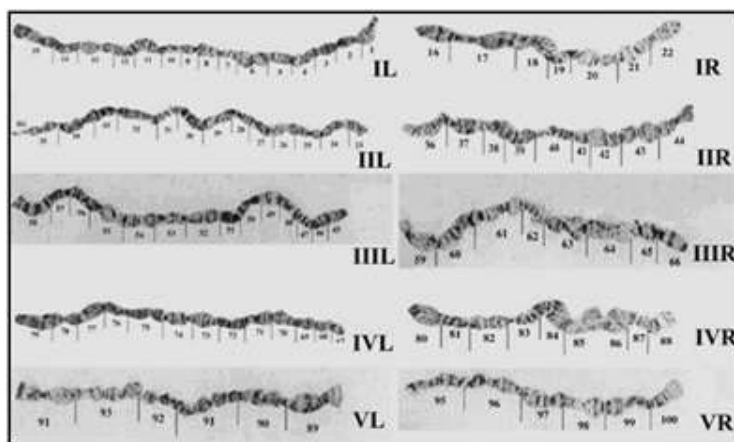
Ο καρυότυπος του δάκου (Εικόνα 10) αποτελείται από έξι ζεύγη χρωμοσωμάτων, πέντε αυτοσωμικά και ένα φυλετικό. Το φυλετικό είναι της μορφής XX/XY όπου XY είναι το αρσενικό άτομο (Frizzi & Springetti 1953, Krimbas, 1963, Mavragani-Tsipidou *et al.* 1992). Τα φυλετικά χρωμοσώματα είναι μικρά σε μέγεθος. Το χρωμόσωμα Y είναι το μικρότερο από τα χρωμοσώματα και έχει σχήμα τελείας ενώ το X μικρότερο από τα αυτοσωμικά. Τα χρωμοσώματα αριθμούνται σύμφωνα με το σύστημα αρίθμησης των Radu *et al.* (1975) που χρησιμοποιήθηκε για το είδος *Ceratitis capitata*, το οποίο υποδεικνύει ότι το πρώτο ζεύγος είναι τα φυλετικά χρωμοσώματα, ενώ τα υπόλοιπα με σειρά μεγέθους από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο αριθμούνται από 2 ως 6. Τα χρωμοσώματα 4, 5 και 6 έχουν παρόμοιο μέγεθος ενώ τα 2 και 3 έχουν μικρές διαφορές στο μέγεθός τους. Και τα πέντε αυτοσωμικά ζεύγη είναι υπομετακεντρικά και η ετεροχρωματίνη περιορίζεται κυρίως στο κεντρομέρος (Mavragani-Tsipidou *et al.*, 1992).



**Εικόνα 10: Μιτωτικά μεταφασικά χρωμοσώματα που προέρχονται από νευρικά γάγγλια λαρβών *B. oleae* σε αρσενικό (αριστερά) και θηλυκό (δεξιά) άτομο (Mavragani-Tsipidou 2002).**

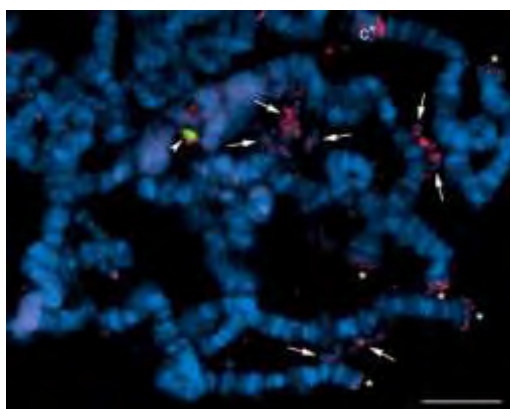
Στο δάκο τα πολυταινικά χρωμοσώματα αναγνωρίστηκαν αρχικά από τον Krimbas το 1963, όπου περιγράφηκαν 10 πολυταινικοί βραχίονες με μεγάλο μήκος και δύο μικρότεροι βραχίονες. Δεδομένα για τους πολυταινικούς χάρτες μπόρεσαν να αξιοποιηθούν μετά από τριάντα χρόνια όταν έγιναν διαθέσιμοι φωτογραφικοί χάρτες από το λιπώδη ιστό (Mavragani – Tsipidou *et al.* 1992), τους σιελογόνους αδένες (Εικόνα 11) και τα μαλπιγγειανά σωληνάρια (Zampetaki *et al.* 1995). Έτσι, οι

κυτταρογενετικές μελέτες έδειξαν την παρουσία 5 χρωμοσωμάτων με δύο βραχίονες το καθένα, που ενώνονται στο κεντρομέρος. Αυτά τα χρωμοσώματα είναι αντίστοιχα με τα 5 αυτοσωμικά μιτωτικά χρωμοσώματα.



Εικόνα 11: Χάρτης πολυταινικών χρωμοσωμάτων από σιελογόνους αδένες προνυμφών *B. oleae* (Mavragani-Tsipidou *et al.*, 1992).

Είναι χαρακτηριστικό ότι τα φυλετικά χρωμοσώματα δεν πολυταινίζονται. Ωστόσο, θεωρείται ότι μια ετεροχρωματινική δομή που παρατηρήθηκε αντιστοιχεί στα φυλετικά χρωμοσώματα (Mavragani-Tsipidou *et al.* 1992). Αυτή η δομή έχει διαφορετική πυκνότητα και μέγεθος στους πυρήνες των δύο φύλων. Στα θηλυκά άτομα είναι μεγαλύτερη και πιο συμπαγής, ενώ στα αρσενικά μικρότερη και πιο χαλαρή (Εικόνα 12). Το ετεροχρωματινικό δίκτυο που σχηματίζεται από τα χρωμοσώματα X καταλαμβάνει έναν αξιοσημείωτο χώρο στον πολυταινικό πυρήνα (Drosopoulou *et al.* 2012). Επιπλέον διαπιστώθηκε ότι δεν υπάρχει χρωμόκεντρο και τα χρωμοσώματα βρίσκονται ανεξάρτητα μεταξύ τους.



Εικόνα 12: Πολυταινικός πυρήνας του *B. oleae* στον οποίο με την τεχνική FISH εντοπίζονται και υποδεικνύονται με βέλη οι θέσεις του X (κόκκινο χρώμα) και του Y (πράσινο χρώμα) χρωμοσώματος στην ετεροχρωματίνη του πυρήνα (Drosopoulou *et al.*, 2012). Με αστερίσκο (\*) φαίνονται οι θέσεις εντοπισμού του χρωμοσώματος X σε τελομερή και με C\* η μία θέση εντοπισμού σε κεντρομέρος.

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη χαρτογράφηση του γονιδιώματος του δάκου. Η πρώτη απόπειρα για *in situ* υβριδισμό στα πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου έγινε το 1999. Σε αυτήν εντοπίστηκαν μοριακοί δείκτες και για τα πέντε αυτοσωμικά χρωμοσώματα χρησιμοποιώντας 9 ετερόλογους δείκτες από τη *Ceratitis capitata* (Zampetaki *et al.* 1999). Αργότερα, χαρτογραφήθηκαν επιπλέον 13 μικροδορυφορικοί δείκτες που συνέβαλαν στην γενετική ανάλυση του εντόμου και τη σύγκριση του με άλλα είδη (Augustinos *et al.* 2008). Το 2011 για πρώτη φορά έγινε η χαρτογράφηση με βάση ESTs που απομονώθηκαν και αντιστοιχούσαν σε υποθετικά γονίδια εντοπίζοντας τελικά 35 ESTs (Tsoumani *et al.* 2011). Σε επακόλουθες μελέτες προστέθηκαν στο χρωμοσωμικό χάρτη επιπλέον 9 γονίδια (Drosopoulou *et al.* 2014). Επίσης, έχει χαρτογραφηθεί το γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (Kakani *et al.* 2013) και η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία του ρετρομεταθετού *Achilles* (Tsoumani *et al.* 2015). Επιπλέον, μελετώντας το πρότυπο θερμοεπαγόμενων διογκώσεων στα χρωμοσώματα που προκαλείται ως απόκριση του δάκου στο περιβαλλοντικό στρες, απομονώθηκαν και χαρτογραφήθηκαν γονίδια θερμικού σοκ (Zampetaki *et al.* 2000, Drosopoulou *et al.* 2009).

Όσον αφορά την ανάλυση της συνταινικότητας του δάκου με άλλα έντομα έχουν γίνει μελέτες σύγκρισης των πειραματικών δεδομένων από *in situ* υβριδισμούς για τα έντομα *C. capitata*, *D. melanogaster* και *Bactrocera tryoni* (για ανασκόπηση Mavragani-Tsipidou, 2002). Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα μελετών σύγκρισης μεταξύ των εντόμων *C. capitata* και *D. melanogaster* (Gariou-Papalexiou *et al.* 2002), καθώς και του *B. oleae* με τη *C. capitata* (Zampetaki *et al.* 1999), οδηγούν στο συμπέρασμα ότι τα χρωμοσώματα I, II, III, IV και V του δάκου αναμένεται να παρουσιάζουν ομολογία με τα χρωμοσώματα X, 3R, 2R, 3L και 2L της *D. melanogaster* και τα χρωμοσώματα 5, 2, 4, 6, 3 της *C. capitata* αντίστοιχα (Πίνακας 3). Επιπλέον, έχει δημιουργηθεί χάρτης συνταινικότητας του δάκου με τη *D. melanogaster* χρησιμοποιώντας 39 γενετικούς δείκτες. Από το χάρτη αυτόν επιβεβαιώθηκε η αντιστοίχιση των χρωμοσωμάτων του δάκου με τη δροσόφιλα και ορίστηκαν συνταινιακές περιοχές (Tsoumani *et al.*, 2011), αν και 14 από τους 39 δείκτες βρισκόταν σε μη συνταινιακές περιοχές. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα ότι έγιναν δομικές χρωμοσωμικές ανακατατάξεις.

**Πίνακας 3: Αντιστοίχιση των χρωμοσωμάτων του *B. oleae* με τα χρωμοσώματα των *C. capitata* και *D. melanogaster*.**

<i>B. oleae</i>	<i>C. capitata</i>	<i>D. melanogaster</i>
I	5	X
II	2	3R
III	4	2R
IV	6	3L
V	3	3R



## 2. ΣΚΟΠΟΣ

Στα πλαίσια της μελέτης του δάκου έχει γίνει πρόσφατα αλληλούχηση του γονιδιώματός του, που θα συνεισφέρει στην ανάπτυξη νέων εργαλείων γενετικής διαχείρισης του εντόμου. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η χαρτογράφηση των scaffolds που προέκυψαν από την πρόσφατη αλληλούχηση, σε πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου. Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε σε δύο στάδια. Σε πρώτη φάση χρησιμοποιήθηκαν ήδη χαρτογραφημένοι μοριακοί δείκτες, ενώ στη συνέχεια σχεδιάστηκαν νέοι ανιχνευτές για τη χαρτογράφηση. Για το σχεδιασμό νέων ανιχνευτών επιλέχθηκαν scaffolds με μεγαλύτερο μέγεθος (μεγαλύτερα από 1 Mb). Επίσης, ο σχεδιασμός έγινε έτσι ώστε σε ορισμένες περιπτώσεις εκτός από τη θέση να προσδιοριστεί και ο προσανατολισμός των scaffolds με τη χρήση δύο μοριακών δεικτών. Τα δεδομένα που προέκυψαν από τη χαρτογράφηση αξιοποιήθηκαν περαιτέρω για τον εμπλουτισμό του κυτταρογενετικού χάρτη, αλλά και τη διερεύνηση εξελικτικών σχέσεων του δάκου με συγγενικά έντομα.

### 3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

#### 3.1 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για τα πειράματα που έγιναν χρησιμοποιήθηκαν νύμφες και ολικό γονιδιωματικό DNA, το οποίο απομονώθηκε από άτομα *B. oleae* του εργαστηριακού στελέχους «Δημόκριτος», που διατηρείται στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

#### 3.2 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ ΜΕ PCR

Η δημιουργία των επιθυμητών ανιχνευτών μέσω PCR ξεκινά με το σχεδιασμό των κατάλληλων εκκινήτων. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται ενίσχυση με PCR, ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης και καθαρισμός των PCR προϊόντων.

##### Σύσταση διαλυμάτων:

- *5X TBE*
  - 54 g Tris- base
  - 27,5 g Βορικό οξύ
  - 20 ml EDTA
  - ddH<sub>2</sub>O 1L
- *6X Διάλυμα φόρτωσης*
  - 0,25 % μπλε της βρωμοφαινόλης
  - 25 % κυανού της ξυλόλης
  - 15%φικόλλη σε dH<sub>2</sub>O
- *Βρωμιούχο αιθίδιο (EthBr)*
  - 0,2 g EthBr
  - 10 ml dH<sub>2</sub>O
  - Έντονη ανάδευση και διατήρηση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

##### 3.2.1 Σχεδιασμός εκκινήτων

Η ανάγκη δημιουργίας των κατάλληλων ανιχνευτών οδήγησε στην αναζήτηση περιοχών των scaffolds που αντιστοιχούν σε γονίδια, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί στη συνέχεια η μοναδικότητα του σήματος κατά τον υβριδισμό. Η ταυτοποίηση των περιοχών αυτών έγινε βάσει ομολογίας με τα ορθόλογα γονίδια της *D. melanogaster*

χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα BLASTX της βάσης δεδομένων NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Ως ακολουθίες υπερώτησης (query sequence) χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες από τα επιλεγμένα scaffolds του δάκου. Κριτήριο για την επιλογή των scaffolds ήταν το μέγεθός τους, το οποίο επιλέχθηκε να είναι μεγαλύτερο από 1 Mb. Ελέγχθηκε επίσης αν υπήρχε ή όχι διαθέσιμος μοριακός δείκτης, ώστε να καθοριστεί στην πρώτη περίπτωση ο προσανατολισμός του scaffold.

Σύμφωνα με τις αλληλουχίες που προέκυψαν σχεδιάστηκαν εκκινητές, ώστε να ενισχυθούν οι επιθυμητές περιοχές που θα αποτελέσουν τελικά τους ανιχνευτές. Οι εκκινητές είναι ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες συμπληρωματικές με τα άκρα της προς ενίσχυση ακολουθίας. Σχεδιάζονται ανά ζεύγη, ώστε ο ένας εκκινητής που ονομάζεται “forward” να συνδέεται στο πρόσθιο τμήμα της επιθυμητής αλληλουχίας ενώ ο άλλος που ονομάζεται “reversed” προσδένεται στο τέλος του τμήματος. Η επιμήκυνση γίνεται ταυτόχρονα, με αποτέλεσμα να ενισχύεται το ενδιαμέσο τμήμα.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών έγινε με το πρόγραμμα primer-BLAST της NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Η επιθυμητή αλληλουχία τοποθετείται στο πεδίο PCR template. Οι παράμετροι που πρέπει να λαμβάνονται υπόψιν στο σχεδιασμό των εκκινητών είναι οι εξής:

- Το μήκος τους να είναι από 18 έως 24 νουκλεοτίδια.
- Η θερμοκρασία τήξης ( $T_m$ ) να κυμαίνεται στους 50-56 °C. Επιπλέον, θα πρέπει οι  $T_m$  των εκκινητών να είναι παραπλήσιες μεταξύ τους.
- Δεν πρέπει να εμφανίζουν συμπληρωματικότητα μεταξύ των μορίων του ίδιου εκκινητή καθώς και μεταξύ των δύο εκκινητών. Έτσι, αποφεύγεται ο σχηματισμός δευτεροταγών δομών και διμερών.
- Το ποσοστό G/C χρειάζεται να είναι 40-60%.
- Στο 3' άκρο δεν πρέπει να εμφανίζονται 3 ή περισσότερα G ή C, ώστε να αποτρέπεται η σύνδεσή τους σε μη ειδικές περιοχές του γονιδιώματος πλούσιες σε επαναλήψεις G/C.

Το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών ορίστηκε να έχει μέγεθος 1-3 Kb. Έγιναν όλοι οι πιθανοί συνδυασμοί των αλγορίθμων, ώστε να βρεθεί ο καταλληλότερος εκκινητής. Είναι προτιμότερο οι τιμές για τη συμπληρωματικότητα των εκκινητών να είναι χαμηλές (self complementarity και self 3' complementarity).

Στην συνέχεια εκκινητές με χαμηλή συμπληρωματικότητα ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>). Για να είναι αποδοτικοί οι εκκινητές επιλέχθηκαν αυτοί που τηρούν ορισμένες προϋποθέσεις: δεν

πρέπει να κάνουν φουρκέτες στο 3' άκρο (hairpin), στο 3' άκρο δεν πρέπει να σχηματίζονται διμερή (Self-Dimer) και το ΔG δεν πρέπει να είναι μεγαλύτερο από -9.

Οι αλληλουχίες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν τελικά, το ομόλογο γονίδιο που ενισχύουν, καθώς και το μέγεθος των προϊόντων PCR και οι θερμοκρασίες υβριδισμού τους, φαίνονται στον Πίνακα 4.

**Πίνακας 4: Δεδομένα για τους εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν. Καταγράφονται οι αλληλουχίες των εκκινητών F και R, οι θερμοκρασίες υβριδισμού (Tm) τους, καθώς και το scaffold στο οποίο αντιστοιχούν, το ομόλογο γονίδιο που ενισχύουν και το μέγεθος του προϊόντος PCR που θα προκύψει τελικά.**

Scaffold	Γονίδιο	Εκκινητής F	Tm F	Εκκινητής R	Tm R	Μέγεθος προϊόντος PCR (bp)
4	Ca <sup>2+</sup> -channel protein alpha subunit T	TTCCTCAGTCC ACCCACATC	60 °C	ACCCAAATTCAA CACAAGCAC	58 °C	1.899
5	MEI-41	ATACTCGGCAA TCATAACTC	54 °C	TTGACCTTCGGTA GACAG	54 °C	1.993
6	rho GTPase activating protein at 15B	CTAGAGTTTAT TAGCCAAGG	61 °C	ATGCTGGAGTAC CAAATC	63 °C	1.208
9	toll-7	ATTCGCCGCTA CGTTCCTAC	60 °C	CTGCCGCTTGCAC TGATTAC	60 °C	1.518
14	BTB (POZ) domain containing 9 ortholog	GCAATCCCATA GTAATAAGC	56 °C	ACTGCCCATATCC ATTAAAC	54 °C	1.724
15	ubiquitin specific protease 47	CTGTCCGTAGT GCTGCAATC	60,5 °C	TCTAATGGGTCCA CAGGAACG	61,3 °C	1.826
17	CG8858	TTTTAAAGCTA GGCAACACAAT CGG	62,5 °C	GAAGTTTGAAGT TGGACGATAAGC	62,5 °C	1.430
32	roundabout 3	AATGTGGTCGG TGCGATCTCC	63,3 °C	TGCTTGCCTTATC CAGTCCATTG	62,9 °C	1.466
37	dynein heavy chain at 16F	TGTACTCTGTC GCCGACTTC	60 °C	CAATGCGTACCG CCAAATCC	60 °C	1.573

### 3.2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR)

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR: Polymerase Chain Reaction) είναι μια εύκολη μέθοδος που επιτρέπει τον *in vitro* πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων τμημάτων DNA μέσω ενζυμικής ενίσχυσης. Στη διαδικασία περιλαμβάνονται επαναλαμβανόμενοι κύκλοι σε διαφορετικές θερμοκρασίες, με γρήγορη μετάβαση από τη μια θερμοκρασία στην άλλη.

Τα απαραίτητα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής:

- Εκκινητής (primer)
- Στόχος DNA (template DNA)
- Τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs)
- DNA πολυμεράση (DNA polymerase)
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer)
- Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου ( $Mg_2Cl$ )

Ως εναρκτήρια μόρια για τη σύνθεση χρησιμοποιούνται δύο αντιπαράλληλοι εκκινητές (primers). Η σύνθεση πραγματοποιείται παράλληλα και στους δύο κλώνους του DNA με τη δημιουργία συμπληρωματικών αλυσίδων ως προς τη μήτρα DNA (template DNA). Με την παρουσία περίσσειας δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) μπορεί να επιτευχθεί η σύνθεση μέσω του ενζύμου Taq DNA πολυμεράση. Πρόκειται για μια ειδική πολυμεράση που απομονώνεται από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και έχει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες (εως 95 °C), οι οποίες χρειάζονται στην PCR. Το ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) είναι απαραίτητο για την αντιγραφή, προκειμένου να ρυθμίζει το pH στο οποίο η δράση της πολυμεράσης να είναι άριστη. Επιπλέον, χρησιμοποιείται το διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου, διότι τα σύμπλοκα μεταξύ των ιόντων  $Mg^{+2}$  και των dNTPs αποτελούν το υπόστρωμα αναγνώρισης της πολυμεράσης. Όταν η συγκέντρωσή τους είναι υψηλή αυξάνεται η δράση της πολυμεράσης και υπάρχει η πιθανότητα να παραχθούν προϊόντα που δεν αντιστοιχούν στην αλληλουχία του στόχου DNA, ενώ όταν είναι χαμηλή μειώνεται η απόδοση της PCR.

Η διαδικασία περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενους κύκλους ενίσχυσης, ο καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια (Εικόνα 13):

1. Στάδιο θερμικής μετουσίωσης-αποδιάταξης του δίκλωνου DNA (denaturation):

Γίνεται διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συμπληρωματικών βάσεων λόγω της απορρόφησης θερμικής ενέργειας από το περιβάλλον. Με την αποδιάταξη αυτή οι περιοχές στις οποίες θα υβριδιστούν οι εκκινητές αποκτούν μονόκλωνη μορφή. Συνήθως η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται το στάδιο είναι 90-95 °C. Η θερμοκρασία καθώς και ο χρόνος της επώασης εξαρτώνται από το ποσοστό γουανίνης και κυτοσίνης (G/C) του τμήματος DNA.

2. Στάδιο υβριδισμού των εκκινητών με τις συμπληρωματικές αλυσίδες (annealing):

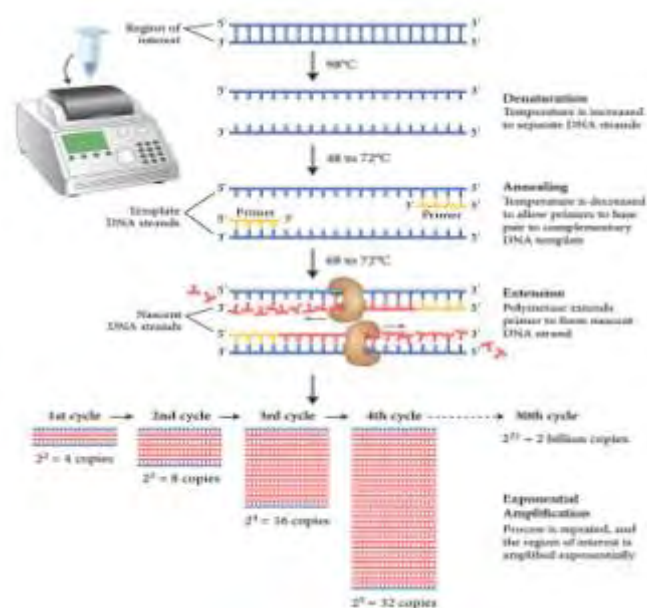
Οι εκκινητές είναι μονόκλωνοι και συμπληρωματικοί στα 5' άκρα της αλληλουχίας στόχου, οπότε υβριδίζονται στις συμπληρωματικές τους θέσεις. Και για αυτό το στάδιο η θερμοκρασία ( $T_{an}$ ) και ο χρόνος επώασης εξαρτώνται από το ποσοστό G/C. Συνήθως αυτή κυμαίνεται στους 50-60 °C και ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης ( $T_m$ ) των εκκινητών. Στη συνέχεια, οι εκκινητές δρουν ως υποστρώματα ώστε η πολυμεράση να προσθέσει τα νουκλεοτίδια σύμφωνα με τη μήτρα DNA.

3. Στάδιο επιμήκυνσης-σύνθεσης συμπληρωματικών ακολουθιών (extension):

Σε αυτό το στάδιο γίνεται η σύνθεση του τμήματος DNA που είναι συμπληρωματικό με τη μήτρα DNA. Η κατεύθυνση της σύνθεσης είναι 5'→3'. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται είναι η θερμοανθεκτική πολυμεράση (Taq). Η θερμοκρασία που ενδείκνυται για τη μέγιστη δραστηριότητα της πολυμεράσης και για να απομακρύνει τους μη ειδικά συνδεδεμένους εκκινητές είναι 72 °C .

Αυτά τα τρία στάδια επαναλαμβάνονται από 20 έως 40 φορές. Για την πραγματοποίηση της αντίδρασης χρησιμοποιείται ειδική συσκευή που ονομάζεται θερμοκυκλοποιητής. Η συσκευή μπορεί να ρυθμιστεί, έτσι ώστε να μεταβαίνει

κυκλικά στις διάφορες θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Το αποτέλεσμα είναι η αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά.



**Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση της PCR. Στην εικόνα φαίνονται τα στάδια αποδιάταξης, υβριδισμού και επιμήκυνσης, που έχουν ως αποτελέσματα την αύξηση του αριθμού των αντιγράφων DNA σε κάθε κύκλο με γεωμετρική πρόοδο.**

### Μεθοδολογία

Σε σωλήνες τύπου PCR (0,2 ml) τοποθετούνται όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια που καταγράφονται στον Πίνακα 5. Στον πίνακα αυτό φαίνονται οι αρχικές και τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων, καθώς και οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε αντίδραση. Η Taq πολυμεράση, τα διαλύματα  $MgCl_2$  και buffer που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από το kit BIOTAQ DNA Polymerase της εταιρείας BIOLINE. Τα dNTPs προέρχονται από την εταιρεία HT Biotechnology LTD (dNTPs Set).

Για κάθε αντίδραση PCR χρησιμοποιείται και ένας αρνητικός μάρτυρας, δηλαδή ένας σωλήνας που περιέχει όλα τα αντιδραστήρια εκτός από DNA. Ο αρνητικός μάρτυρας χρησιμοποιείται για να καταδείξει ότι δεν υπάρχουν επιμολύνσεις στα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται, συνεπώς επιβεβαιώνεται ότι δεν υπάρχουν ψευδώς θετικά αποτελέσματα.

**Πίνακας 5: Οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την PCR.**

Αντιδραστήρια	Αρχική Συγκέντρωση	Τελική συγκέντρωση	Ποσότητες για μια αντίδραση
Buffer	10x	1X	2 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2-3 mM	0,8-1,2 $\mu$ l
dNTPs (mix)	10 mM	0,8 mM	1,6 $\mu$ l
F primer	10 pmol/ $\mu$ l	0,35 pmol/ $\mu$ l	0,7 $\mu$ l
R primer	10 pmol/ $\mu$ l	0,35 pmol/ $\mu$ l	0,7 $\mu$ l
Taq πολυμεράση	5 Unit/ $\mu$ l	1 Unit/ αντίδραση	0,2 $\mu$ l
DNA	40 ng/ $\mu$ l	4 ng/ $\mu$ l	2 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O			Μέχρι τα 20 $\mu$ l
Τελικός όγκος			20 $\mu$ l

Τα δείγματα στη συνέχεια τοποθετούνται σε θερμοκυκλοποιητή, για να γίνει η αντίδραση. Στον Πίνακα 6 φαίνεται το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε. Η θερμοκρασία υβριδισμού των εκκινητών αλλάζει για κάθε ζεύγος ανάλογα με το ποσοστό G-C και αρχικά υπολογίζεται με βάση τον τύπο  $T_{an}=T_m-5^{\circ}\text{C}$ . Η χρονική διάρκεια της επιμήκυνσης είναι ανάλογη με το μέγεθος των κομματιών και εξαρτάται από την ικανότητα της πολυμεράσης να προσθέτει νουκλεοτίδια. Η χρονική διάρκεια του υβριδισμού και ο αριθμός των κύκλων προσαρμόζονταν ανάλογα με το δείγμα για καλύτερα αποτελέσματα.

**Πίνακας 6: Το πρόγραμμα της PCR που ακολουθήθηκε.**

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρονική διάρκεια	
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5 min	
Αποδιάταξη	94°C	30 sec	
Υβριδισμός εκκινητών	$\sim T_m-5^{\circ}\text{C}$	30-40 sec	30-40 κύκλοι
Επιμήκυνση	72°C	30 sec-1 min/1kb	
Τελική επιμήκυνση	72°C	7 min	

### 3.2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια διαδικασία που επιτρέπει τον διαχωρισμό τμημάτων νουκλεϊκών οξέων. Τα νουκλεϊκά οξέα είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω



των φωσφορικών ομάδων των νουκλεοτιδίων. Όταν βρεθούν σε ηλεκτρικό πεδίο έχουν την ιδιότητα να μετακινούνται προς την άνοδο (+) με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του δεκαδικού λογαρίθμου ( $\log_{10}$ ) του μοριακού τους βάρους. Η αγαρόζη είναι ένας γραμμικός πολυσακχαρίτης που σχηματίζει πορώδες πλέγμα, ώστε να μετακινούνται τα μόρια. Η πυκνότητα του πλέγματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση της αγαρόζης.

Για να γίνει ορατό το DNA χρησιμοποιείται βρωμιούχο αιθίδιο (ethidium bromide, EtBr). Το βρωμιούχο αιθίδιο σχηματίζει σύμπλοκο με το DNA και έχει την ιδιότητα να εκπέμπει φθορισμό, όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία. Επίσης, για να είναι ευδιάκριτη η πορεία της ηλεκτροφόρησης των δειγμάτων είναι απαραίτητο να χρησιμοποιηθεί διάλυμα φόρτωσης, που περιέχει δύο χρωστικές (μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανούν της ξυλόλης) οι οποίες μετακινούνται με ταχύτητα περίπου ίδια με του DNA, και μία ουσία υψηλής πυκνότητας, η οποία απαιτείται για να κατακαθίσουν τα δείγματα στις θέσεις φόρτωσης. Επιπρόσθετα, στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα. Υπάρχουν δύο κύρια ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται στην πηκτή αγαρόζης, το TAE (Tris-Acetate-EDTA) και το TBE (Tris-Borate-EDTA). Το TBE έχει καλύτερη ρυθμιστική ικανότητα.

Τελικά, το δείγμα μπορεί να προσδιοριστεί ποιοτικά και ποσοτικά μέσω σύγκρισης με μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών DNA (ladder) που ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα με τα δείγματα. Οι ζώνες του ladder επιτρέπουν τον προσδιορισμό του μεγέθους του τμήματος. Έτσι, δεδομένου ότι γνωρίζουμε το μέγεθος των τμημάτων που πρόκειται να ενισχυθούν, επιβεβαιώνεται ότι έχει ενισχυθεί το επιθυμητό κομμάτι. Επιπλέον, οι ζώνες του ladder έχουν γνωστή συγκέντρωση DNA, γεγονός το οποίο καθιστά εφικτό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης του προϊόντος, όταν η επιθυμητή ζώνη συγκριθεί με τις γνωστές ζώνες.

#### Μεθοδολογία:

1. Η αγαρόζη ζυγίζεται και αναμειγνύεται σε κωνική φιάλη με το ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE που έχει αραιωθεί ώστε από 5X να φτάσει σε συγκέντρωση 0,5X. Θέλουμε το πήκτωμα αγαρόζης να είναι 1% οπότε για 100 ml TBE χρησιμοποιούμε 1 g αγαρόζης. Γίνεται θέρμανση σε φούρνο μικροκυμάτων, μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως.

2. Προσθήκη EtBr σε τελική συγκέντρωση 0,5 µg/ml.
3. Ψύξη της τηγμένης αгарόζης μέχρι τη θερμοκρασία των ~50°C.
4. Έκχυση του διαλύματος στο ειδικό εκμαγείο της ηλεκτροφορητικής συσκευής στο οποίο τοποθετούνται κάθετα «χτενάκια», ώστε να προκύψουν θέσεις για τη φόρτωση των δειγμάτων («πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης»).
5. Απομάκρυνση του «χτενιού», αφού το διάλυμα στερεοποιηθεί, και τοποθέτηση του πηκτώματος σε οριζόντια ηλεκτροφορητική συσκευή που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης ίδιας συγκέντρωσης με αυτό που χρησιμοποιήθηκε στην παρασκευή του πηκτώματος. Η ποσότητα πρέπει να είναι κατάλληλη ώστε να καλύψει πλήρως το πηκτωμα.
6. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης σε αναλογία 1:6 στα δείγματα και φόρτωση των δειγμάτων στα «πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης». Ταυτόχρονη φόρτωση 1 µl Ladder της εταιρείας GeneOn (DNA Ladder 1000 bp/1 kb ladder BLUE ready-to-use).
7. Ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση (100 Volt) σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία όπου φθορίζουν οι ζώνες του DNA λόγω του βρωμιούχου αιθιδίου.

### 3.2.4 Καθαρισμός προϊόντων PCR

Πριν από τη χρήση των ανιχνευτών στον υβριδισμό, τα προϊόντα της PCR καθαρίζονται από τα υπολείμματα της αντίδρασης και απομονώνεται το καθαρό DNA. Όταν δεν υπήρχαν παραπροϊόντα στην ηλεκτροφόρηση έγινε Clean Up, ενώ όταν υπήρχαν μη επιθυμητές ζώνες έγινε Gel Extraction. Για τον καθαρισμό χρησιμοποιήθηκε το κιτ NucleosSpin Gel and PCR Clean-up της εταιρείας MACHEREY-NAGEL. Και στις δύο περιπτώσεις ακολουθείται η ίδια διαδικασία. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι για το Clean Up χρησιμοποιείται απευθείας το προϊόν της PCR, ενώ για το Gel Extraction γίνεται ηλεκτροφόρηση του προϊόντος και κόψιμο των επιθυμητών ζωνών.

#### Μεθοδολογία

##### 1. Α. Για το Clean Up:

Ανάμειξη 1 όγκου (V) προϊόντος PCR με 2 V διαλύματος NTI.

##### B. Για το Gel Extraction:

i. Κόψιμο και ζύγισμα της ζώνης.

- ii. Για 1 V ζώνης προσθήκη 2 V NT.
- iii. Τοποθέτηση σε υδατόλουτρο στους 50 °C μέχρι να λιώσει η ζώνη με ενδιάμεσες ανακινήσεις σε Vortex.
- 2. Μεταφορά σε στήλη.
- 3. Πρόσδεση του DNA στη στήλη με φυγοκέντρωση σε 11.000 g για 30 δευτερόλεπτα.
- 4. Ξέπλυμα με προσθήκη 700 µl NT3.
- 5. Φυγοκέντρωση σε 11.000 g για 30 δευτερόλεπτα.
- 6. Προαιρετικά επανάληψη των βημάτων 4 και 5.
- 7. Στέγνωμα της στήλης με φυγοκέντρωση σε 11.000 g για 1 λεπτό.
- 7. Προαιρετικά επώαση για 2-5 λεπτά στους 70 °C ώστε να απομακρυνθεί τελείως η αιθανόλη που έχει το NT3.
- 8. Τοποθέτηση της στήλης σε νέο σωληνάκι τύπου eppendorf.
- 9. Προσθήκη 15 µl NE.
- 10. Αναμονή 1 min σε θερμοκρασία δωματίου.
- 11. Έκλυση με φυγοκέντρωση σε 11.000 g για 1 λεπτό.
- 12. Προαιρετικά επανάληψη των βημάτων 9-11 για καλύτερη έκλυση του δείγματος, όταν τα κομμάτια είναι μεγαλύτερα από 1.000 βάσεις.

### 3.3 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Ορισμένοι ανιχνευτές, πριν τη σήμανσή τους για τον υβριδισμό, κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς. Για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση είναι απαραίτητο το DNA που θα κλωνοποιηθεί να έχει τα κατάλληλα άκρα ώστε να συνδεθεί στον πλασμιδιακό φορέα. Η διαδικασία που ακολουθεί περιλαμβάνει τη σύνδεση του DNA στον φορέα, το μετασχηματισμό βακτηρίων με τον ανασυνδυασμένο φορέα και στη συνέχεια τον πολλαπλασιασμό και την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων. Τέλος, γίνεται απομόνωση των πλασμιδίων που περιλαμβάνουν το επιθυμητό ένθεμα.

#### Σύσταση διαλυμάτων

- *Υγρό θρεπτικό μέσο SOC*
  - 20 g Βακτοτρυπτόνη
  - 5 g Εκχύλισμα ζύμης
  - 0,5 g NaCl

- 10 ml 250 mM KCl
- 1L ddH<sub>2</sub>O

pH 7.2, αποστείρωση σε αυτόκαυστο και στη συνέχεια προστίθεται:

- 5 ml 2 M MgCl<sub>2</sub>
- 20 ml 1M γλυκόζη

➤ *Στερεό θρεπτικό μέσο LB (LB-agar)*

- 10 g Βακτορυπτόνη
- 5 g Εκχύλισμα ζύμης
- 15 g Άγαρ
- 5 g NaCl
- 1L ddH<sub>2</sub>O

pH 7, αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

➤ *Υγρό θρεπτικό μέσο LB*

- 10 g Βακτορυπτόνη
- 5 g Εκχύλισμα ζύμης
- 15 g Άγαρ
- 5 g NaCl
- 1L ddH<sub>2</sub>O

pH 7, αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

➤ *X-Gal (20 mg/ml)*

- 400 mg X-Gal
- 10 ml DMF (dimethylformamide)

Διατήρηση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία -20°C.

➤ *1M IPTG*

- 238 mg IPTG
- 1 ml dH<sub>2</sub>O

Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.

➤ *Αμπικιλίνη (100 mg/ml)*

- 100 mg Αμπικιλίνη
- 1 ml dH<sub>2</sub>O

Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.

- *Διάλυμα GET*
  - 50 mM γλυκόζη
  - 25 mM Tris-HCl pH 8
  - 10 mM EDTA pH 8
- *Διάλυμα alkali*
  - 0,2N NaOH
  - 1% SDS
- *Διάλυμα οξικού καλίου*
  - 3 M CH<sub>3</sub>COOK pH 4,8
- *1X TE*
  - 10 mM Tris-HCl pH 8,0
  - 1 mM EDTA

### 3.3.1 Σύνδεση του DNA στον φορέα

Αρχικά, για να πραγματοποιηθεί η κλωνοποίηση είναι απαραίτητο να γίνει αντίδραση σύνδεσης (ligation) του επιθυμητού ενθέματος σε κατάλληλους φορείς. Ως ιδανικός φορέας για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου DNA θεωρούνται τα πλασμίδια, καθώς έχουν τα απαραίτητα χαρακτηριστικά για την κλωνοποίηση. Διαθέτουν μικρό μέγεθος, αντιγράφονται ανεξάρτητα από το γονιδίωμα του βακτηρίου-ξενιστή τους δίνοντας μεγάλο αριθμό αντιγράφων και περιέχουν κατά μήκος του πολυσυνδέτη πολλές θέσεις μοναδικές θέσεις για ένζυμα περιορισμού. Επιπλέον, είναι εύκολος ο προσδιορισμός των κλώνων που περιέχουν πλασμίδια, καθώς έχουν γονίδια που προσδίνουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά (Bernard, 1995, Bolivard *et al.*, 1977).

Ο φορέας που χρησιμοποιήθηκε ήταν ο pTZ5RT, ο οποίος έχει προεξέχοντα 3'-T άκρα. Λόγω των άκρων του μπορεί να συνδεθεί με προϊόντα PCR, στα οποία η Taq DNA πολυμεράση έχει δημιουργήσει συμβατά 3'-A άκρα προσθέτοντας μια αδενίνη στο 3' άκρο των δίκλωνων μορίων DNA σε κάθε κύκλο (Aslanidis & de Jong, 1990). Για την κλωνοποίηση ο φορέας χρησιμοποιείται σε γραμμική μορφή. Το γεγονός ότι έχει προεξέχοντα 3'-T στα δύο άκρα αποτρέπει την επανακυκλοποίηση του πλασμιδίου κατά την αντίδραση σύνδεσης. Η κλωνοποίηση πραγματοποιήθηκε με χρήση του InsTAclone PCR Cloning Kit της εταιρείας ThermoFisher SCIENTIFIC.

Για τη σύνδεση του επιθυμητού DNA με το πλασμιδιακό DNA χρησιμοποιείται το ένζυμο T4 DNA λιγάση. Η λιγάση είναι ένα ένζυμο που καταλύει την ομοιοπολική σύνδεση μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών των 5' φωσφορικών ομάδων (5'-P) και των 3' υδροξυλομάδων (3'-OH) τμημάτων DNA με προεξέχοντα ή τυφλά άκρα (Sgaramella & Ehrlich, 1978).

Η αποτελεσματικότητα της αντίδρασης σύνδεσης εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ιόντων, το είδος του άκρων DNA (κολλώδη ή τυφλά άκρα), η συγκέντρωση και το μέγεθος των μορίων DNA. Κατά τη διάρκεια της σύνδεσης υπάρχει η τάση επανακυκλοποίησης των πλασμιδίων. Για αυτόν τον λόγο η αναλογία των μορίων της αλληλουχίας προς κλωνοποίηση και του φορέα πρέπει να είναι από 1:1 ως 3:1 για καλύτερη αποτελεσματικότητα. Η αποτελεσματικότητα εξαρτάται επίσης από διάφορες παραμέτρους. Με βάση τα παραπάνω η ποσότητα του ενθέματος που χρειάζεται για κλωνοποίηση υπολογίζεται σύμφωνα με τον τύπο:  $\text{ng DNA} = \text{ng πλασμιδίου} \times \text{μοριακός λόγος DNA/πλασμιδίου} \times \text{λόγος μεγέθους DNA/πλασμιδίου}$

#### Μεθοδολογία

Σε σωλήνες τύπου erppendorf τοποθετούνται όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια που καταγράφονται στον Πίνακα 7. Η ποσότητα του PCR προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε ήταν σε αναλογία λόγος DNA/πλασμιδίου 3:1.

**Πίνακας 7: Οι συγκεντρώσεις και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίδραση σύνδεσης.**

Αντιδραστήρια	Ποσότητες ανά αντίδραση
Φορέας PTZ5RT (0,17 pmol/ends)	1 μl (55ng)
PCR προϊόν (0,52 pmol/ends)	Ποικίλει
Buffer 5X	4 μl
Λιγάση T4 (5unit/μl)	0,8 μl
Νερό	Μέχρι 20 μl
Τελικός όγκος	20 μl

Επώαση για 1 ώρα στους 22 °C.

### Κατακρήμνιση με αιθανόλη

Πριν να γίνει ο μετασχηματισμός, το προϊόν της σύνδεσης του DNA με το πλασμίδιο κατακρημνίζεται με αιθανόλη, ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα της αντίδρασης και να διατηρηθούν οι συνθήκες χαμηλής ιονικής ισχύος ενώ παράλληλα εξασφαλίζεται και ο μικρότερος δυνατός όγκος DNA.

1. Στην αντίδραση σύνδεσης (20 μl) προστίθεται 80 μl νερό.
2. Προσθήκη 100 μl ισοπροπανόλης.
3. Προσθήκη 20 μl οξικού νατρίου CH<sub>3</sub>COONa 0,3M.
4. Προσθήκη 0,5 μl γλυκογόνου.
5. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση σε 12.000 g για 15 λεπτά.
7. Προσθήκη 150 μl παγωμένης αιθανόλης 70%.
8. Φυγοκέντρηση σε 12.000 g για 15 λεπτά.
9. Στέγνωμα και αναδιάλυση σε 8 μl νερό.

### **3.3.2 Μετασχηματισμός κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση**

Για να εισέλθουν τα πλασμίδια στα βακτηριακά κύτταρα, πρέπει να διαπεράσουν τη μεμβράνη των κυττάρων. Αυτό γίνεται εφικτό εφαρμόζοντας ρεύμα υψηλής τάσης. Οι ηλεκτρικοί παλμοί πρέπει να έχουν μικρή διάρκεια, ώστε να αυξάνεται η διαπερατότητα της μεμβράνης χωρίς να οδηγηθούν τα κύτταρα σε απόπτωση (Neuman *et al.*, 1982). Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται σε συσκευή παροχής ρεύματος.

### Μεθοδολογία

1. Κλάσμα (40 μl) δεκτικών κυττάρων *E. coli* τήκεται σε πάγο. Τα κύτταρα έχουν κατεργαστεί με ηλεκτροδιάτρηση και διατηρούνται στους -80°C.
2. Το κλάσμα αναμιγνύεται με το ανασυνδυασμένο DNA (10 pg ως 25 ng) όγκου 1-2 μl και επωάζεται σε πάγο για 1 λεπτό.

3. Το μίγμα μεταφέρεται σε ειδικά προψυγμένη κυψελίδα διαμέτρου 0,2 cm και στη συνέχεια τοποθετείται στη θέση υποδοχής της συσκευής.
4. Εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός εντάσεως 13,8 kV/cm για 5-6 δευτερόλεπτα.
5. Αμέσως μετά γίνεται προσθήκη 1 ml διαλύματος υγρού θρεπτικού SOC το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου.
6. Ακολουθεί μεταφορά του μίγματος σε δοκιμαστικούς σωλήνες και επώαση υπό ήπια ανάδευση (180 rpm) σε θερμοκρασία 36°C για 1 ώρα. Έτσι τα κύτταρα ανακάμπτουν και μπορούν να εκφράσουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό.
7. Γίνεται επίστρωση της επιθυμητής ποσότητας κυττάρων σε τριβλία petri με στερεό θρεπτικό μέσο LB άγαρ (25-30 ml ανα τριβλίο) παρουσία 100 µg/ml αμπικιλίνης. Επίσης προστίθενται 30 µl x-gal (20 mg/ml) και 3µl IPTG (200 mg/ml).
8. Τα τριβλία petri επωάζονται ανεστραμμένα στους 37 °C για 12-16 ώρες.

### 3.3.3 Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων

Αφού γίνει η κλωνοποίηση, πρέπει να ταυτοποιηθούν οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο DNA. Αρχικά, επιλέγονται τα βακτήρια τα οποία έχουν μετασχηματιστεί με πλασμίδιο. Αυτό επιτυγχάνεται με την καλλιέργειά τους σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο. Στο θρεπτικό υλικό έχει προστεθεί το αντιβιοτικό αμπικιλίνη. Τα πλασμίδια εκφράζουν το γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό, για αυτό τον λόγο τα βακτήρια στα οποία έχει εισαχθεί πλασμίδιο θα επιβιώσουν. Το πλασμίδιο που εισήλθε μπορεί να είναι ανασυνδυασμένο ή μη.

Η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων γίνεται με έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας. Στην αλληλουχία του φορέα περιλαμβάνεται το αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί το αμινοτελικό τμήμα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (lacZ) του βακτηρίου *E. coli*. Στο αναγνωστικό πλαίσιο βρίσκεται ενσωματωμένη η αλληλουχία του πολυσυνδέτη, στην οποία ενσωματώνεται το ένθεμα. Το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης είναι ενζυμικά ενεργό μόνο αν συνδυαστεί το αμινοτελικό με το καρβοξυτελικό του τμήμα. Στα βακτήρια-ξενιστές εκφράζεται μόνο το καρβοξυτελικό τμήμα. Όταν έχει επιτευχθεί η κλωνοποίηση, το αναγνωστικό πλαίσιο του αμινοτελικού τμήματος διακόπτεται, οπότε το γονίδιο δεν εκφράζεται. Σε αντίθετη περίπτωση τα μετασχηματισμένα βακτήρια εκφράζουν την β-



γαλακτοσιδάση (Ulman *et al.*, 1967) σύμφωνα με μια ανοσοχημική αντίδραση (Miller 1972) κατά την οποία παρουσία του αναλόγου της λακτόζης IPTG απενεργοποιείται ο καταστολέας lacZ και επάγεται το οπερόνιο της λακτόζης. Η αντίδραση παρατηρείται οπτικά μέσω της προσθήκης του χρωμογόνου υποστρώματος X-gal, που υδρολύεται από τη γαλακτοσιδάση και προσδίδει μπλε χρώμα στις αποικίες με μη ανασυνδυασμένα πλασμίδια (Horwitz *et al.*, 1964). Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι, στους οποίους δεν μεταβολίζεται το X-gal, εμφανίζουν άσπρο χρώμα.

### 3.3.4 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (minipreps)

Ορισμένοι από τους μετασχηματισμένους βακτηριακούς κλώνους φέρουν ανασυνδυασμένα πλασμίδια που περιλαμβάνουν το επιθυμητό ένθεμα. Στη συνέχεια της διαδικασίας, είναι απαραίτητο να απομονωθεί το πλασμιδιακό DNA που περιλαμβάνει το ένθεμα αυτό. Αρχικά, για την απομόνωση των αποικιών πραγματοποιούνται υγρές καλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό LB broth παρουσία αμπικιλίνης. Έπειτα, ακολουθούνται οι κατάλληλες διεργασίες ώστε να εξέλθει μόνο το πλασμιδιακό και όχι το χρωμοσωμικό DNA.

#### Μεθοδολογία

1. Γίνεται μεταφορά της κορεσμένης βακτηριακής καλλιέργειας σε σωλήνες τύπου eppendorf (1,5 ml).
2. Φυγοκέντρωση για 3 λεπτά σε 3.000 rpm και απόρριψη του υπερκειμένου.
3. Προστίθενται 100 μl παγωμένου διαλύματος GET. Το διάλυμα αυτό περιέχει γλυκόζη για να διατηρείται ισοτονικό το διάλυμα, ώστε να μην σπάνε οι μεμβράνες.
4. Το κύτταρα αναδιαλύονται με vortex και επωάζονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Προστίθενται 200 μl διαλύματος alkali. Το NaOH δημιουργεί κατάλληλες τρύπες στις μεμβράνες, ώστε να εξέλθει το πλασμιδιακό DNA και όχι το χρωμοσωμικό.
6. Το μίγμα ανακατεύεται και επωάζεται στον πάγο για 3-5 λεπτά, ανάλογα με το ιξώδες. Σε αυτό το σημείο σχηματίζεται πυκνό διάλυμα.
7. Ακολουθεί προσθήκη 150 μl παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου (pH 4,8). Το διάλυμα αυτό σταματάει τη λύση των κυττάρων και αντιδρά με το οξικό νάτριο.

8. Επώαση στον πάγο για 8-10 λεπτά και ανάδευση.
9. Φυγοκέντρωση 10 λεπτά σε rpm max.
10. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο eppendorf.
11. Προσθήκη 1V ισοπροπανόλης.
12. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά.
13. Φυγοκέντρωση για 20 λεπτά σε rpm max και αφαίρεση υπερκειμένου.
14. Προσθήκη 0,5 V παγωμένης αιθανόλης 70% ώστε να απομακρυνθούν τα άλατα που έχουν μείνει.
15. Φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε rpm max και αφαίρεση υπερκειμένου. Στέγνωμα των eppendorfs.
16. Αναδιάλυση σε 50-100 μl TE-RNase A για να απομακρυνθεί το RNA (RNase A σε τελική συγκέντρωση 20 μg/ml). Ανάδευση σε vortex για ~5 λεπτά.

### 3.3.5 Δοκιμαστικές πέψεις

Για να επιβεβαιωθεί περαιτέρω η ύπαρξη του επιθυμητού ενθέματος, έγιναν πέψεις με ενδονουκλεάσες περιορισμού. Επιλέχθηκαν ένζυμα ώστε να κόβουν σε δύο σημεία του φορέα, αριστερά και δεξιά από τη θέση σύνδεσης του ενθέματος.

#### Μεθοδολογία

Σε σωλήνα τύπου eppendorf τοποθετούνται τα αντιδραστήρια του Πίνακα 8.

**Πίνακας 8:** Οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις δοκιμαστικές πέψεις.

Αντιδραστήρια	Πόσότητες ανα αντίδραση
DNA	2 μl
Buffer 10X	1 μl
Ένζυμο A (15 u/μl)	0,2 μl
Ένζυμο B (15 u/μl)	0,2 μl
H <sub>2</sub> O	6,6 μl
Τελικός όγκος	10 μl

Ο έλεγχος της πέψης πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση όλης της ποσότητας της πέψης του πλασμιδιακού DNA.

### **3.3.6 Εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση**

Στη συνέχεια, για να αποπρωτεϊνωθεί το DNA γίνεται εκχύλιση με φαινόλη - χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση του δείγματος που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί.

1. Στον όγκο του δείγματος συμπληρώνεται νερό, ώστε ο τελικός όγκος να είναι 300 μl.
2. Προσθήκη ίσου όγκου φαινόλης / χλωροφόρμιου 1:1 (150μl φαινόλη + 150 μl χλωροφόρμιο).
3. Έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση σε 14.000 g για 5 λεπτά.
4. Η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωλήνα.
5. Προστίθεται ίσος όγκος χλωροφόρμιο (300 μl).
6. Έντονη ανάδευση και φυγοκέντρωση σε 14.000 g για 5 λεπτά.
7. Επανάληψη των σταδίων 4-6.
8. Προσθήκη 1V ισοπροπανόλης
9. Προσθήκη οξικού νατρίου CH<sub>3</sub>COONa σε τελική συγκέντρωση 0,3M.
10. Προσθήκη 0,5 μl γλυκογόνου.
11. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
12. Φυγοκέντρωση σε 12.000 g για 15 λεπτά.
13. Προσθήκη παγωμένης αιθανόλης 70%.
14. Φυγοκέντρωση σε 12.000 g για 15 λεπτά.
15. Στέγνωμα και αναδιάλυση σε νερό.

### 3.4 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΟΛΥΤΑΙΝΙΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ

Για τους υβριδισμούς χρησιμοποιήθηκαν παρασκευάσματα πολυταινικών χρωμοσωμάτων του δάκου. Η απομόνωσή τους έγινε από σιελογόνους αδένες. Οι σιελογόνοι αδένες μπορούν να απομονωθούν από νύμφες ή προνύμφες του εντόμου, όμως έχει διαπιστωθεί ότι καλύτερης ποιότητας παρασκευάσματα προκύπτουν από νύμφες στο στάδιο από την πρώτη έως την τέταρτη ημέρα. Στην παρούσα διπλωματική εργασία, τα παρασκευάσματα των πολυταινικών χρωμοσωμάτων δημιουργήθηκαν από νεαρές νύμφες τρίτης ημέρας.

#### Σύσταση διαλυμάτων

➤ *Διάλυμα Ringer εντόμων pH 6,8*

- 6,5 g NaCl
- 0,14 g KCl
- 0,20 g NaHCO<sub>3</sub>
- 0,12 g CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O
- 0,01 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O
- 1L dH<sub>2</sub>O

➤ *Διάλυμα οξικού οξέος*

45% οξικό οξύ σε dH<sub>2</sub>O

➤ *Μονιμοποιητικό διάλυμα*

Γαλακτικό οξύ/dH<sub>2</sub>O/οξικό οξύ σε αναλογία 2:3:4,5.

#### Μεθοδολογία

1. Αρχικά, σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα γίνεται εξαγωγή των σιελογόνων αδένων σε διάλυμα Ringer. Το διάλυμα Ringer είναι ισοτονικό και χρησιμοποιείται για να εξασφαλιστεί η ωσμωτικότητα των κυττάρων και να αποτραπεί η διάρρηξη των μεμβρανών.
2. Οι αδένες μεταφέρονται σε διάλυμα οξικού οξέος 45%, όπου παραμένουν μέχρι να γίνουν γαλακτόχρωμοι. Ο χρόνος παραμονής δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα 2-3 λεπτά.
3. Το μισό κάθε αδένα μεταφέρεται σε καλυπτρίδα με μία σταγόνα (10-15 μl) μονιμοποιητικού διαλύματος και επωάζεται για 2-3 λεπτά.

4. Πάνω στην καλυπτρίδα τοποθετείτε μια αντικειμενοφόρος πλάκα και στην συνέχεια αντιστρέφονται, ώστε η καλυπτρίδα να βρίσκεται στην πάνω πλευρά.
5. Ασκείτε ελαφριά πίεση για να σπάσουν οι μεμβράνες των κυττάρων και των πυρήνων και να απλωθούν τα χρωμοσώματα. Γίνεται έλεγχος με οπτικό μικροσκόπιο και επανάληψη του σταδίου μέχρι να επιτευχθεί η επιθυμητή λύση.
6. Ασκείται ισχυρή πίεση με τον αντίχειρα στα παρασκευάσματα, με σκοπό να γίνουν επίπεδοι οι βραχίονες.
7. Τα παρασκευάσματα διατηρούνται στους  $-20^{\circ}\text{C}$  για 2-3 ημέρες.
8. Τα παρασκευάσματα εμβαπτίζονται σε υγρό άζωτο και γρήγορα απομακρύνονται οι καλυπτρίδες με την άκρη ενός ξυραφιού.
9. Αφυδάτωση των παρασκευασμάτων σε αιθανόλη 100% για 15 λεπτά δύο φορές.
10. Η διατήρηση των παρασκευασμάτων γίνεται στο ψυγείο στους  $-4^{\circ}\text{C}$ . Η διατήρηση μπορεί να διαρκέσει μέχρι 2-3 μήνες, καθώς στη συνέχεια τα παρασκευάσματα αλλοιώνονται.

### 3.5 *IN SITU* ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΣΕ ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΠΟΛΥΤΑΙΝΙΚΩΝ ΧΡΩΜΩΣΩΜΑΤΩΝ

Για να πραγματοποιηθεί *in situ* υβριδισμός των ανιχνευτών που δημιουργήθηκαν, στα παρασκευάσματα πολυταινικών χρωμοσωμάτων, χρειάζεται αρχικά να γίνει επισήμανση των ανιχνευτών με διξογιζενίνη. Η σήμανση των ανιχνευτών ελέγχεται με έλεγχο σήματος σε μεμβράνη. Στη συνέχεια, ακολουθεί η προετοιμασία των παρασκευασμάτων και έπειτα ο υβριδισμός των αποδιαταγμένων ανιχνευτών σε μετουσιωμένα χρωμοσώματα. Τέλος, γίνεται η ανίχνευση του σήματος του υβριδισμού και τα παρασκευάσματα παρατηρούνται σε μικροσκόπιο αντίθεσης φάσεων.

#### Σύσταση διαλυμάτων

- Διάλυμα υβριδισμού
  - 25  $\mu\text{l}$  20X SSC
  - 2  $\mu\text{l}$  5% SDS

- 20 µl Αντίδραση
- 53 µl ddH<sub>2</sub>O
- *20X SSC pH 7*
  - 175,3 g NaCl
  - 88,2 g Tris-Sodium Citrate
  - 1L ddH<sub>2</sub>O
- *Buffer 1*
  - $100 \times 10^{-3}$  M Tris- HCl pH 7,5
  - $150 \times 10^{-3}$  M NaCl
- *Buffer 2*

Συγκέντρωση 0,5% w/v

  - 1g Blocking reagent (παρέχεται από το κιτ)
  - 200 ml Buffer 1

Απαραίτητη είναι η ανάδευση και η θέρμανση σε μέγιστη θερμοκρασία 65°C.
- *Buffer 3*
  - $10^{-1}$  M Tris- HCl pH 9,5
  - $10^{-1}$  M NaCl
- *Tris- HCl 1M*
  - 121,14 g/mol Tris
  - 800 ml ddH<sub>2</sub>O
  - 25 ml HCl

Σταδιακή προσθήκη HCl έως το pH 7,5 ή 9,5.
- *Διάλυμα αντισωμάτων*

Αραίωση 1:500

  - 1 µl Αντισώματα
  - 3 ml Buffer 2
- *Διάλυμα χρώματος*

Αραίωση 1:50

  - 60 µl Χρωμογόνο
  - 3 ml Buffer 3
- *0,07 M NaOH*
  - 0,84 g NaOH
  - 300 ml ddH<sub>2</sub>O

Παρασκευάζεται επί τόπου από pellets NaOH.

### 3.5.1 Επισήμανση των ανιχνευτών

Οι ανιχνευτές που δημιουργήθηκαν με ενίσχυση PCR επισημαίνονται πριν γίνει ο υβριδισμός, ώστε τα σημεία του υβριδισμού να είναι ορατά στη συνέχεια με μικροσκόπιο. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την επισήμανση είναι των τυχαίων εξαμερών (Random primers). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει αποδιάταξη του δίκλωνου ανιχνευτή και αντιγραφή της κάθε αλυσίδας. Η αντιγραφή γίνεται με τη βοήθεια τυχαίων εξαμερών εκκινήτων (random primers) και του ενζυμικού κλάσματος Klenow της DNA πολυμεράσης I που έχει ενεργότητες 5'→3' πολυμεράσης και 3'→5' εξωνουκλεάσης. Ως πρόδρομο μόριο χρησιμοποιήθηκε το d-UTP επισημασμένο με το στεροειδές απτένιο διγοξυγενίνη (Dig-11-dUTP). Το κιτ που χρησιμοποιήθηκε ήταν το “Dig-High Prime” της εταιρείας Roche.

#### Μεθοδολογία

1. Σε ένα σωλήνα τύπου eppendorf προστίθεται 500-1000 ng DNA. Ο τελικός όγκος πρέπει να είναι 16 μl. Σε περίπτωση που το DNA έχει μικρότερο όγκο συμπληρώνεται με αποσταγμένο νερό.
2. Αποδιάταξη του DNA μέσω βρασμού για 10 λεπτά και άμεση τοποθέτησή του σε πάγο.
3. Προσθήκη 4 μl Mix Dig - High Prime και spin ώστε να αναδευθεί το διάλυμα.
4. Επώαση του δείγματος για 24 ώρες στους 37 °C.
5. Η αντίδραση σταματά μετά από 24 ώρες με την προσθήκη 2 μl 0,2 M EDTA pH 8.0, που έχει τη δυνατότητα να δεσμεύει τα Mg<sup>2+</sup>.
6. Προσθήκη 100 μl διαλύματος υβριδισμού.
7. Αποθήκευση του σημασμένου ανιχνευτή στους -20 °C μέχρι τη χρήση του σε *in situ* υβριδισμό.

### 3.5.2 Έλεγχος επισήμανσης ανιχνευτών

Προαιρετικά μπορεί να γίνει έλεγχος του σήματος των ανιχνευτών για να καθοριστεί η αποτελεσματικότητα της σήμανσης. Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή που θα ακολουθηθεί για την ανίχνευση στα χρωμοσώματα. Αντί για παρασκευάσματα χρησιμοποιείται μια μεμβράνη υβριδισμού.

#### Μεθοδολογία

1. Γράφουμε τη μεμβράνη για να χωρίσουμε τις θέσεις του κάθε ανιχνευτή, προσθέτουμε 1μl από κάθε ανιχνευτή και περιμένουμε μέχρι να μη διακρίνονται οι κουκίδες στη μεμβράνη.
2. Έκθεση της μεμβράνης σε υπεριώδη ακτινοβολία UV για 5 λεπτά. Η έκθεση δεν πρέπει να ξεπεράσει τα 5 λεπτά διότι υπάρχει κίνδυνος καταστροφής του DNA.
3. Πλύσιμο με buffer 1 για 5 λεπτά.
4. Πλύσιμο με buffer 2 για 20 λεπτά.
5. Πλύσιμο με buffer 1 για 20 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση αντισωμάτων για 5 λεπτά σε 10000 rpm.
7. Αραίωση αντισωμάτων 1:500 με 1 μl αντίσωμα και 3 ml buffer 2.
8. Τοποθέτηση της μεμβράνης στο διάλυμα αντισωμάτων για 30 λεπτά.
9. Ξέπλυμα σε buffer 1 για 15 λεπτά δύο φορές.
10. Τοποθέτηση της μεμβράνης σε buffer 3.
11. Μεταφορά της μεμβράνης σε διάλυμα με 3 ml buffer και 60 μl διάλυμα χρώσης.
12. Επώαση για 30-40 λεπτά σε σκοτεινό σημείο.
13. Διακοπή της αντίδρασης με έκπλυση με αποσταγμένο νερό.
14. Έλεγχος σήματος.

### **3.5.3 Προετοιμασία παρασκευασμάτων πολυταινικών χρωμοσωμάτων για υβριδισμό**

Τα παρασκευάσματα χρειάζονται προετοιμασία πριν γίνει ο υβριδισμός. Η συγκεκριμένη προετοιμασία ενισχύει τη σταθεροποίηση των χρωμοσωμάτων στην αντικειμενοφόρο πλάκα, έτσι ώστε να μη χαλάσουν τα παρασκευάσματα κατά τη διαδικασία. Η επίτευξη του υβριδισμού προϋποθέτει τη μετουσίωση των χρωμοσωμάτων. Η μεθοδολογία που ακολουθείται οδηγεί στη σταθεροποίηση και την αποδιάταξη των χρωμοσωμάτων.

#### Μεθοδολογία

1. Ενυδάτωση των παρασκευασμάτων με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης 70, 50 και 30% για 2 λεπτά.
2. Γρήγορο ξέπλυμα σε 2X SSC.



3. Τοποθέτηση των παρασκευασμάτων σε σκεύος με 2X SSC και επώαση σε υδατόλουτρο στους 65°C για 30 λεπτά για να στερεοποιηθούν τα παρασκευάσματα.
4. Γρήγορο ξέπλυμα σε 2X SSC.
5. Μετουσίωση για 1 λεπτό και 50 δευτερόλεπτα σε 0,07 M NaOH που έχει παρασκευαστεί πρόσφατα.
6. Γρήγορο ξέπλυμα με 2X SSC.
7. Αφυδάτωση με διαλύματα αιθυλικής αλκοόλης αυξανόμενης συγκέντρωσης 30, 50, 70 και 96% για 2 λεπτά.
8. Στέγνωμα των παρασκευασμάτων στον αέρα.
9. Προετοιμασία του σκεύους όπου θα γίνει ο υβριδισμός. Αυτό αποτελεί ένα κουτί με επίπεδη εσωτερική βάση που κλείνει αεροστεγώς. Στη βάση εφαρμόζεται διηθητικό χαρτί εμποτισμένο με 5X SSC ενώ στις δύο άκρες προσαρμόζονται βάσεις, ώστε να στηριχθούν τα παρασκευάσματα που θα τοποθετηθούν στο επόμενο στάδιο. Φύλαξη του κουτιού υβριδοποίησης στον κλίβανο στους 63°C, δηλαδή στη θερμοκρασία που θα γίνει ο υβριδισμός.

### 3.5.4 Υβριδισμός

Ο υβριδισμός πραγματοποιείται σε σταθερή θερμοκρασία και υγρασία. Για αυτόν το λόγο χρησιμοποιείται ο κλίβανος σταθερής θερμοκρασίας και το κουτί υβριδοποίησης.

#### Μεθοδολογία

1. Αποδιάταξη των ανιχνευτών με βράσιμο για 10 λεπτά και απευθείας τοποθέτηση σε πάγο.
2. Προσθήκη 15 μl ανιχνευτή ανά παρασκεύασμα στην περιοχή όπου είναι καθηλωμένα τα χρωμοσώματα και τοποθέτηση καλυπτρίδας (18 x 18 cm).
3. Τοποθέτηση των παρασκευασμάτων στο κουτί που ετοιμάστηκε για την υβριδοποίηση, το οποίο σφραγίζεται με κολλητική ταινία.
4. Στη συνέχεια πραγματοποιείται υβριδισμός σε κλίβανο στους 63°C για τουλάχιστον 16 ώρες.

### 3.5.5 Ανίχνευση σήματος

Για την ανίχνευση του σήματος χρησιμοποιούνται αντισώματα ειδικά για τη διγοξιγενίνη. Η χρήση τους σε συνδυασμό με το χρωμογόνο NTB/BCIP έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία μπλε ιζήματος, γεγονός που επιτρέπει τη μικροσκοπική παρατήρηση της θέσης υβριδισμού του ανιχνευτή στα πολυταινικά χρωμοσώματα.

#### Μεθοδολογία

1. Παρασκευή φρέσκου διαλύματος Buffer 2.
2. Ρύθμιση του υδατόλουτρου σε θερμοκρασία περίπου 10-13°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία υβριδισμού. Επειδή ο υβριδισμός έγινε στους 63°C, η ανίχνευση γίνεται στους 50°C.
3. Θέρμανση 2X SSC σε κουτί στην θερμοκρασία του υδατόλουτρου.
4. Εμβάπτιση των παρασκευάσματα σε κρύο 2X SSC, ώστε να φύγουν οι καλυπτρίδες.
5. Τοποθέτηση των παρασκευασμάτων στο κουτί με το 2X SSC στο υδατόλουτρο για 15 λεπτά.
6. Μεταφορά παρασκευασμάτων σε κρύο 2X SSC για 15 λεπτά.
7. Μεταφορά των παρασκευασμάτων σε buffer 1 για 5 λεπτά.
8. Μεταφορά των παρασκευασμάτων σε buffer 2 για 30 λεπτά.
9. Σύντομο ξέπλυμα σε buffer 1.
10. Φυγοκέντρηση των αντισωμάτων για 5 λεπτά σε 10.000 rpm.
11. Αραίωση αντισωμάτων 1:500 με buffer 2 και σύντομο vortex. Σε κάθε παρασκεύασμα ρίχνουμε 200 μl διαλύματος αντισωμάτων και τοποθετούμε καλυπτρίδα (22x22 cm).
12. Επώαση για 40-50 λεπτά στο κουτί υβριδισμού σε θερμοκρασία δωματίου.
13. Απομάκρυνση των καλυπτρίδων με ελαφρά χτυπήματα.
14. Μεταφορά σε buffer 1 δύο φορές διαδοχικά για 15 λεπτά.
15. Ξέπλυμα με buffer 3.
16. Αραίωση του διαλύματος χρώματος 1:50 με buffer 3. Σε κάθε παρασκεύασμα βάζουμε 1 ml αραιωμένου διαλύματος χρώματος.
17. Επώαση σε σκοτεινό χώρο για περίπου 40 λεπτά.
18. Ξέπλυμα με ddH<sub>2</sub>O και ανίχνευση του σήματος σε οπτικό μικροσκόπιο.

## 4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### 4.1 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΒΑΣΕΙ ΓΝΩΣΤΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ

Αρχικά, έγινε χαρτογράφηση των scaffolds χρησιμοποιώντας τους ήδη γνωστούς μοριακούς δείκτες. Οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ESTs, γονίδια και μικροδορυφόροι που έχουν χαρτογραφηθεί στον δάκο (Tsoumani *et al.*, 2011, Drosopoulou *et al.* 2014). Η αναζήτηση της ομολογίας των μοριακών δεικτών στο δάκο ήταν απαραίτητη ώστε να εντοπιστούν τα scaffolds στα οποία αντιστοιχούν οι δείκτες. Στον Πίνακα 9 φαίνονται τα scaffolds που προέκυψαν από την αλληλούχηση με μέγεθος μεγαλύτερο από 1 Mb και χαρτογραφήθηκαν στα χρωμοσώματα. Καταγράφεται το μέγεθος των scaffolds και η ακριβής θέση των δεικτών σε αυτά.

Πίνακας 9: Τα δεδομένα εντοπισμού των μοριακών δεικτών σε scaffolds μεγαλύτερα από 1 Mb. Καταγράφονται τα scaffolds με σειρά μεγέθους, οι δείκτες που χαρτογραφήθηκαν στο 5' και 3' άκρο του κάθε scaffold και το σημείο στο οποίο εντοπίζονται πάνω στην αλληλουχία του δάκου. Για τους δείκτες που συμβολίζονται με αστερίσκο (\*) δεν γνωρίζουμε την ακριβή αλληλουχία του δάκου που χρησιμοποιήθηκε. Στον πίνακα ενσωματώθηκαν και τα γονίδια που χαρτογραφήθηκαν στην παρούσα μελέτη, τα οποία συμβολίζονται με διπλό αστερίσκο (\*\*).

Scaffold	Μήκος (bp)	Χαρτογραφημένοι δείκτες					
		5'			3'		
		Δείκτης	Από	Έως	Δείκτης	Από	Έως
1	5.074.932	BoEST_89	2.025.537	2.027.485	-	-	-
4	3.596.895	Ca[2+]-channel protein alpha subunit T**	671.582	673.480	BoEST_72	1.518.507	1.520.040
					sxl*	-	-
3	3.510.943	scarlet*	-	-	Bo-D46 (Boms16)	2.656.231	2.656.710
13	3.395.484	Boms17	1.798.604	1.798.996	dsx	2.037.158	2.088.487
37	3.408.665	-	-	-	scab**	2.698.652	2.700.224

6	3.029.071	rho GTPase activating protein at 15B**	126.638	127.845	-	-	-
9	3.022.361	toll-7**	107.238	108.755	Boms24	1.803.941	1804.832
5	2.995.316	-	-	-	MEI-41**	2.354.619	2.356.611
12	2.870.138	-	-	-	Bo_D46 (Boms2)	1.618.907	1.619.265
8	2.865.058	-	-	-	BoEST_110	1.774.224	1.775.020
16	1.997.609	BoEST_106	961.593	962.312	BoEST_100	1.460.373	1.460.765
43	1.951.247	BoEST_90	710.051	710.461	-	-	-
14	1.901.416	BTB (POZ) domain containing 9 ortholog**	173.704	175.427	-	-	-
15	1.875.582	ubiquitin specific protease 47**	230.394	232.219	-	-	-
17	1.848.297	CG8858**	20.365	21.794	-	-	-
19	1.744.717	-	-	-	Boms20	1.473.730	1.474.238
22	1.372.515	BoEST_109	401.313	402.097	-	-	-
26	1.275.584	BoEST_38	366.057	366.845	Bo-D51 (Boms25)	873.339	873.717
25	1.271.394	BoEST_113	575.923	602.379	-	-	-
39	1.220.326	-	-	-	BoEST_43	1.208.186	1.209.834
29	1.196.925	-	-	-	Bo-D49 (Boms21)	1.031.639	1.032.109
32	1.174.952	roundabout 3**	190.740	192.205	-	-	-
42	1.020.402	-	-	-	BoEST_117	832.366	831.417

Οι υπόλοιποι μοριακοί δείκτες που χαρτογραφήθηκαν έδειξαν ομολογία με μικρότερου μήκους ή με περισσότερα από ένα scaffolds. Στον Πίνακα 10

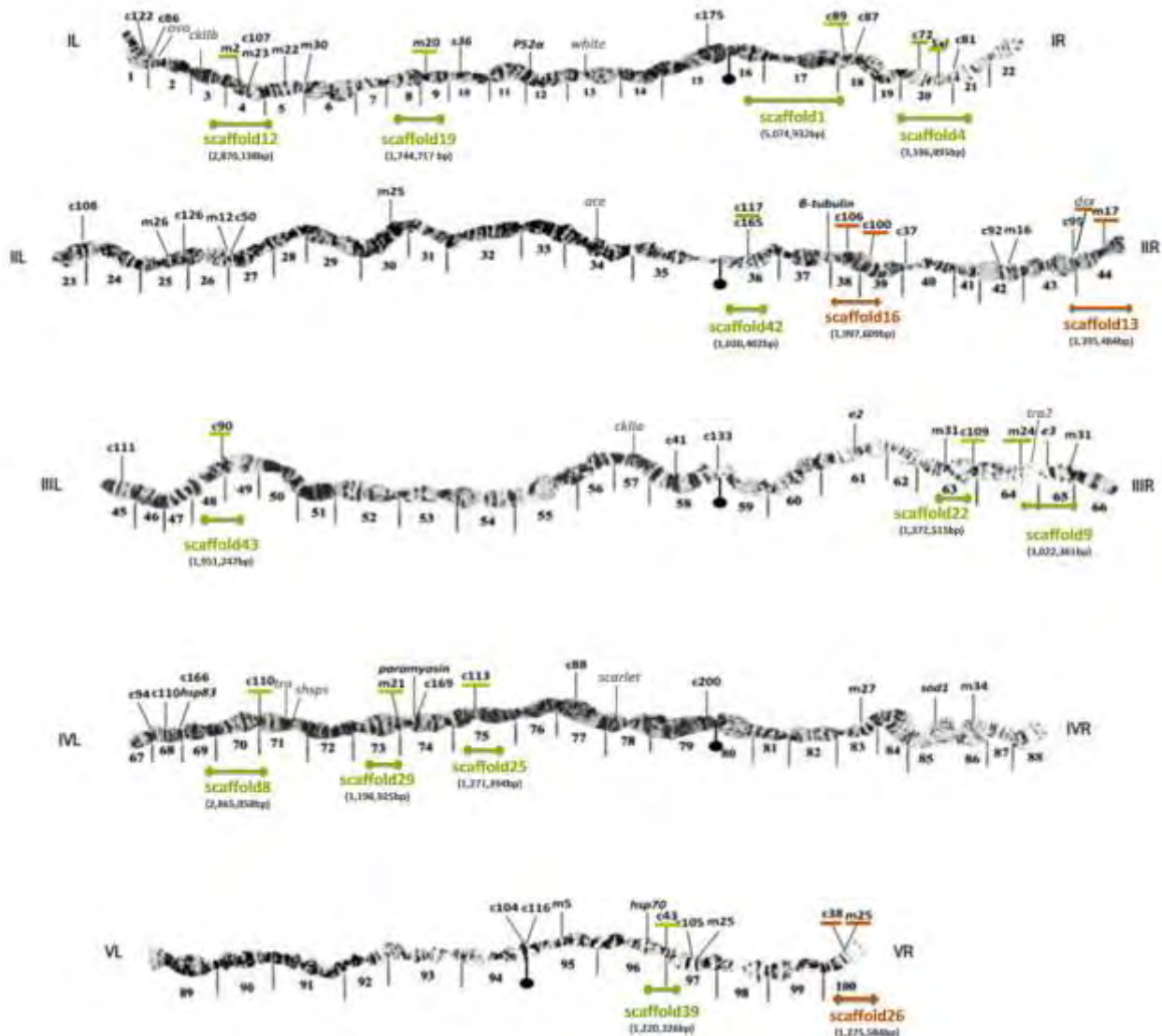
παραθέτονται ESTs και μικροδορυφόροι που εντοπίστηκαν σε μικρότερα scaffolds. Τα ετερόλογα γονίδια, για τα οποία δεν γνωρίζαμε την ακριβή αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής, δεν συμπεριλήφθηκαν στον πίνακα.

**Πίνακας 10: Χαρτογραφημένοι δείκτες (ESTs και μικροδορυφόροι) που εντοπίστηκαν σε scaffolds μικρότερα από 1 Mb. Καταγράφεται το όνομα και μέγεθος των αντίστοιχων scaffolds για τον κάθε δείκτη.**

<b>Χαρτογραφημένος δείκτης</b>	<b>Scaffold</b>	<b>Μέγεθος scaffold (bp)</b>
BoEST_37	58	799.012
BoEST_81	74	755.269
BoEST_86	165	303.525
BoEST_88	607	142.837
BoEST_92	46	963.426
BoEST_94	175	616.390
BoEST_95	559	110.424
BoEST_104	955	65.282
BoEST_105	641	87.741
BoEST_107	1250	73.020
BoEST_108	91	963.796
BoEST_116	750	94.957
BoEST_133	501	107.660
BoEST_165	797	127.261
BoEST_169	846	71.385
BoEST_175	1603	35.623
BoEST_200	1033	57.355

Boms12	359	140.073
Boms22	117	437.080
Boms23	52	845.260
Bo-D52	698	203.022
Boms31	266	304.339
Bo-D54	899	67.054

Οι μοριακοί δείκτες που έδειξαν ομολογία με scaffolds χαρτογραφήθηκαν βάσει των αντίστοιχων θέσεων υβριδισμού των δεικτών αυτών. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία κυτταρογενετικού χάρτη (Εικόνα 14). Για τα scaffolds στα οποία υπήρχαν δύο διαθέσιμοι δείκτες προσδιορίστηκε και ο προσανατολισμός.



Εικόνα 14: Στο χάρτη περιλαμβάνονται τα δεδομένα χαρτογράφησης των ESTs (c), μικροδορυφόρων (m) και γονιδίων (Tsoumani et al. 2011, Drosopoulou et al. 2014). Σύμφωνα με τις αντίστοιχες θέσεις υβριδισμού των δεικτών αυτών χαρτογραφήθηκαν 15 scaffolds από τα συνολικά 52 μεγέθους >1MB. Οι οριζόντιες γραμμές υποδεικνύουν τη σχετική θέση των scaffolds βάσει ενός δείκτη (πράσινες γραμμές) ή περισσότερων δεικτών (κόκκινες γραμμές) επιτυγχάνοντας παράλληλα τον καθορισμό του προσανατολισμού (Τροποποίηση από Tsoumani et al. 2011).

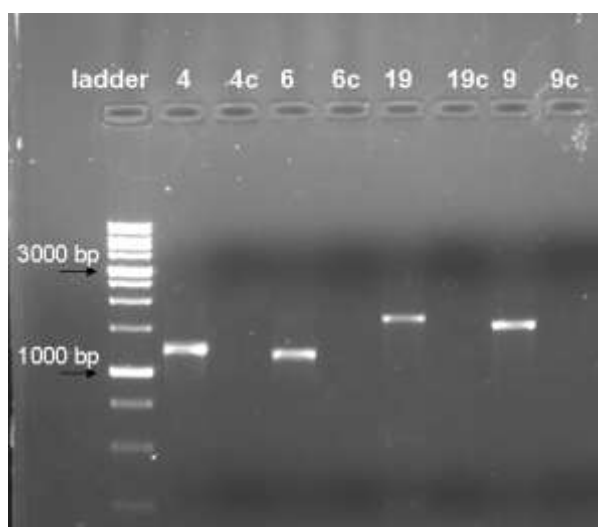
## 4.2 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΒΑΣΕΙ ΝΕΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΤΩΝ

Οι δείκτες που επιλέχθηκαν σε αυτή την μελέτη σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να παρέχουν πληροφορίες για τη θέση ορισμένων scaffolds, που προέκυψαν ύστερα από αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου. Συγκεκριμένα, επιλέχθηκαν scaffolds μεγαλύτερα από 1 Mb για τα οποία δεν υπήρχε διαθέσιμος μοριακός δείκτης, ή υπήρχε ένας δείκτης και εκκρεμούσε να βρεθεί ο προσανατολισμός τους.

### 4.2.1 Δημιουργία νέων ανιχνευτών

Αρχικά, οι ανιχνευτές που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν στον *in situ* υβριδισμό ενισχύθηκαν με PCR. Τα προϊόντα της PCR ελέγχθηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Όταν η PCR πραγματοποιείται με επιτυχία διακρίνεται μια μοναδική ζώνη, η οποία αντιπροσωπεύει το ενισχυμένο τμήμα (Εικόνα 15). Στον υβριδισμό απαιτείται τελική συγκέντρωση DNA 500-1.000 ng.

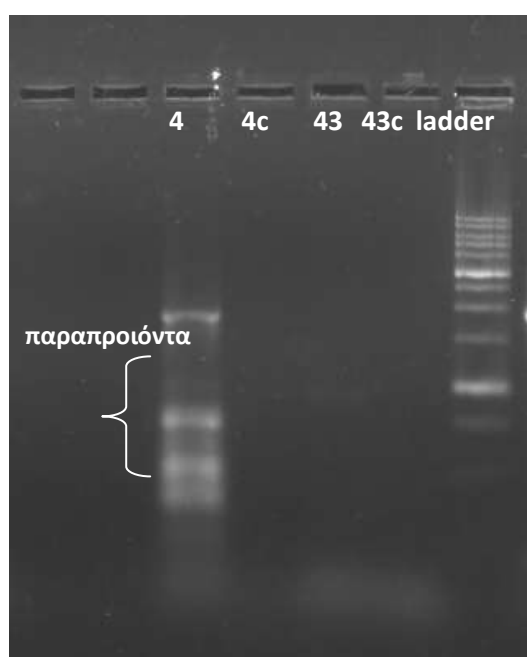


Εικόνα 15: Ηλεκτροφόρηση ενδεικτικών αντιδράσεων PCR. Στη πρώτη θέση βρίσκεται ο ladder της εταιρείας GeneOn (DNA Ladder 1000 bp/1 kb ladder BLUE ready-to-use). Στη συγκεκριμένη ηλεκτροφόρηση έχουν χρησιμοποιηθεί 2  $\mu$ l ladder και 3  $\mu$ l από το κάθε δείγμα. Ως ζώνη αναφοράς για τη ποσότητα του DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί η 1000 bp ζώνη του ladder, στην οποία υπάρχουν 42 ng DNA. Τα νούμερα αφορούν το όνομα του scaffold στο οποίο αντιστοιχεί ο κάθε ανιχνευτής, ενώ με γράμμα c συμβολίζονται οι μάρτυρες για το κάθε δείγμα.

Πολλές αντιδράσεις PCR παρουσίαζαν προβλήματα. Σε αυτές τις περιπτώσεις είτε ενισχύονταν επιπλέον μη επιθυμητά τμήματα, είτε διακρίνονταν ελάχιστα έως



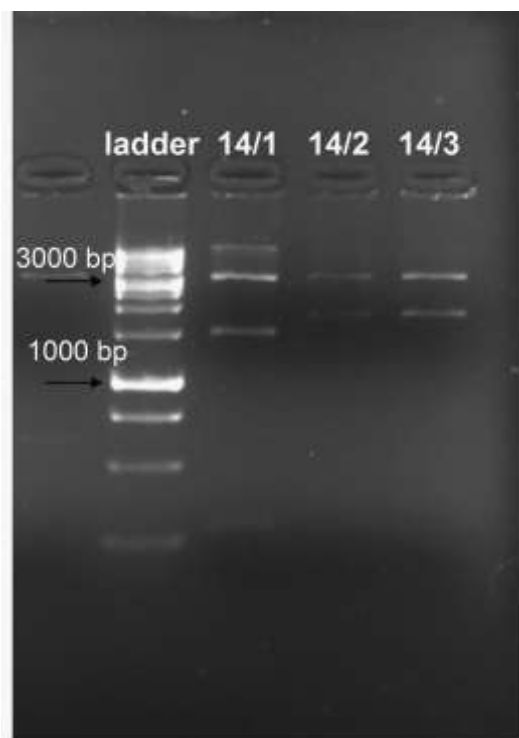
καθόλου η επιθυμητή ζώνη (Εικόνα 16). Στην περίπτωση που κατά την ηλεκτροφόρηση είναι ορατές περισσότερες από μια ζώνες, δηλαδή έχουν ενισχυθεί μη επιθυμητά τμήματα που αποτελούν παραπροϊόντα της αντίδρασης, η αντίδραση χρειάζεται περισσότερη εξειδίκευση. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με αύξηση της θερμοκρασίας του σταδίου του υβριδισμού των εκκινητών ή με μείωση της συγκέντρωσης του  $MgCl_2$ . Αντίθετα, όταν χρειάζεται να ενισχυθεί περισσότερο το επιθυμητό τμήμα μειώνεται η εξειδίκευση της αντίδρασης με μείωση της θερμοκρασίας του σταδίου του υβριδισμού των εκκινητών ή με αύξηση της συγκέντρωσης του  $MgCl_2$ . Ένα ακόμα πρόβλημα που μπορεί να παρουσιαστεί είναι η παρουσία ζωνών στο δείγμα του αρνητικού μάρτυρα. Σε αυτή την περίπτωση υπάρχει επιμόλυνση στα αντιδραστήρια, οπότε είναι απαραίτητη η επανάληψη της αντίδρασης με καινούρια αντιδραστήρια, έτσι ώστε να αποφευχθούν τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα.



**Εικόνα 16:** Ηλεκτροφόρηση στην οποία απεικονίζονται δυο μη επιθυμητά αποτελέσματα PCR. Στο δείγμα 4 παρουσιάζονται επιπλέον ζώνες που αποτελούν παραπροϊόντα της αντίδρασης, ενώ στο δείγμα 43 δεν έχει επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός. Με το γράμμα c συμβολίζονται οι αρνητικοί μάρτυρες.

Ορισμένοι ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν στον υβριδισμό ως καθαρισμένα προϊόντα PCR, ενώ σε άλλες περιπτώσεις τα προϊόντα της PCR κλωνοποιήθηκαν στον πλασμιδιακό φορέα pTZ5RT. Η ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων έγινε αρχικά βάσει της  $\alpha$ -συμπληρωματικότητας και περαιτέρω με πέψη του πλασμιδιακού DNA με κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Μέσω των πέψεων γίνεται η

ταυτοποίηση των επιθυμητών ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, παρατηρώντας το πρότυπο πέψης του DNA (Εικόνα 17). Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που ταυτοποιήθηκαν βάσει του προτύπου πέψης στη συνέχεια καθαρίστηκαν με εκχύλιση με φαινόλη – χλωροφόρμιο από τυχόν πρωτεΐνες και κυτταρικά υπολείμματα της διαδικασίας της απομόνωσης, και ακολούθως σημάνθηκαν με διγοξιγενίνη ώστε να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω ως ανιχνευτές.



Εικόνα 17: Οι πέψεις που πραγματοποιήθηκαν για τρεις αποικίες του ανιχνευτή για το scaffold 14, ύστερα από κλωνοποίησή του στον πλασμιδιακό φορέα pTZ5RT. Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το EcoRI και το PstI. Αυτά τα ένζυμα κόβουν στις δύο άκρες του φορέα, ενώ δεν υπάρχουν θέσεις περιορισμού για αυτά μέσα στο ένθεμα. Έτσι, οι ζώνες που αναμένεται να απεικονιστούν είναι μια στις ~3000 βάσεις που αντιστοιχεί στο φορέα, και μια στις ~1724 βάσεις που αντιστοιχεί στο ένθεμα. Στις αποικίες 14/2 και 14/3 έχουμε τις επιθυμητές ζώνες. Ο ladder που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας GeneOn (DNA Ladder 1000 bp/1 kb ladder BLUE ready-to-use). Για την ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν 2 µl ladder και τα 10 µl αντιδράσεων των πέψεων.

Στον Πίνακα 11 φαίνεται η μέθοδος που ακολουθήθηκε για τη δημιουργία του κάθε ανιχνευτή, καθώς και τα μεγέθη των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 11: Το μέγεθος και η μέθοδος δημιουργίας του κάθε ανιχνευτή.

Scaffold	Μέθοδος δημιουργίας	Μέγεθος ανιχνευτή (bp)
4	PCR ενίσχυση	1.899
5	κλωνοποίηση	1.993
6	PCR ενίσχυση	1.208
9	PCR ενίσχυση	1.518

14	κλωνοποίηση	1.724
15	κλωνοποίηση	1.826
17	PCR ενίσχυση	1.430
34	κλωνοποίηση	2.451
37	κλωνοποίηση	1.573

#### 4.2.2 *In situ* υβριδισμοί

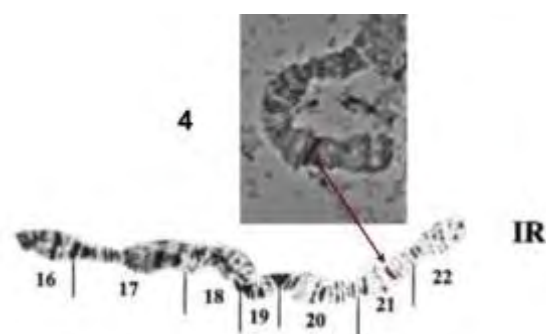
Οι σημασμένοι με διγοξιγενίνη ανιχνευτές που δημιουργήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν σε *in situ* υβριδισμούς, οι οποίοι έγιναν σε παρασκευάσματα πολυταινικών χρωμοσωμάτων σιελογόνων αδένων του εντόμου. Από την εν λόγω διαδικασία, τελικά, προσδιορίστηκε η ακριβής κυτταρογενετική θέση για 9 ανιχνευτές. Όλοι οι υβριδισμοί έγιναν στους 63°C. Για κάθε ανιχνευτή έγιναν τουλάχιστον 2 επαναλήψεις του υβριδισμού. Τα θετικά σήματα αναγνωρίστηκαν στο μικροσκόπιο και φωτογραφήθηκαν πολυταινικοί πυρήνες που φέρουν το σήμα. Θετικά σήματα θεωρήθηκαν εκείνα που απαντώνται στο μεγαλύτερο ποσοστό των πυρήνων του παρασκευάσματος. Η χρωμοσωματική θέση του σήματος αναγνωρίστηκε έπειτα από σύγκριση των πολυταινικών χρωμοσωμάτων με το διαθέσιμο φωτογραφικό χάρτη πολυταινικών χρωμοσωμάτων του *B. oleae* (Mavragani-Tsipidou *et al.* 1992, Zampetaki *et al.* 1995). Στον Πίνακα 12 φαίνεται το όνομα των ανιχνευτών με βάση το scaffold στο οποίο αντιστοιχούν, το ομόλογο γονίδιο στην *D. melanogaster*, η θέση στην οποία έγινε ο υβριδισμός στα παρασκευάσματα του δάκου, καθώς και η αντίστοιχη θέση υβριδισμού στη *D. melanogaster*.

**Πίνακας 12:** Δεδομένα ομολογίας και χαρτογράφησης των ανιχνευτών για τους οποίους πραγματοποιήθηκε με επιτυχία *in situ* υβριδισμός. Παρουσιάζονται τα scaffolds στα οποία αντιστοιχούν οι ανιχνευτές, τα γονίδια με τα οποία εμφανίζουν ομολογία στη *D. melanogaster*, καθώς και οι θέσεις υβριδισμών τους στο δάκο και στη *D. melanogaster*.

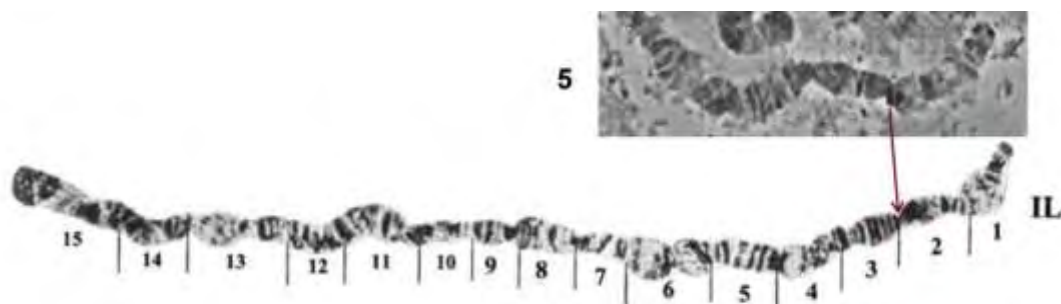
Scaffold	Ομόλογο γονίδιο στη <i>Drosophila melanogaster</i>	Θέση υβριδισμού στο <i>Bactrocera oleae</i>	Θέση υβριδισμού στη <i>Drosophila melanogaster</i>
4	Ca[2+]-channel protein alpha subunit T	IR (21)	X (5D5-5D6)
5	MEI-41	IL (2-3)	X (14C3)
6	rho GTPase activating protein	IVL (74)	X (15C4)

	at 15B		
9	toll-7	IIIR (65)	2R (56E4)
14	BTB (POZ) domain containing 9 ortholog	IIIL (31)	X (9E7-9E8)
15	ubiquitin specific protease 47	IIIR (61-62)	3L (64E5-64E6)
17	CG8858	IIIR (64)	2R (48E8)
32	roundabout 3	VR (98)	2L (21F3-F4)
37	scab	IIIL (56) IIIR (62)	2R( 51E1-E11)

Πιο αναλυτικά, ο ανιχνευτής για το scaffold 4 εντοπίστηκε στην περιοχή 21 του R βραχίονα του χρωμοσώματος I (Εικόνα 18). Στο βραχίονα L του ίδιου χρωμοσώματος εντοπίστηκε ο ανιχνευτής για το scaffold 5 ανάμεσα στις θέσεις 2 και 3 (Εικόνα 19).

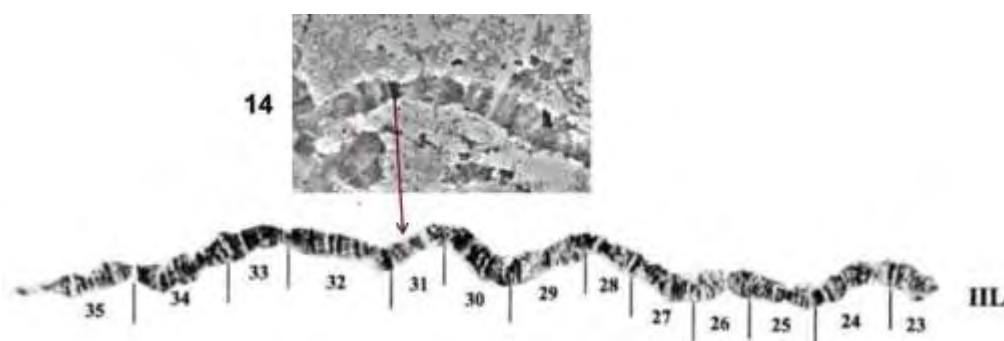


**Εικόνα 18:** Υβριδισμός του ανιχνευτή 4 στα πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Με την έντονη σκούρη ζώνη στη φωτογραφία διακρίνεται το σημείο του υβριδισμού. Η θέση αυτή αντιστοιχεί, όπως υποδεικνύεται με το βέλος, στη θέση 21 του χρωμοσωμικού βραχίονα IR. Οι κάθετες γραμμές στο βραχίονα οριοθετούν τη κάθε περιοχή.



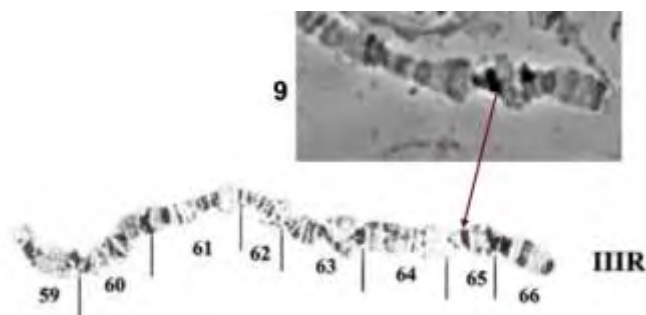
Εικόνα 19: Υβριδισμός του ανιχνευτή 5 στα πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Με την έντονη σκούρα ζώνη στη φωτογραφία διακρίνεται το σημείο του υβριδισμού. Η θέση αυτή αντιστοιχεί, όπως υποδεικνύεται με το βέλος, στη ζώνη που βρίσκεται ανάμεσα στις θέσεις 2 και 3 του χρωμοσωμικού βραχίονα II. Οι κάθετες γραμμές στο βραχίονα οριοθετούν τη κάθε περιοχή.

Στο χρωμόσωμα II στο βραχίονα L έγινε υβριδισμός για τον ανιχνευτή του scaffold 14 στη θέση 31 (Εικόνα 20).

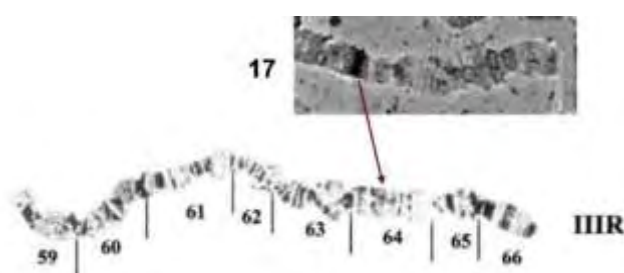


Εικόνα 20: Υβριδισμός του ανιχνευτή 14 στα πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Με την έντονη σκούρα ζώνη στη φωτογραφία διακρίνεται το σημείο του υβριδισμού. Η θέση αυτή αντιστοιχεί, όπως υποδεικνύεται με το βέλος, στη θέση 31 του χρωμοσωμικού βραχίονα III. Οι κάθετες γραμμές στο βραχίονα οριοθετούν τη κάθε περιοχή.

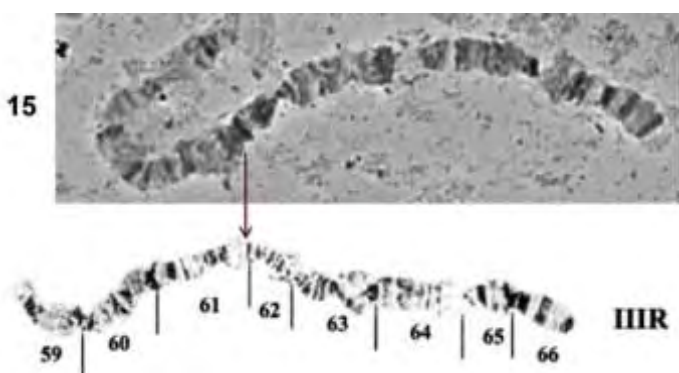
Για το scaffold 9 ο αντίστοιχος ανιχνευτής υβριδίστηκε στη θέση 65 του χρωμοσώματος III<sub>R</sub> (Εικόνα 21). Στον ίδιο βραχίονα στη θέση 64 υβριδίστηκε ο ανιχνευτής για το scaffold 17 (Εικόνα 22), ενώ στη θέση 61-62 έγινε υβριδισμός για τον ανιχνευτή του scaffold 15 (Εικόνα 23). Για τον ανιχνευτή του scaffold 37 εντοπίστηκαν δύο θέσεις υβριδισμού. Η μια ανιχνεύτηκε στη θέση 62 του III<sub>R</sub> χρωμοσώματος, ενώ η άλλη ανάμεσα στις θέσεις 56-57 του III<sub>L</sub> χρωμοσώματος (Εικόνα 24).



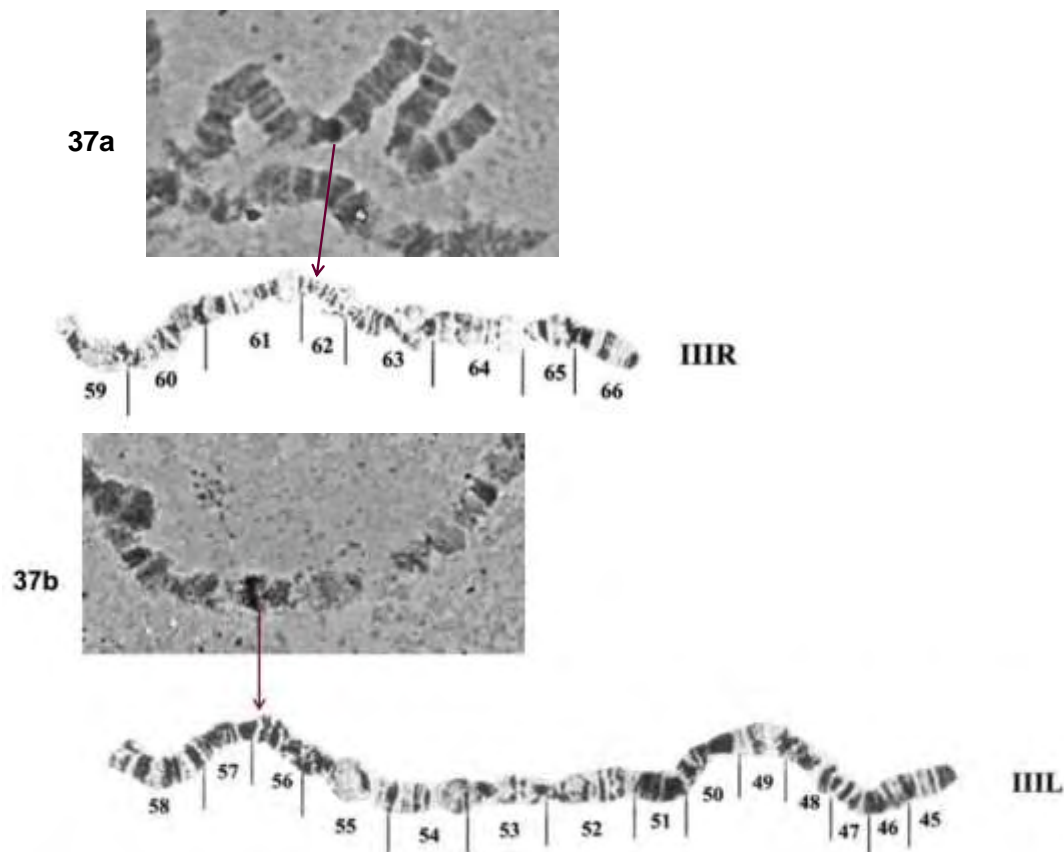
Εικόνα 21: Υβριδισμός του ανιχνευτή 9 στα πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Με την έντονη σκούρη ζώνη στη φωτογραφία διακρίνεται το σημείο του υβριδισμού. Η θέση αυτή αντιστοιχεί, όπως υποδεικνύεται με το βέλος, στη θέση 65 του χρωμοσωμικού βραχίονα IIIR. Οι κάθετες γραμμές στο βραχίονα οριοθετούν τη κάθε περιοχή.



Εικόνα 22: Υβριδισμός του ανιχνευτή 17 στα πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Με την έντονη σκούρη ζώνη στη φωτογραφία διακρίνεται το σημείο του υβριδισμού. Η θέση αυτή αντιστοιχεί, όπως υποδεικνύεται με το βέλος, στη θέση 64 του χρωμοσωμικού βραχίονα IIIR. Οι κάθετες γραμμές στο βραχίονα οριοθετούν τη κάθε περιοχή.

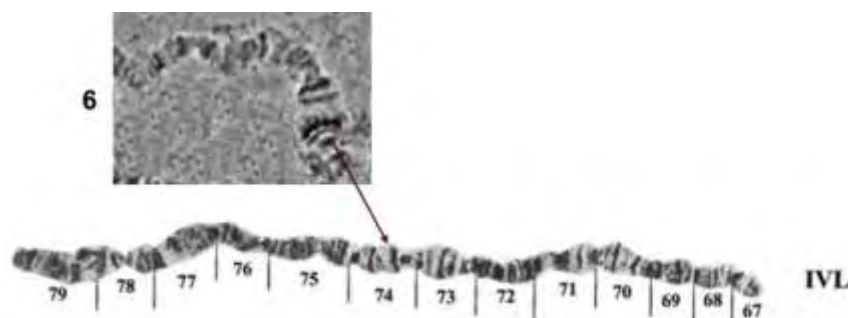


Εικόνα 23: Υβριδισμός του ανιχνευτή 15 στα πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Με την έντονη σκούρη ζώνη στη φωτογραφία διακρίνεται το σημείο του υβριδισμού για τον ανιχνευτή 15. Η θέση αυτή αντιστοιχεί, όπως υποδεικνύεται με το βέλος, στη ζώνη που βρίσκεται ανάμεσα στις θέσεις 61 και 62 του χρωμοσωμικού βραχίονα IIIR. Οι κάθετες γραμμές στο βραχίονα οριοθετούν τη κάθε περιοχή.



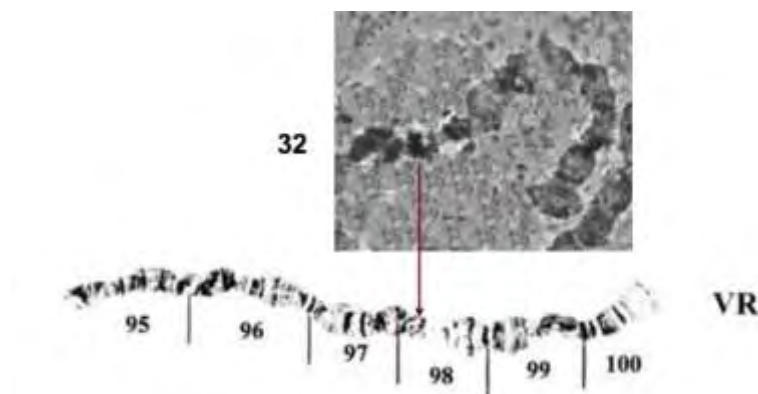
Εικόνα 24: Υβριδισμός του ανιχνευτή 37 στα πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Με τις έντονες σκούρες ζώνες στις φωτογραφίες διακρίνονται τα σημεία υβριδισμού. Βρέθηκαν δύο θέσεις υβριδισμού για τον ανιχνευτή αυτόν. Η πρώτη θέση (37a) αντιστοιχεί, όπως υποδεικνύεται με το βέλος, στη θέση 62 του χρωμοσωμικού βραχίονα IIIIR, ενώ η δεύτερη στο σημείο ανάμεσα στις θέσεις 56-57 του χρωμοσωμικού βραχίονα IIIL. Οι κάθετες γραμμές στο βραχίονα οριοθετούν τη κάθε περιοχή.

Το scaffold 6 τοποθετήθηκε στο βραχίονα IVL και συγκεκριμένα στη θέση 74 (Εικόνα 25).



Εικόνα 25: Υβριδισμός του ανιχνευτή 6 στα πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Με την έντονη σκούρη ζώνη στη φωτογραφία διακρίνεται το σημείο του υβριδισμού. Η θέση αυτή αντιστοιχεί, όπως υποδεικνύεται με το βέλος, στη θέση 74 του χρωμοσωμικού βραχίονα IVL. Οι κάθετες γραμμές στο βραχίονα οριοθετούν τη κάθε περιοχή.

Τέλος, ο ανιχνευτής για το scaffold 32 εντοπίστηκε στη θέση 98 του χρωμοσωμικού βραχίονα VR (Εικόνα 26).



Εικόνα 26: Υβριδισμός του ανιχνευτή 32 στα πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Με την έντονη σκούρη ζώνη στη φωτογραφία διακρίνεται το σημείο του υβριδισμού. Η θέση αυτή αντιστοιχεί, όπως υποδεικνύεται με το βέλος, στη θέση 98 του χρωμοσωμικού βραχίονα VR. Οι κάθετες γραμμές στο βραχίονα οριοθετούν τη κάθε περιοχή.

#### 4.2.3 Κυτταρογενετικός χάρτης των scaffolds αλληλούχησης

Οι θέσεις των νέων ανιχνευτών προστέθηκαν στον κυτταρογενετικό χάρτη των scaffolds. Συνολικά τα scaffolds που τοποθετήθηκαν στη σωστή θέση με βάση τους ήδη χαρτογραφημένους μοριακούς δείκτες και τους νέους μοριακούς δείκτες που δημιουργήθηκαν απεικονίζονται στην Εικόνα 27.





**Πίνακας 13: Δεδομένα απόστασης των μοριακών δεικτών που χαρτογραφήθηκαν.**

<b>Scaffold</b>	<b>Δείκτης 5'</b>	<b>Δείκτης 3'</b>	<b>Απόσταση (bp)</b>
4	Ca[2+]-channel protein alpha subunit T	BoEST_72	848.458
9	toll-7	Boms24	1.697.594
13	Boms17	dsx	289.223
16	BoEST_106	BoEST_100	499.172
26	BoEST_38	Bo-D51 (Boms25)	507.660

## 5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μελέτη του δάκου της ελιάς έχει έντονο οικονομικό ενδιαφέρον, καθώς οι απώλειες που προκαλεί στις ελαιοκαλλιέργειες επηρεάζουν άμεσα τη ζωή του ανθρώπου. Τα τελευταία χρόνια γίνονται προσπάθειες για την ανάπτυξη νέων μεθόδων ελέγχου του πληθυσμού του. Η ραγδαία ανάπτυξη της επιστήμης σε μοριακό επίπεδο προσέφερε νέες προοπτικές στην αντιμετώπιση του δάκου. Ένα σημαντικό εργαλείο της νέας αυτής εποχής είναι η αλληλούχηση γονιδιωμάτων. Πρόσφατα αλληλουχήθηκε το γονιδίωμά του δάκου με WGS, και η αλληλουχία συναρμολογήθηκε σε scaffolds με τη βοήθεια υπολογιστικών προγραμμάτων. Η δυνατότητα χαρτογράφησης scaffolds αλληλούχησης προσφέρει πληροφορίες για την πραγματική θέση τους στα χρωμοσώματα. Φυσική χαρτογράφηση των scaffolds αυτών πραγματοποιήθηκε στη παρούσα εργασία με τη βοήθεια μοριακών δεικτών. Επιπλέον, οι δείκτες χρησιμοποιήθηκαν για μελέτη συνταινιακότητας του δάκου με τη *D. melanogaster*.

### 5.1 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ SCAFFOLDS ΑΛΛΗΛΟΥΧΗΣΗΣ

Η αλληλούχηση του γονιδιώματος παρέχει πληροφορίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον έλεγχο του πληθυσμού του δάκου. Η γνώση της γονιδιωματικής αλληλουχίας θα επιτρέπει, μέσω ανάλυσης γονιδιωματικής οντολογίας, τη γρήγορη ταυτοποίηση γονιδίων και ρυθμιστικών περιοχών που εμπλέκονται σε διάφορες βιολογικές διεργασίες και μοριακές λειτουργίες και θα αποτελούσαν δυνητικά στόχους για τον έλεγχο του εντόμου. Για παράδειγμα, θα μπορούσαν να αποκαλυφθούν νέα γονίδια και κατ' επέκταση μηχανισμοί που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα. Επίσης, θα καταστεί ευκολότερο να εντοπιστούν νέοι μοριακοί στόχοι, όπως γονίδια φυλετικού διαχωρισμού απαραίτητα για την ανάπτυξη νέων μεθόδων αντιμετώπισης, καθώς και μοριακοί υποδοχείς οσφρητικών κυττάρων, που χρησιμοποιούνται για να προσελκύουν τα έντομα σε παγίδες για τον έλεγχο του πληθυσμού τους (Scott *et al.*, 2009).

Οι τρέχουσες τεχνολογίες που εφαρμόζονται για την αλληλούχηση ολόκληρων γονιδιωμάτων παρουσιάζουν συγκεκριμένες δυσκολίες στη συναρμολόγηση, που σχετίζονται κυρίως με την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων περιοχών και τη δυσκολία στην κλωνοποίηση ορισμένων τμημάτων. Λόγω των δυσκολιών αυτών, υπάρχουν κενά στη συναρμολόγηση των κομματιών που προκύπτουν, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται μεγάλα κομμάτια (scaffolds), τα

οποία όμως δεν συνδέονται μεταξύ τους. Συνεπώς, η αξιοποίηση οποιασδήποτε πληροφορίας που θα μπορούσε να συνεισφέρει στη βελτίωση της συναρμολόγησης παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Προς την κατεύθυνση αυτή σημαντικό εργαλείο θα μπορούσε να αποτελέσει η φυσική χαρτογράφηση scaffolds αλληλούχησης, καθώς διευκολύνει τη συναρμολόγηση της αλληλουχίας του γονιδιώματος και οδηγεί στον προσδιορισμό των κυτταρογενετικών θέσεων όλων των γονιδίων που αντιστοιχούν στα scaffolds αυτά.

Μέχρι στιγμής έχουν πραγματοποιηθεί προγράμματα αλληλούχησης για διάφορα έντομα. Από τα βασικότερα και καλύτερα χαρακτηρισμένα έντομα για τα οποία έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχηση είναι η *D. melanogaster* (Adams *et al.*, 2000), το κουνούπι *Anopheles gambiae* (Holt *et al.*, 2002) και η μέλισσα *Apis mellifera* (The Honeybee Genome Sequencing Consortium, 2006). Για την αλληλούχηση των γονιδιωμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκαν οι ήδη υπάρχοντες γενετικοί και φυσικοί χάρτες, οι οποίοι δημιουργήθηκαν από βιβλιοθήκες BACs. Έτσι, τοποθετήθηκαν στις αντίστοιχες χρωμοσωμικές περιοχές τα scaffolds αλληλούχησης που δημιουργήθηκαν με WGS.

Όσον αφορά το γονιδίωμα του δάκου, δεν έχουν κατασκευαστεί μέχρι στιγμής φυσικοί χάρτες. Η φυσική χαρτογράφηση των scaffolds του είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί αφού ολοκληρωθεί η αλληλούχηση, καθώς διευκολύνεται από την παρουσία πολυταινικών χρωμοσωμάτων. Στα πολυταινικά χρωμοσώματα είναι εφικτό να πραγματοποιηθεί χαρτογράφηση, διότι λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους και της οργάνωσής τους, μπορεί να εντοπιστεί εύκολα η θέση μικρού μεγέθους ανιχνευτών (1000-3000 bp). Το γεγονός αυτό επιτρέπει το σχεδιασμό και τη δημιουργία ανιχνευτών για *in situ* υβριδισμό στα πολυταινικά χρωμοσώματα.

Στην παρούσα εργασία έγινε χαρτογράφηση των scaffolds αλληλούχησης με τη βοήθεια μοριακών δεικτών. Τα δεδομένα από την αλληλούχηση χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία ανιχνευτών ώστε να χαρτογραφηθούν τα scaffolds στα χρωμοσώματα. Από την αλληλούχηση που έχει πραγματοποιηθεί για το δάκο προέκυψαν 36.198 scaffolds, από τα οποία 52 είχαν σημαντικό μέγεθος, πάνω από 1 Mb. Με τη χαρτογράφηση που πραγματοποιήθηκε προσδιορίζεται ουσιαστικά η θέση για όλα τα γονίδια τα οποία έχουν εντοπιστεί στα scaffolds αυτά.

Αρχικά, τα scaffolds τοποθετήθηκαν με βάση τους ήδη χαρτογραφημένους μοριακούς δείκτες (Tsoumani *et al.*, 2011, Drosopoulou *et al.*, 2014). Ομολογία με scaffolds μεγαλύτερα από 1 Mb έδειξαν 21 δείκτες. Τα scaffolds αυτά τοποθετήθηκαν

βάσει των θέσεων υβριδισμού των χαρτογραφημένων δεικτών. Ορισμένοι εμφάνιζαν αντιφατικά αποτελέσματα, για αυτό και δεν συμπεριλήφθηκαν στο χάρτη. Συγκεκριμένα, το ετερόλογο γονίδιο scarlet και ο μικροδορυφόρος Bo-D46 (Boms16) εντοπίζονται στο scaffold 3 αλλά βρίσκονται σε διαφορετικές θέσεις στα χρωμοσώματα, τις IIR (42) και αντίστοιχα IV (78), συνεπώς απαιτείται περαιτέρω διερεύνηση για την τοποθέτηση του scaffold 3 στον κυταρογενετικό χάρτη. Το ετερόλογο γονίδιο sxl δεν λήφθηκε υπόψιν για τον προσδιορισμό του προσανατολισμού του scaffold, επειδή δεν γνωρίζαμε την ακριβή αλληλουχία του ανιχνευτή που χρησιμοποιήθηκε. Επιπλέον, ο δείκτης Bo-D51 (Boms25) που έδειξε ομολογία με το scaffold 26 έχει υβριδιστεί σε τρεις θέσεις, τις IIL (30), VR (97) και VR (100). Μικρότερη ομολογία του δείκτη αυτού βρέθηκε και σε αλληλουχίες άλλων scaffold, γεγονός που πιθανώς εξηγεί την παρατήρηση πολλαπλών σημάτων. Επειδή για το ίδιο scaffold είναι γνωστός επίσης ο δείκτης Bo\_EST38 που βρίσκεται στη θέση VR (100), το scaffold 26 τοποθετήθηκε σε αυτή την περιοχή.

Σε scaffolds στα οποία αναγνωρίστηκαν δύο δείκτες είναι εφικτός ο προσδιορισμός του προσανατολισμού. Όπου υπήρχε διαθέσιμος ένας μοριακός δείκτης σχεδιάστηκαν νέοι ανιχνευτές, οι οποίοι δημιουργήθηκαν με PCR ή κλωνοποίηση, έτσι ώστε να εντοπίζονται αντιδιαμετρικά στην αλληλουχία του scaffold. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται εντοπισμός των κυταρογενετικών τους ορίων. Συνολικά, έγινε εφικτός ο προσδιορισμός του προσανατολισμού για 5 scaffolds, τα 4, 9, 13, 16 και 26. Παρατηρήθηκε ότι τα 4, 9 και 13 εμφανίζουν ανάστροφο προσανατολισμό ( $3' \rightarrow 5'$ ) στα χρωμοσώματα, ενώ τα 16 και 26 έχουν  $5' \rightarrow 3'$  προσανατολισμό. Δεδομένου ότι είναι γνωστές οι θέσεις των ανιχνευτών τόσο στην αλληλουχία των scaffolds, όσο και στα πολυταινικά χρωμοσώματα, οι πληροφορίες του εντοπισμού τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιπλέον για την εκτίμηση της απόστασης μεταξύ των ζωνώσεων των πολυταινικών χρωμοσωμάτων. Από τον υπολογισμό που πραγματοποιήθηκε παρατηρείται ότι οι αποστάσεις ανάμεσα στις ζώνες και τις μεσοζώνες των χρωμοσωμάτων δεν φαίνεται να παρουσιάζουν ένα σταθερό πρότυπο. Το γεγονός αυτό υποστηρίζεται και από άλλες μελέτες, σύμφωνα με τις οποίες εκτιμάται ότι το μέγεθος των ζωνών στα πολυταινικά χρωμοσώματα ποικίλει από 5 ως 195 kb (Zhimulev, 1996). Στη *D. melanogaster* υπολογίζεται ότι ο μέσος όρος του μεγέθους των ζωνών είναι 31 kb (Celniker *et al.*, 2002). Η διαφορά που παρατηρείται μπορεί να ερμηνευτεί λόγω του διαφορετικού βαθμού πολυταινίας των τμημάτων DNA (Zhimulev *et al.*, 2004).

Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν scaffolds για τα οποία δεν υπήρχε χαρτογραφημένος μοριακός δείκτης, ώστε να εντοπιστεί η θέση τους πάνω στο γονιδίωμα. Με τη μέθοδο αυτή, ανιχνεύτηκαν 7 αλληλουχίες DNA που αντιστοιχούν σε γονιδιακούς τόπους. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των υβριδισμών που προέκυψαν, όλοι οι ανιχνευτές, εκτός από τον ανιχνευτή του scaffold 37, είχαν μοναδικό σήμα. Ο ανιχνευτής αυτός υβριδίστηκε στις θέσεις III R (62) και III (56-57). Το σήμα στο III L είναι πιο ισχυρό από το σήμα στο III R. Επίσης, λαμβάνοντας υπόψιν ότι η αντίστοιχη θέση του ομόλογου γονιδίου βρίσκεται στο χρωμόσωμα 2R στη δροσόφιλα είναι πιο πιθανό το σήμα στο III L να αφορά το επιθυμητό scaffold, καθώς ο βραχίονας αυτός αντιστοιχεί στο 2R χρωμόσωμα της δροσόφιλας, χωρίς αυτό να είναι απόλυτο. Το δεύτερο σήμα είναι πιθανό να αποτελεί μη ειδικό υβριδισμό σε αλληλουχία που παρουσιάζει ομολογία με το επιλεγμένο γονίδιο. Μια άλλη εξήγηση για το φαινόμενο αυτό είναι ότι πραγματοποιήθηκε διπλασιασμός και μετατόπιση του αντίστοιχου γονιδίου. Συνεπώς, για να διευκρινιστεί η θέση του scaffold37 με βεβαιότητα χρειάζεται να διερευνηθεί περισσότερο.

Συνολικά, έγινε χαρτογράφηση για 21 scaffolds μεγέθους μεγαλύτερου από 1 Mb, τοποθετώντας με τον τρόπο αυτό στην κατάλληλη θέση στα χρωμοσώματα περίπου 46,7 Mb, που αντιστοιχούν σε ποσοστό 9,9% της αλληλουχίας του γονιδιώματος του δάκου. Το ποσοστό αυτό αυξάνεται στο 11,46%, αν συμπεριληφθούν και τα αποτελέσματα από τη χαρτογράφηση δεικτών σε μικρότερα scaffolds. Σε παρόμοια προσπάθεια για χαρτογράφηση της αλληλουχίας του κουνουπιού του κίτρινου πυρετού *Aedes aegypti* χαρτογραφήθηκαν συνολικά 624 Mb από τις 1.376 Mb, δημιουργώντας φυσικό χάρτη για το 45% της αλληλουχίας. Στην προκειμένη περίπτωση χρησιμοποιήθηκαν μοριακοί δείκτες που ταυτοποιήθηκαν από προηγούμενες μελέτες (Brown & Knudson, 1997) και χαρτογραφήθηκαν σε μιτωτικά χρωμοσώματα με FISH 400 BAC κλώνοι από την βιβλιοθήκη κλώνων NDL (Jimenez *et al.*, 2004). Επιλέχθηκαν μιτωτικά χρωμοσώματα λόγω χαμηλού βαθμού πολυταινίας στο συγκεκριμένο είδος. Η χαρτογράφηση διευκολύνθηκε σημαντικά από την παρουσία βιβλιοθηκών BACs. Τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση της κατανομής των γονιδίων, των επαναλήψεων και των μεταθετών στοιχείων, ώστε να καθοριστούν οι χρωμοσωμικές ομολογίες και ανακατατάξεις ανάμεσα στα συγγενικά έντομα *Ae. aegypti* και *An. gambiae* (Timoshevskiy *et al.*, 2014).

Το πρόγραμμα της αλληλούχησης βρίσκεται σε εξέλιξη, καθώς αναμένεται η δημιουργία μεγαλύτερου μήκους scaffolds με νέα μέθοδο αλληλούχησης. Το γεγονός αυτό θα βελτιώσει και τη φυσική χαρτογράφηση, δεδομένου ότι οι δείκτες που χαρτογραφήθηκαν θα αντιστοιχούν σε μεγαλύτερα scaffolds. Έτσι, θα προσδιοριστεί η θέση για τα αντίστοιχα γονίδια που θα εντοπίζονται σε αυτά. Όσον αφορά τα scaffolds για τα οποία είναι διαθέσιμος μόνο ένας μοριακός δείκτης είναι πιθανό να προσδιοριστεί ο προσανατολισμός τους, καθώς στη βελτιωμένη αλληλούχηση θα γίνει συναρμολόγηση των ήδη γνωστών κομματιών σε μεγαλύτερα. Κατά τη συναρμολόγηση αυτή θα καλυφθούν τα κενά σε σημεία με γνωστούς μοριακούς δείκτες, με αποτέλεσμα να υπάρχουν περισσότεροι δείκτες για τα μεγαλύτερα scaffolds και να είναι εφικτός ο προσδιορισμός του προσανατολισμού.

## 5.2 ΕΞΕΛΙΚΤΙΚΗ ΣΥΓΚΡΙΣΗ

Οι ανιχνευτές που χαρτογραφήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι μοριακοί δείκτες για 6 πολυταινικούς βραχίονες. Με αυτές τις πληροφορίες εμπλουτίζεται ο πολυταινικός χάρτης του εντόμου. Οι μοριακοί δείκτες συμβάλουν στη μελέτη οργάνωσης των χρωμοσωμάτων και μπορούν να βοηθήσουν σε εξελικτικές μελέτες καθορίζοντας τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα σε διάφορα είδη (Mauragani-Tsipidou, 2002).

Φυλογενετική ανάλυση έχει πραγματοποιηθεί για διάφορα είδη της οικογένειας Δίπτερα, ώστε να προσδιοριστούν οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών. Χαρακτηριστικά παραδείγματα όπου η δημιουργία και η σύγκριση γενετικών και φυσικών χαρτών έχει εφαρμοστεί για την εξελικτική σύγκριση των ειδών είναι η φυλογενετική ανάλυση των ειδών του γένους *Drosophila* (O'Grandy *et al.*, 2001) και η εξελικτική σύγκριση ειδών κουνουπιών (για ανασκόπηση Severson *et al.*, 2001). Η γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος των εντόμων συμβάλει και σε εξελικτικές μελέτες που σχετίζονται με τον άνθρωπο. Η ολοκληρωμένη αλληλούχηση της *D. melanogaster* και του *An. gambiae* έχει βοηθήσει στην εξαγωγή συμπερασμάτων για την εξέλιξη, τη δομή και τη λειτουργία ανθρώπινων γονιδίων (Kortschak *et al.*, 2003).

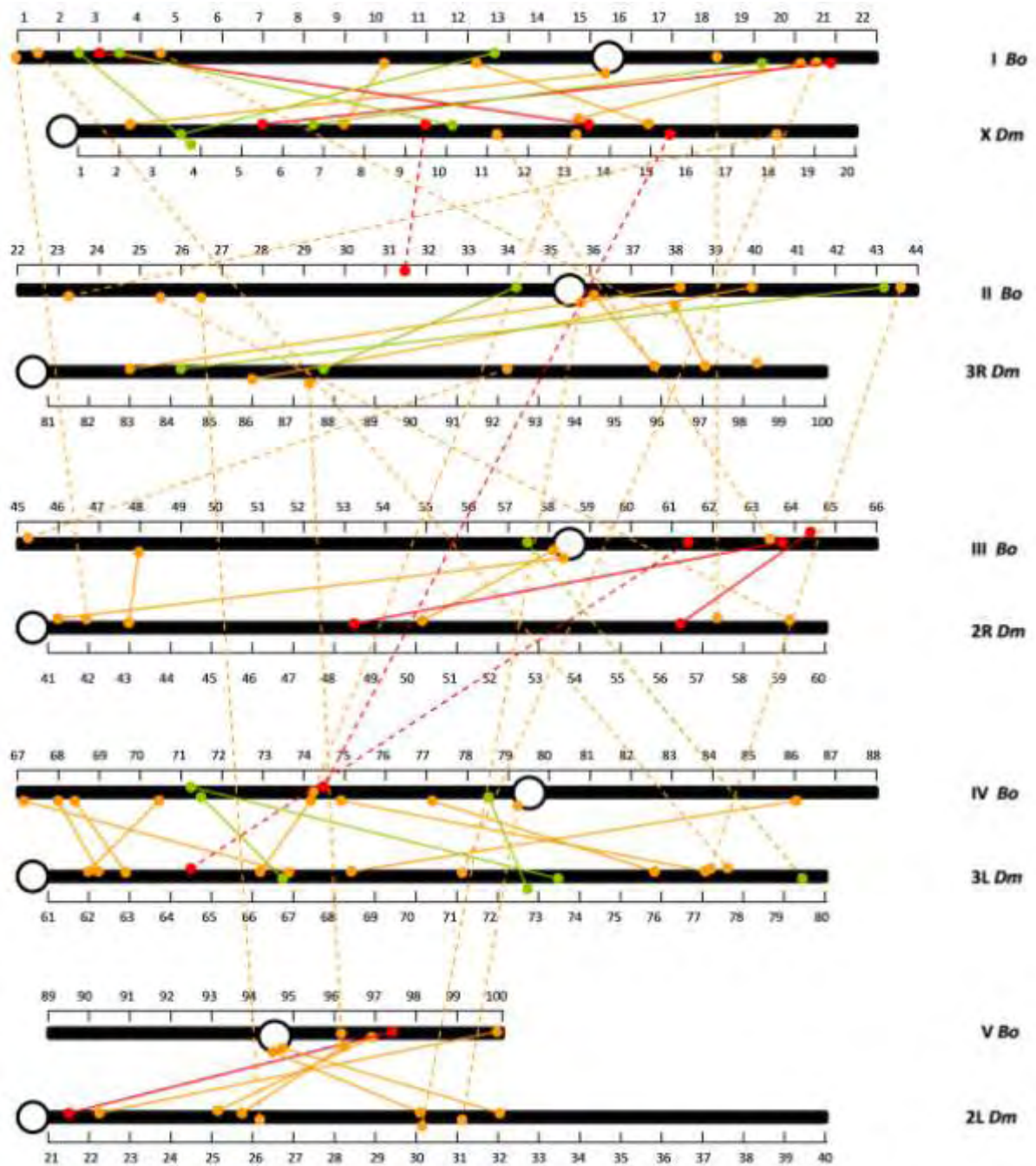
Σημαντικός παράγοντας για τη σύγκριση της πολυπλοκότητας γονιδιωμάτων είναι η εκτίμηση του μεγέθους τους. Τα γονιδιώματα της *D. melanogaster* και του *An. gambiae* διαφέρουν σε μέγεθος καθώς υπολογίζονται 278 Mb και 122 Mb αντίστοιχα. Στη δροσόφιλα έχουν χαθεί κατά την εξέλιξη περισσότερα γονίδια, παρόλα αυτά οι δύο οργανισμοί δείχνουν αρκετές ομοιότητες. Και στις δύο περιπτώσεις έχουν γίνει

πολλαπλές προσθήκες και ελλείψεις γονιδίων (Zdobnov *et al.*, 2002). Παρατηρείται ότι το γονιδίωμα του δάκου είναι ακόμα μεγαλύτερο, αφού υπολογίστηκε στις 470 Mb. Παρόμοιο μέγεθος έχει και το συγγενικό είδος της ίδιας οικογένειας, *C. capitata* (480 Mb). Γενικά, θεωρείται ότι το μεγαλύτερο μέγεθος ενός γονιδιώματος δηλώνει μεγαλύτερο ποσοστό ετεροχρωματινικών περιοχών, ενώ η διαφορά μεγέθους δεν σχετίζεται με τον συνολικό αριθμό γονιδίων (Petrov 2001).

Όσον αφορά την εξελικτική σύγκριση του δάκου, δύο έντομα με τα οποία η σύγκριση έχει εξελικτικό ενδιαφέρον είναι η *C. capitata* και *D. melanogaster*. Η *C. capitata* είναι ένα σημαντικό παράσιτο που ανήκει στην οικογένεια Tephritidae και αποτελεί οργανισμό-μοντέλο για μελέτες των εντόμων αυτής της οικογένειας (Stratikopoulos *et al.*, 2008). Η *D. melanogaster* είναι ένας από τους σημαντικότερους οργανισμούς-μοντέλο με εκτενή διαθέσιμα δεδομένα για το γονιδίωμά του.

Για τη *D. melanogaster* υπάρχουν επαρκή διαθέσιμα δεδομένα χαρτογράφησης στη βάση δεδομένων Flybase (<http://flybase.org/>). Για την *C. capitata* έχουν γίνει κυτταρογενετικές μελέτες αλλά δεν είναι διαθέσιμες οι πληροφορίες για τα αντίστοιχα γονίδια που ερευνήθηκαν στην παρούσα εργασία. Στον ήδη υπάρχοντα χάρτη συντανιακότητας του δάκου με τη δροσόφιλα (Tsoumani *et al.*, 2011) μπορούν να προστεθούν επιπλέον τα κυτταρογενετικά δεδομένα από τα γονίδια που εντοπίστηκαν σε μεταγενέστερες μελέτες (Drosopoulou *et al.*, 2014), καθώς και τα γονίδια που χαρτογραφήθηκαν σε αυτήν τη μελέτη (Εικόνα 28).





Εικόνα 28: Σχηματική συγκριτική απεικόνιση των ομόλογων πολυταινικών χρωμοσωμάτων του *B. oleae* και της *D. melanogaster*. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις χρωμοσωμικές περιοχές των δύο οργανισμών. Τα κεντρομερή δηλώνονται με τους κύκλους. Οι γραμμές συνδέουν τις αντίστοιχες θέσεις χαρτογράφησης αποδίδοντας ταυτόχρονα το βαθμό συνταινιακότητας. Οι πορτοκαλί γραμμές αντιπροσωπεύουν τις συγκρίσεις των ESTs και ετερόλογων γονιδίων για τα οποία υπήρχε διαθέσιμη σχηματική απεικόνιση (Tsoumani *et al.*, 2011). Οι πράσινες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις συγκριτικές θέσεις χαρτογράφησης των γονιδίων, που προστέθηκαν σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τους Drosorouliou *et al.* το 2014. Τα γονίδια που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία αντιπροσωπεύονται με κόκκινες γραμμές. Οι συμπαγείς γραμμές συμβολίζουν τις συγκρίσεις που συμφωνούν με την προτεινόμενη ομολογία των χρωμοσωμάτων, σε αντίθεση με τις διακεκομμένες που δεν ακολουθούν το πρότυπο ομολογίας. (Τροποποίηση από Tsoumani *et al.*, 2011).

Από τα γονίδια που προστέθηκαν σε αυτή τη μελέτη παρατηρείται ότι για 5 από τα 8 γονίδια οι θέσεις υβριδισμού συμφωνούν με την προτεινόμενη ομολογία των χρωμοσωμάτων. Οι ανιχνευτές για τα scaffolds 6, 14 και 15 εντοπίζονται σε διαφορετικές θέσεις. Για το scaffold 6 το γονίδιο που χρησιμοποιήθηκε εντοπίζεται στη θέση IVL (74) στο δάκο ενώ στη δροσόφιλα βρίσκεται στη θέση X (15C4). Το χρωμόσωμα IV εμφανίζει ομολογία με το βραχίονα 3L της δροσόφιλας. Σε προηγούμενη μελέτη συνταϊνιακότητας (Tsoumani *et al.*, 2011) έχει εντοπιστεί αντιστοίχιση της θέσης αυτής με τη θέση X (13A1) στη δροσόφιλα. Επομένως, οι βάσεις της περιοχής αυτής πιθανώς έχουν μετατοπιστεί στις θέσεις 13-15 του βραχίονα X στη δροσόφιλα. Με το δείκτη του scaffold 14 αντιστοιχίστηκε η περιοχή IIL (31) του δάκου με την περιοχή X (9E7-9E8), σε αντίθεση με την προτεινόμενη ομολογία του χρωμοσώματος II με το βραχίονα 3R. Δεν υπήρχε άλλος διαθέσιμος δείκτης κοντά στην περιοχή αυτή. Τέλος, ο δείκτης του scaffold 15 εντοπίστηκε στη θέση IIIR (61-62), ενώ στη δροσόφιλα βρίσκεται στη θέση 3L (64E5-64E6). Για το scaffold 37 εμφανίζονται δύο θέσεις υβριδισμού, γι' αυτό και δεν συμπεριλήφθηκε στη σχηματική απεικόνιση.

Στο χάρτη που δημιουργήθηκε μπορούν να παρατηρηθούν συνταϊνιακές ενότητες, δηλαδή περιοχές που εμφανίζουν υψηλή συντηρητικότητα συνταϊνίας. Μια τέτοια περιοχή είναι η 96-100 του χρωμοσώματος V με την αντίστοιχη περιοχή 21-25 του χρωμοσώματος 2L της δροσόφιλας. Ο υβριδισμός του ανιχνευτή για το scaffold 32 στη θέση V (98) και η αντιστοίχισή του με τη θέση 2L (21F3-21F4) επιβεβαιώνει τη συντηρητικότητα που είχε παρατηρηθεί. Ωστόσο, ο προσανατολισμός διαφέρει, γεγονός που μπορεί να εξηγηθεί με αναστροφή της περιοχής. Συνολικά, από τους 57 δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν οι 39, που αντιστοιχούν σε ποσοστό 67,3%, συμφωνούν με την προτεινόμενη ομολογία.

Επιπλέον, εκτός από τη μελέτη συνταϊνιακότητας με βάσει τα γονίδια-δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν, υπάρχει η δυνατότητα της σύγκρισης των υπόλοιπων γονιδίων που περιλαμβάνονται στα scaffolds. Αυτή η προοπτική μπορεί να εφαρμοστεί μελλοντικά, ώστε να συγκριθεί η δομή των περιοχών αυτών και να ολοκληρωθεί σε μεγαλύτερο βαθμό ο χάρτης συνταϊνιακότητας των δυο οργανισμών.

## 6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams M, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH et al (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651-165
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD et al (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185
- Ammerman D (1971) Morphology and development of the macronuclei of the ciliates *Stylomychia mytilus* and *Euploter aediculatus*. *Chromosoma* 3: 209-238
- Aslanidis C & de Jong PJ (1990) Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR). *Nucl Acids Res* 18 (20):6069-6074
- Ashburner M (1992) Mapping insect genomes pp.51–75 in *Insect Molecular Science*. Edited by Crampton JM & Eggleston P. Academic Press, London
- Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD (2002) Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol Ecol Notes* 2: 278-280
- Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Drosopoulou E, Kakani EG, Mavragani-Tsipidou P et al (2008) Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics* 9: 618
- Bernard P (1995) New ccdB positive-selection cloning vectors with kanamycin of chloramphenicol selectable markers. *Gene* 162: 159-160.
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles II A multipurpose cloning system. *Gene* 2:95-113
- Brown SE & Knudson DL (1997) FISH landmarks for *Aedes aegypti* chromosomes. *Insect Mol Biol* 6: 197–202
- Brown TA (2002) *Genomes Second Edition*. Wiley-Liss, Oxford
- Carson HL & Yoon J S (1982) Genetics and evolution of Hawaiian *Drosophila*, pp 296–344 in *The Genetics and Biology of Drosophila*. Edited by Ashburner M, Carson HL, Thomson JN. Academic Press, London
- Cassagnau P (1971) Phylogenie et chromosomes polytenes chez les collembolés pp. 419-428 *Neanuridae I Simposie Inter Zoolifogenia*, Salamanca.
- Celniker SE, Wheeler DA, Kronmiller B, Carlson JW et al (2002) Finishing a whole-genome shotgun: Release 3 of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome sequence. *Genome Biol.* 3: research0079.1-79.14
- Clark MS & Wall WJ (1996) Chromosome form and function, pp. 55-58 in *Chromosomes: the complex code*. Chapman and Hall, London.
- Clayton FE & Guest WC (1986) Overview of chromosomal evolution in the family Drosophilidae, pp 1–38 in *Genetics and Biology of Drosophila*, edited by Ashburner M, Carson HL & Thompson JN. Academic Press, London.
- Daane KM & Johnson MW (2010) Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annu Rev Entomol* 55: 151-69

- Denholm I & Rowland MW (1992) Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu Rev Entomol* 37: 91- 112
- Drosopoulou E, Chrysopoulou A, Nikita V, Mavragani-Tsipidou P (2009) The heat shock 70 genes of the olive pest *Bactrocera oleae*: genomic organization molecular characterization of a transcription unit its proximal promoter region *Genome* 52: 210-214
- Drosopoulou E, Nakou I, Sichova J , Kubickova S , Marec F , Mavragani-Tsipidou P (2012) Sex chromosomes and associated rDNA form a heterochromatic network in the polytene nuclei of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 140:169–180
- Drosopoulou E, Nakou I, Mavragani-Tsipidou P (2014) The *Bactrocera oleae* genome: localization of nine genes on the polytene chromosomes of the olive fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Genome* 57:573-576
- Economopoulos AP, Avtzis N, Zervas G, Tsitsipis J, Haniotakis G, Tsiropoulos G, Manoukas A (1977) Experiments on control of olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by combined effect of insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects. *J. Appl. Entomol.* 83: 201-215
- Economopoulos, AP (1979) Prospects for the control of *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae) by methods that do not involve insecticides, the sterile insect release technique and olfactory and visual traps, integrated approach. *International Organization for Biological Control/West Palaearctic Regional Section (IOBC/WPRS) Bulletin* 2/1: 42-49.
- Economopoulos, A.P. 1982. Present status of olive fruit fly control by yellow traps and SIRM in Greece. Trapping of the fly by yellow traps combined with odor lures. *Proceedings E.E.C. Meeting on Integrated Control in Oleiculture* (Antibes, France, Nov. 1981): 86-95.
- Economopoulos AP (1981) Etat d'avancement des travaux et echanges d'informations sur les problemes poses par la lutte integree en oleiculture pp. 86-94. *Proceedings of CEC Experts Meeting, Antibes.*
- Fiestas RDU, Constante JA, Duran RM, Roncero AV (1972) *Annals of the Entomological Society of France.* 8: 179-188
- Fletcher BS & Kapatos ET (1983) The influence of temperature, diet and olive fruits on the maturation rates of female olive flies at different times of the year. *Entomol Exp Appl* 33: 244-52.
- Franz G (2005) Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique pp: 427-452 in: *Sterile insect technique: principles and practice in areawide integrated pest management.* Edited by Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS. Springer, Netherlands.
- Ferdig MT, Taft AS, Severson DW, Christensen BM (1998) Development of a comparative genetic linkage map for *Armigeres subalbatus* using *Aedes aegypti* RFLP markers. *Genome Research* 8: 41-47
- Frizzi G & Springetti A (1953) Prime ricerche citogenetiche sul “*Dacus oleae* Gmel”. *Ric Sci* 23: 1613-1620

- Gariou-Papalexiou A, Gourzi P, Delprat A, Kritikou D, Rapti K, Chrysanthakopoulou B, Mintzas A, Zacharopoulou A (2002) Polytene chromosomes as tools in the genetic analysis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genetica* 116, 59–71
- Gene Ontology Consortium (2004) The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucl Acids Res* 32: D288-D261.
- George P, Sharakhova MV, Sharakhov IV (2010) High-resolution cytogenetic map for the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 19: 675–682
- Glenn TC (2011) Field guide to next-generation DNAsequencers. *Mol Ecol Res* 11:759-769
- Girolami V, Strapazzon A, De Gerloni PF (1983) Insect/plant relationships in olive flies: General aspects and new findings pp. 258- 267 in *Fruit flies of Economic Importance*. Proceedings of CEC/IOBC International Symposium, Athens.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R et al (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* *Science* 298: 129-149
- Horwitz JP, Chua J, Curby RJ, Tomson AJ, DaRooge MA et al (1964) Substrates for cyrochemical demonstration of enzyme activity I Some substituted 3-indonyl- $\beta$ -D-glycopyranosides. *J Med Chem* 7: 574-575
- i5K Consortium (2013) The i5K Initiative: Advancing Arthropod Genomics for Knowledge, Human Health, Agriculture, and the Environment. *J Hered* 104 (5): 595-600
- International Human Genome Sequencing Consortium (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921
- Jimenez LV, Kang BK, DeBruyn B, Lovin DD, Severson DW (2004) Characterization of an *Aedes aegypti* bacterial artificial chromosome (BAC) library and chromosomal assignment of BAC clones for physical mapping quantitative trait loci that influence Plasmodium susceptibility. *Insect Mol Biol* 13:37–44
- Kakani EG, Ioannides IM, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Skouras PJ et a. (2008) A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 781-787
- Kakani EG, Trakala M, Drosopoulou E, Mavragani-Tsipidou P Mathiopoulos KD (2013) Genomic structure, organization and localization of the acetylcholinesterase locus of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *Bulletin of Entomological Research* 103: 36-47
- Kapatos ET, Fletcher BS (1984) The phenology of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera, Tephritidae), in Corfu Greece. *J Appl Entomol* 97: 360-70
- Knipling GF (1955) Possibilities of insect control or eradication through the use of sexual sterile males. *J Econ Entomol* 48: 459-462
- Kortschak RD, Samuel G, Saint R, Miller D J (2003) EST analysis of the cnidarian *Acropora millepora* reveals extensive gene loss and rapid sequence divergence in the model invertebrates. *Curr Biol* 13:2190-2195
- Krimbas CB (1963) A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Trypetidae): the salivary gland and the mitotic chromosomes. *Caryologia* 16: 371-376

- Lakovaara S & Saura A (1982) Evolution and speciation in the *Drosophila obscura* group, pp 1–59 in *The Genetics and Biology of Drosophila*, edited by Ashburner M, Carson HL, Thomson JN. Academic Press, London.
- Lemeunier F, David JR, Tsakas L, Ashburner M (1986) The melanogaster species group, pp 147–256 in *The Genetics and Biology of Drosophila*. Edited by M Ashburner, H L Carson & J N Thompson Jr Academic Press, London
- Margaritopoulos JT, Skavdis G, Kalogiannis N, Nikou D, Morou E, et al (2008) Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation *Pest Manage Sci* 64: 900-908
- Markert CL & Moller F (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species specific patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 45: 753–763
- Mazomenos BE, 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 Buletin* 25: 137-147
- Mavragani-Tsipidou P, Karamanlidou G, Zacharopoulou A, Koliais S, Kastritsis CD (1992) Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 35: 373-378
- Mavragani-Tsipidou P (2002) Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 116: 45-57
- Meyers BC, Scalabrin S, Michele Morgante (2004) Mapping and sequencing complex genomes: let's get physical! *Nature* 5:578-589
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY
- Montiel Bueno A, Jones O (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals *IOBC wprs Bulletin* 25: 147-157
- Moser SC, Swedlow JR (2011) How to be a mitotic chromosome. *Chromosome Res* (2011) 19: 307- 319
- Nagl W (1969) Banded polytene chromosomes in the legume *Phaseolus vulgaris*. *Nature* 221: 70-71
- Neuenschwander P, Michelakis S (1978) Infestation of *Dacus oleae* (Gmel ) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *J Appl Entomol* 86: 420-33
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1: 841-845
- Nussbaum RL, McInnes RR , Willard HF (2011) *Ιατρική Γενετική* (Thomson and Thomson), Εκδόσεις ΠΧ Πασχαλίδης, Αθήνα
- O'Grady PM, Baker RH, Durando CM, Etges WJ, DeSalle R (2001) Polytene chromosomes as indicators of phylogeny in several species groups of *Drosophila*. *BMC Evolutionary Biology* 1: 6-11
- Painter TS (1933) A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps. *Science* 78: 585-586

- Pardue ML, Gall JG (1975) Nucleic acid hybridization to the DNA of cytological preparations. *Methods Cell Biol* 10:1-16
- Parkinson J, Blaxter M (2009) Expressed sequence tags: an overview. *Methods Mol Biol* 533: 1-12
- Pereira-Castro I, van Asch B, Trindade Rei F, da Costa LT (2015) *Eur J Entomol.* 112: 20–26
- Petrov DA (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends in Genetics* 17:23-28
- Radu M, Rossler Y Koltin, Y (1975) The chromosomes of the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Wied): karyotype and chromosomal organization. *Cytologia* 40: 823-828
- Rice RE (2000) Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae*. *UC Plant Protection Quarterly.* 10: 1-5
- Robinson A, Franz G, Fisher K (1999) Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitidis capitata*: Development, Mass Rearing and Field Application. *Trends in Entomology* 2: 81-104
- Robinson AS (2002a) Introduction. *Genetica* 116: 1-3
- Robinson, AS (2002b) Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitidis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica* 116: 5-13
- Russel PJ (2009) *iGenetics: A Mendelian Approach*. Pearson Prentice Hall, San Francisco
- Sgaramella V & Ehrlich SD (1978) Use of the T4 Polynucleotide Ligase in The Joining of Flush-Ended DNA Segments Generated by Restriction Endonucleases. *Eur J Biochem* 86: 531–537
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463–5467
- Scolari F, Schetelig MF, Gabrieli P, Siciliano P, Gomulski LM et al (2008) Insect transgenesis applied to tephritid pest control. *J Appl Entomol* 132: 820-831
- Severson DW, Meece JK, Lovin DD, Saha G, Morlais I (2002) Linkage map organization of expressed sequence tags and sequence tagged sites in the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* 11: 371-378
- Schlotterer C (1998) Microsatellites pp. 237–261 in *Molecular genetic analysis of populations: a practical approach 2/e*. Edited by Hoelzel. Oxford University Press, Oxford
- Scott JG, Liu N, Kristensen M, Clark AG (2009) A Case for Sequencing the Genome of *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol* 46(2): 175-182
- Severson DW, Brown SE, Knudson DL (2001) Genetic and physical mapping in mosquitoes: Molecular Approaches. *Annu Rev Entomol*, 46:183–219
- Skouras PJ, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Ioannides IM, Kakani E G, et al (2007) Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Manage Sci* 63:42–48
- Stratikopoulos EE, Augustinos AA, Petalas YG, Vrahatis MN, Mintzas A, Mathiopoulos KD, Zacharopoulou A (2008) An integrated genetic and cytogenetic

map for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, based on microsatellite and morphological markers. *Genetica* 133:147–157

- Thomas DB, Mangan RL (2005) Nontarget Impact of Spinosad GF-120 Bait Sprays for Control of the Mexican Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Texas Citrus. *J Econ Entomol* 98: 1950-1956
- Timoshevskiy VA, Kinney NA, deBruyn, BS Mao C, Tu Z, Severson SW, Sharakhov IV, Sharakhova MV (2014) Genomic composition and evolution of *Aedes aegypti* chromosomes revealed by the analysis of physically mapped supercontigs. *BMC Biology* 12:27-40
- Tsitsipis JA (1980) Effects of constant temperatures on larval and pupal development of olive fruit flies reared on artificial diet *Environmental Entomology*, 9: 764-768
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis Mellifera*. *Nature* 443(7114): 931–949
- Tsoumani KT, Augustinos AA, Kakani EG, Drosopoulou E, Mavragani-Tsipidou P, Mathiopoulou KD (2011) Isolation, annotation and applications of expressed sequence tags from the olive *Xy, Bactrocera oleae*. *Mol Genet Genomics* 285:33–45
- Tsoumani KT, Drosopoulou E, Bourtzis K, Gariou-Papalexioiu A, Mavragani-Tsipidou P, Zacharopoulou A, et al (2015) Achilles, a New Family of Transcriptionally Active Retrotransposons from the Olive Fruit Fly, with Y Chromosome Preferential Distribution *PLoS ONE* 10: e0137050
- Tzanakakis ME (2006) *Insects and Mites Feeding on Olive Distribution, Importance, Habits, Seasonal Development, and Dormancy* Brill. Leiden, Boston.
- Ullman A, Jacob F, Monod J (1967) Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structure gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 24: 339-343
- Venter JC, Adams MD, Myers E., Li PW, Mural RJ et al (2001) The sequence of the human genome *Science* 291: 1304-1351
- Vontas JG, Cosmidis N, Loukas M, Tsakas S, Hejazi M J et al (2001) Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic Biochem Physiol* 71: 124-132
- Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M et al (2002) Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol Biol* 11: 329-336
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P et al (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-1082
- Watson JD, Caudy AA, Myers RM, Witkowski JA (2007) *Recombinant DNA (Genes and Genomes-A Short Course)*, Third Edition. WH Freeman and Company, New York
- White IM & Elson-Harris MM (1992) *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. CAB International, Wallingford.



- White HM, Wang XJ (1992) Taxonomic notes on some dacine (Diptera: Tephritidae) fruit flies associated with citrus, olives and cucurbits. *Bulletin of Entomological Research* 82: 275-279
- Whitten MJ, (1969) Automated sexing of pupae and its usefulness in control by sterile insects. *J Econ Entomol* 62: 272-273
- Zambetaki A, Zacharopoulou A, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P (1999) The genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: localization of molecular markers by in situ hybridization to salivary gland polytene chromosomes. *Genome* 42: 740-751
- Zambetaki A, Mavragani-Tsipidou P, Scouras ZG (2000) Heat shock response of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae): genes and proteins. *Ann Entomol Soc Am* 93: 648-652
- Zacharopoulou A (1987) Cytogenetic analysis of mitotic and salivary gland chromosomes in the Medfly *Ceratitis capitata*. *Genome* 29: 67
- Zacharopoulou A & Franz G (2013) Genetic and Cytogenetic Characterization of Genetic Sexing Strains of *Bactrocera dorsalis* and *Bactrocera cucurbitae* (Diptera: Tephritidae) *J Econ Entomol* 106: 995-1003
- Zdobnov EM, von Mering C, Letunic I, Torrents D, Suyama M et al (2002) Comparative Genome and Proteome Analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science* 298: 149-159
- Zdobnov EM, Bork P (2007) Quantification of insect genome divergence. *Trends Genet* 23: 16-20
- Zhimulev IF (1996) Morphology and structure of polytene chromosomes. *Adv. Genet.* 34: 1-497.
- Zhimulev IF, Belyaeva ES, Semeshin VF, Koryakov DE, Demakov SA et al (2004) Polytene Chromosomes: 70 Years of Genetic Research. *Int Rev Cytol* 241: 203-275
- Zhimulev IF & Koryakov DE (2009) *Polytene Chromosomes in: eLS*. John Wiley & Sons Ltd, Chichester.