

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Ανάλυση αρρενοειδικών διαγνωστικών δεικτών στον δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*.»

“Analysis of male specific diagnostic markers in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*.”

ΧΑΛΑΤΣΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2016

Τριμελής Επιτροπή

- Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος

Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας, Τμήμα Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Σαραφίδου Θεολογία

Επίκουρος Καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής Ζωικών οργανισμών, Τμήμα
Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

- Τσουμάνη Κωνσταντίνα

Διδάσκουσα Π.Δ. 407 του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας,
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά την οικογένειά μου η οποία με στηρίζει ανελλιπώς και με κάθε τρόπο σε κάθε επιλογή μου έως τώρα. Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον κύριο Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο που μου εμπιστεύτηκε το συγκεκριμένο θέμα και μου έδωσε τη δυνατότητα να ασχοληθώ με αυτό. Οι παρατηρήσεις του, η κριτική του καθώς και οι συζητήσεις που είχαμε πάνω στο θέμα με βοήθησαν να διευρύνω τους ορίζοντες της σκέψης μου πάνω στη μοριακή βιολογία και γενικότερα στον επιστημονικό κλάδο των βιολογικών επιστημών. Τις θερμότερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω και στη διδάκτορα κ. Ευθυμία Σαγρή, η οποία έκανε ότι περνούσε από το χέρι της για την προσαρμογή μου στο εργαστηριακό περιβάλλον και μέσα από την άψογη συνεργασία μας, τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση, καθώς και την ηθική υποστήριξη με την οποία με περιέβαλε, συνέβαλε τα μέγιστα στην επιτυχή ολοκλήρωση της συγκεκριμένης διπλωματικής εργασίας. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την πολύ καλή συνεργασία και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου, την μεταδιδάκτορα κ. Κωνσταντίνα Τσουμάνη καθώς και τις υποψήφιες διδάκτορες Παναγιώτα Κοσκινιώτη και Μαρία-Ελένη Γρηγορίου.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1 Ελιά.....	7
1.2 Ο δάκος της ελιάς.....	8
1.2.1 Ταξινόμηση και οικονομική σημασία.....	8
1.2.2 Προκαλούμενη ζημιά.....	9
1.2.3 Περιγραφή και εξάπλωση.....	9
1.2.4 Βιολογικός κύκλος.....	11
1.2.5 Αναπαραγωγή.....	13
1.3 Βιολογικός έλεγχος πληθυσμών	13
1.3.1 Έλεγχος πληθυσμών με χημικές μεθόδους.....	14
1.3.2 Τεχνική στείρου εντόμου (SIT).....	15
1.4 Φυλοκαθορισμός.....	17
1.5 Υ χρωμόσωμα.....	19
1.5.1 Υ-ειδικά γονίδια.....	19
1.5.2 Το γονιδίωμα του δάκου.....	20
1.6 Γενετικοί δείκτες.....	21
1.6.1 Εκκινητές.....	22
1.5 Σκοπός.....	23
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1 Προέλευση εντόμων και συλλογή αυγών.....	25
2.2 Απομόνωση RNA και DNA.....	25
2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης.....	28
2.4 Ποσοτικοποίηση DNA.....	30
2.5 Επίδραση με DNase και σύνθεση DNA.....	30
2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	31
2.6.1 Re-PCR (Repeat PCR).....	33
2.7 PCR πραγματικού χρόνου (Real time PCR).....	33
2.8 Σχεδιασμός και έλεγχος εκκινητών.....	34
2.9 Λειτουργική ανάλυση σε αναπτυξιακά στάδια και στο αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών ατόμων δάκου.....	35
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	37
3.1 Ποσοτικοποίηση DNA.....	38
3.2 Ενίσχυση με PCR σε 17 αρρενοειδικούς γενετικούς τόπους του είδους <i>Bactrocera oleae</i>	39
3.3 Απομόνωση DNA.....	45
3.4 Προφίλ έκφρασης με χρήση Real time PCR.....	46

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	49
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	53

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί το σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς καθώς προκαλεί τη μεγαλύτερη ποιοτική και ποσοτική ζημιά στην ελαιοπαραγωγή. Για αυτό το λόγο, το έντομο αυτό έχει πολύ μεγάλη οικονομική σημασία. Ωστόσο διαθέτουμε λίγες πληροφορίες σε μοριακό και γενετικό επίπεδο. Η γονιδιωματική ανάλυση λοιπόν, του εντόμου είναι πολύ σημαντική τόσο για τη βασική έρευνα όσο και εφαρμοσμένα με τη βελτιστοποίηση της τεχνικής στείρου εντόμου (SIT), η οποία αποσκοπεί στον βιολογικό έλεγχο των πληθυσμών. Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας έγινε ανάλυση αρρενοειδικών αλληλουχιών με σκοπό την εύρεση αλληλουχιών που εκφράζονται μόνο στα αρσενικά άτομα με την τεχνική αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) ενώ στη συνέχεια και αφού βρέθηκαν τα γονίδια με τη μεγαλύτερη ομολογία για αυτές τις αλληλουχίες, χρησιμοποιήθηκαν δυο από αυτές για την δημιουργία προφίλ έκφρασης των γονιδίων αυτών στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του δάκου καθώς και σε ενήλικα έντομα, με τη τεχνική Real time PCR, για να πάρουμε ενδείξεις για το κατά πόσο τα γονίδια αυτά μπορεί να εμπλέκονται στον φυλοκαθορισμό και τη γονιμότητα. Τα αποτελέσματα, μάς έδειξαν τη ύπαρξη 17 αρρενοειδικών γονιδίων τα οποία εκφράζονταν μόνο στα αρσενικά άτομα ενώ τα προφίλ έκφρασης έδωσαν μεγάλη έκφραση στο στάδιο του αυγού 15h και 48h για τα γονίδια *importin-4* και *smoothelin* αντίστοιχα, καθώς και μεγάλη έκφραση στους όρχεις 7 ημέρες μετά το ζευγάρισμα. Τα αποτελέσματα από τα προφίλ έκφρασης μας δίνουν μια καλύτερη ένδειξη για την πιθανή συσχέτισή τους στον φυλοκαθορισμό και τη γονιμότητα.

Abstract

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the most important pest of olives as it is the organism that causes the greatest qualitative and quantitative damage to oil production. For this reason, this insect is of great economic importance. However, there is still little information about it at molecular and genetic level. Therefore, the genomic analysis of this insect is of great importance both for basic research and applied in order to maximize the sterile insect technique (SIT), which is aimed at biological control of populations. The subject of this thesis, was to perform an analysis of male specific sequences in order to find sequences that are expressed only in males, with the use of the technique polymerase chain reaction (PCR). Then we found the genes with the greatest homology to these sequences and used two of them to generate an expression profile of these genes in the early developmental stages of the olive fruit fly as well as in adult stages of the insect. We performed this by using the technique real time PCR, to obtain evidence on whether these genes may be involved in sex determination and fertility. The results have shown the existence of 17 male specific genes expressed only in males, while the expression profile gave us high expression in the stage of the egg 15 hours and 48 hours for *importin-4* and *smoothelin* respectively. It also gave us high expression in the testes 7 days after mating. The results of our expression profiles give us a better indication of their possible association to the process of sex determination and fertility.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ελιά

Η ελιά (*Olea europaea*), αποτελεί δένδρο πολύτιμο τόσο για την ομορφιά του όσο και για τον καρπό του. Παράλληλα, αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα του μεσογειακού χώρου από τα προϊστορικά χρόνια. Οι αναφορές στην καλλιέργεια της ελιάς σε κείμενα ελληνικής μυθολογίας, της Παλαιάς Διαθήκης και της ρωμαϊκής λογοτεχνίας, αποδεικνύουν την προέλευση, αλλά και τη σημασία του ελαιόδεντρου στην περιοχή. Για την καταγωγή του δέντρου έχουν εκφραστεί πολλές σκέψεις, στηριζόμενες σε αρχαιολογικά ευρήματα πολλών περιοχών της λεκάνης της μεσογείου. Σύμφωνα με τον Truitt (1980), η πιο παλιά αναφορά για την καλλιέργεια της ελιάς στον πλανήτη είναι στο χωριό Φυλλιά της χώρας μας, το 4800 π.Χ. Εξάλλου, στην Κύπρο, η ελιά συνυπάρχει με τους κατοίκους του νησιού από τη Νεολιθική Περίοδο (6^η χιλιετία π.Χ.). Σύμφωνα με πηγές του αρχαιολόγου Σοφοκλή Χατζησάββα, ανασκαφές σε οικισμούς και ναούς της περιόδου αυτής έφεραν στο φώς τους αρχαιότερους ελαιόμυλους σε ολόκληρο τον ελληνικό χώρο (Δ. Παπαγιαννόπουλος στο λήμμα "Ελαία", Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Π. Δρανδάκη).



Εικόνα 1 Η υπεραιώνια ελιά στο νησί της Αίγινας.

Η εμπορική καλλιέργεια της ελιάς ξεκίνησε κατά τη διάρκεια της 2^{ης} χιλιετίας π.Χ., αλλά τα αρχαιότερα ευρήματα που σχετίζονται με την παραγωγή ελαιόλαδου στην Κύπρο χρονολογούνται στον 13 αιώνα π.Χ. Η ελιά από τον τόπο καταγωγής της στην ανατολική Μεσόγειο, μεταφέρθηκε αρχικά στην Κρήτη και στη συνέχεια στην υπόλοιπη Ελλάδα. Από εκεί επεκτάθηκε προς δυσμάς και απλώθηκε προς όλες τις παραθαλάσσιες χώρες της Μεσογείου από τους Άραβες και τους Ρωμαίους. Από την περίοδο της Αναγέννησης μέχρι τους αποικιακούς χρόνους των μεγάλων Ευρωπαϊκών δυνάμεων, εξερευνητές και άποικοι μετέφεραν το ελαιόδεντρο στον Νέο Κόσμο (Δ. Παπαγιαννόπουλος στο λήμμα "Ελαία", Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Π. Δρανδάκη).

Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα στατιστικά δεδομένα (FAOStat 2013), η μεγαλύτερη παραγωγή ελιάς γίνεται στις χώρες Ισπανία, Ιταλία, Ελλάδα, Τουρκία, Μαρόκο, Τυνησία, Αλγερία, Αυστραλία, Αίγυπτος και Πορτογαλία. Σημαντική αύξηση στην παραγωγή ελιάς

κατά τα τελευταία χρόνια, με βάση τα παραπάνω στοιχεία, σημειώθηκε στη Βραζιλία, το Μεξικό, το Ιράν, το Ισραήλ, το Περού, τις ΗΠΑ, τον Λίβανο, την Ιορδανία και το Αζερμπαϊτζάν. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η ελαιοκαλλιέργεια αποτελεί σημαντική καλλιέργεια για τις χώρες του Νότου, όπως η Ιταλία, η Ισπανία, η Πορτογαλία, η Ελλάδα, η Κύπρος, η Γαλλία, η Μάλτα, η Κροατία και η Αλβανία. Με δεδομένο ότι το μεγαλύτερο ποσοστό από την παραγωγή αυτή εξάγεται σε άλλες χώρες, γίνεται φανερή η μεγάλη οικονομική σημασία της καλλιέργειας αυτής για χώρες όπως η Ελλάδα.

Στη χώρα μας η ελιά κατέχει την πρώτη θέση μεταξύ των δενδρωδών καλλιεργειών τόσο ως προς το μέγεθος των εκτάσεων που καταλαμβάνει όσο και ως προς τον αριθμό των καλλιεργούμενων δένδρων. Πιο συγκεκριμένα στη χώρα μας καλλιεργούνται περισσότερα από 120.000.000 ελαιόδεντρα σε μια έκταση 6.000.000 στρεμμάτων και παράγονται ετησίως πάνω από 1.970.000 τόνοι ελιάς (International olive oil council, 2015). Με δεδομένο ότι το μεγαλύτερο ποσοστό από την παραγωγή αυτή εξάγεται σε άλλες χώρες, γίνεται φανερή η μεγάλη οικονομική σημασία της καλλιέργειας αυτής για χώρες όπως η Ελλάδα. Είναι αναγκαία λοιπόν η καλύτερη δυνατή προστασία από όλους εκείνους τους παράγοντες που μειώνουν την ποσότητα και την ποιότητα της σοδιάς, με όσο το δυνατόν μικρότερη διατάραξη του περιβάλλοντος. Κυριότερος από αυτούς είναι ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*). Και αυτό γιατί ο δάκος είναι ικανός να προσβάλλει και να καταστρέφει καρπούς ελιάς σε παγκόσμια κλίμακα και σε όλη τη διάρκεια του χρόνου σε αντίθεση με άλλα έντομα που προσβάλλουν μεν τους καρπούς αλλά εντοπίζονται τοπικά σε συγκεκριμένες περιοχές και για συγκεκριμένες περιόδους μέσα στο έτος.



Εικόνα 2 Καρποί ελιάς



Εικόνα 3 Καρποί ελιάς που έχουν προσβληθεί από θηλυκά έντομα δάκου

1.2 Ο δάκος της ελιάς

1.2.1 Ταξινόμηση και οικονομική σημασία

Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) είναι ένα ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην οικογένεια Tephritidae. Αναλυτικά, η συστηματική του κατάταξη έχει ως εξής:

- Επικράτεια: Eukaryota
- Βασίλειο: Metazoa
- Φύλο: Arthropoda
- Υποφύλο: Uniramia
- Ομοταξία: Insecta
- Τάξη: Diptera
- Οικογένεια: Tephritidae
- Γένος: Bactrocera
- Είδος: Bactrocera oleae



Εικόνα 4 Ενήλικο αρσενικό έντομο *Bactrocera oleae*

Η οικογένεια Tephritidae περιλαμβάνει είδη μεγάλης οικονομικής σημασίας, τα οποία αποτελούν παράσιτα σημαντικών γεωργικών καλλιεργειών. Ειδικά το γένος *Bactrocera* περιλαμβάνει 28 υπογένη με συνολικά περίπου 500 διαφορετικά είδη, τα περισσότερα από τα οποία αποτελούν παράσιτα γεωργικών καλλιεργειών (Clarke et al., 2005). Το είδος *B. oleae* με το οποίο ασχοληθήκαμε στη συγκεκριμένη εργασία, είναι ένα είδος τεράστιας οικονομικής σημασίας λόγω των ποσοτικών και ποιοτικών απωλειών που προκαλεί στα ελαιόδεντρα σε πολλές περιοχές παγκοσμίως, παρά το γεγονός ότι εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπισή του. Τα θηλυκά έντομα του είδους, εναποθέτουν τα αυγά τους σε ώριμους καρπούς ελιάς, όπου οι εκκολαπτόμενες προνύμφες τρέφονται από τον καρπό, με αποτέλεσμα τη σημαντική ποιοτική και ποσοτική απώλεια στην παραγωγή ελιών και λαδιού (Levinson and Levinson, 1984; Manousis and Moore, 1987; Burrack and Zalom, 2008). Υπολογίζεται ότι ο δάκος καταστρέφει το 5% της συνολικής παραγωγής ελιάς, με αποτέλεσμα οικονομικές απώλειες περίπου 800 εκατομμυρίων δολαρίων κάθε χρόνο (Montiel Bueno & Jones, 2002).

1.2.2 Προκαλούμενη ζημιά

Τα θηλυκά άτομα του δάκου προσελκύονται στον καρπό όταν οι ελιές είναι ώριμες, μεγαλύτερες και πλουσιότερες σε υγρασία (Fiestas et al., 1972; Girolami et al., 1983). Κάθε θηλυκό τείνει να αποθέσει τα αυγά του σε καρπούς που δεν έχουν αποθέσει άλλα άτομα προηγουμένως. Αφού ανοίξει την οπή με τον ωσθέτη του, το θηλυκό αποθέτει τα αυγά και πριν φύγει από το φρούτο χρησιμοποιεί τον ωσθέτη για να απλώσει στην επιφάνεια του καρπού το χυμό που εκλύεται. Αυτό αποτρέπει άλλα θηλυκά από το να αφήσουν στον ίδιο καρπό τα αυγά τους. Η ζημιά που κάνει ο δάκος στην παραγωγή είναι τόσο ποιοτική όσο και ποσοτική (Daane & Johnson, 2010). Αρχικά, προκαλεί πτώση του καρπού πριν την περίοδο της συγκομιδής αλλά και μείωση της απόδοσης λόγω της κατανάλωσης του εσωτερικού του καρπού από τις προνύμφες που τρέφονται από αυτόν. Επιπλέον, προκαλεί

μείωση της ποιότητας του ελαιολάδου λόγω των οπών που έχουν δημιουργηθεί στην επιφάνεια των καρπών και οι οποίες καθιστούν τους καρπούς πιο ευάλωτους σε προσβολή από μύκητες (Neuenschwander & Michelakis, 1979). Η καταπολέμηση λοιπόν του δάκου είναι αναγκαία και πλέον οι έρευνες που γίνονται πάνω σε αυτόν τον τομέα έχουν να κάνουν όχι μόνο με τη γενετική και τη βιολογία του εντόμου αλλά και με την εύρεση ενός τρόπου που θα μας βοηθάει να ελέγχουμε τους πληθυσμούς του δάκου χωρίς ωστόσο να προκαλούμε μεταβολές στην οικολογική ισορροπία.

1.2.3 Περιγραφή και εξάπλωση

Ο δάκος είναι ευρέως διαδεδομένος στη λεκάνη της Μεσογείου αλλά αναφορές εμφάνισής του έχουν γίνει και σε άλλα μέρη του πλανήτη, όπως η Νότια και Κεντρική Αφρική, η Μέση Ανατολή, η Καλιφόρνια και η Κεντρική Αμερική (Rice, 1999; Augustinos et al., 2002; Rice et al., 2003). Παρά την αφθονία του στην περιοχή της Μεσογείου, ο δάκος σχετίζεται επίσης με μια άγρια ποικιλία ελιάς στην Αφρική από όπου προέκυψαν οι καλλιεργούμενες ποικιλίες (Zohary, 1994). Η σχέση του δάκου με άλλα είδη του γένους *Bactrocera*, δεν είναι καλά κατανοητές, αν και ένα είδος δάκου έχει περιγραφεί από το Πακιστάν στις αρχές του περασμένου αιώνα (var. *asiatica*, Silvestri, 1916). Ο δάκος φαίνεται να είναι ικανός να αποικίσει νέες περιοχές εύκολα, με αποτέλεσμα κάθε χώρα στην οποία υπάρχουν ελαιόδεντρα, να είναι σε κίνδυνο εισβολής (USDA, 2001).

Πλέον έχει καταστεί σαφές ότι η λεπτομερής γνώση της βιολογίας, της γενετικής δομής και της γεωγραφικής ποικιλότητας του δάκου αποτελούν προϋπόθεση για τον σχεδιασμό οποιασδήποτε στρατηγικής για την απομόνωση, την εξάπλωση και τον έλεγχο του εντόμου (Roderick & Navajas, 2003). Μελέτες πάνω στη μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata*, ένα άλλο μέλος της οικογένειας των Tephritidae, έχουν δείξει την αξία των γενετικών μελετών ως οδηγού για τη διαχείριση τέτοιων εντόμων (reviewed in Gasperi et al., 2002).

Ο δάκος της ελιάς αποτελεί ένα από τα μικρότερα είδη της οικογένειάς του και τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του διαφοροποιούνται ανάλογα με το στάδιο στο οποίο βρίσκεται. Τέσσερα είναι τα βασικά στάδια της ανάπτυξης του δάκου: το αυγό (Εικόνα 5), η προνύμφη (larva) (Εικόνα 1.6), η νύμφη (pupa) (Εικόνα 7) και το ενήλικο άτομο (Εικόνα 3).

Ο θηλυκός δάκος εναποθέτει ένα αυγό μέσα στον καρπό της ελιάς (Εικόνα 5), με αποτέλεσμα να μην είναι ορατό εκτός και αν κόψουμε τον καρπό στη μέση. Συνήθως τα θηλυκά εναποθέτουν ένα αυγό σε κάθε καρπό (Ant et al., 2012). Τα προσφάτως εναποθετημένα αυγά του δάκου είναι διαφανή και έχουν ένα λευκό κρεμώδες χρώμα (Εικόνα 5). Τα αυγά έχουν μήκος περίπου 0,74 mm και πλάτος 0,21 mm (Genc, 2014). Το σχήμα είναι το τυπικό σχήμα των αυγών των εντόμων της οικογένειας των Tephritidae, επίμηκες και κάπως κυρτό. Αυτή η εμφάνιση διατηρείται μέχρι να εκκολαφθούν, όταν η προνύμφη πρώτου σταδίου είναι ορατή μέσα στο χόριο (η μεμβράνη που περιβάλλει το αυγό) (Genc, 2014).



Εικόνα 5 Αυγά του εντόμου *B.oleae* μέσα σε καρπό ελιάς.

Οι προνύμφες (larvae) (Εικόνα 6) εξέρχονται από το πρόσθιο άκρο του αυγού και κινούνται βαθιά μέσα στον καρπό της ελιάς για να τραφούν (Hanife, 2014). Όπως συμβαίνει με το αυγό, έτσι και η προνύμφη δεν είναι ορατή παρά μόνο αν κόψουμε τον καρπό στη μέση. Οι προνύμφες είναι τυπικά σκουλήκια των εντόμων της οικογένειας Tephritidae, μικρού μεγέθους με μήκος 5-6 mm και πλάτος 1,5 mm, επιμήκη και ελαφρώς κωνικά σε κάθε άκρο (Phillips, 1946).



Εικόνα 6 Τρεις προνύμφες του δάκου της ελιάς.

Η μετατροπή των προνυμφών σε νύμφες ή βομβύκια (pupae), συνήθως συμβαίνει μέσα στον καρπό της ελιάς αλλά μπορεί να συμβεί και στο έδαφος ανάλογα με την εποχή του χρόνου και τον αριθμό των γενεών. Συνήθως πραγματοποιείται στο έδαφος στο τέλος της εποχής όπου υπάρχουν πολλές γενεές ετησίως (Rice, 2000). Το βομβύκιο εμφανίζεται ως ωοειδής σχηματισμός μήκους περίπου 4 mm με χρώμα από κίτρινο έως ανοιχτό καφέ (Εικόνα 7).



Εικόνα 7 Το στάδιο του βομβυκίου (pupa).

Ο ενήλικος δάκος της ελιάς (Εικόνα 4) είναι πολύ μικρός, με μήκος περίπου 5 mm και άνοιγμα φτερών 10 mm (Weems, 1966). Τα φτερά είναι κατά κύριο λόγο διαφανή, με ένα καφέ έως και μαύρο στίγμα στο άκρο κάθε φτερού. Οι βραχίονες και μια περιοχή εκατέρωθεν της βάσης των φτερών παρουσιάζονται με κίτρινο χρώμα. Ο θώρακας και η κοιλιά του ενήλικου εντόμου έχουν κυρίως σκούρο καφέ έως μαύρο χρώμα, με καφέ-κίτρινα σημάδια και κοντές ασημένιες τρίχες (Weems, 1966), ενώ χαρακτηριστικοί είναι οι μεγάλοι σύνθετοι κοκκινωποί οφθαλμοί, και οι μικρές κεραίες. Τα θηλυκά έχουν έναν οδοντωτό ωοθέτη που χρησιμοποιείται για να τρυπάνε τη φλούδα του καρπού της ελιάς κατά την απόθεση των αυγών. Τα πόδια και οι αλτήρες εμφανίζονται με κίτρινο-κόκκινο και λευκό χρωματισμό αντίστοιχα. (Weems et al., 1999).

1.2.4 Βιολογικός κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος του δάκου της ελιάς ακολουθεί τέσσερα στάδια ανάπτυξης και επηρεάζεται από συγκεκριμένους περιβαλλοντικούς παράγοντες, με πιο αντιπροσωπευτικούς τη θερμοκρασία και την υγρασία. Οι πιο ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης των πληθυσμών του δάκου αφορούν σχετική ατμοσφαιρική υγρασία 60%-80% και θερμοκρασίες 20-25°C (Tsitsipis, 1980; Fletcher & Karatos, 1983). Ως ολομετάβολο έντομο λοιπόν, ο δάκος υπόκειται σε μια σειρά αλλαγών που ξεκινούν από το αυγό, συνεχίζουν με την προνύμφη (larvae), ακολουθεί το βομβύκιο (pupae) και ο κύκλος ολοκληρώνεται με το ενήλικο άτομο. Όπως αναφέρθηκε, τα θηλυκά έντομα εναποθέτουν τα αυγά τους μέσα σε αναπτυσσόμενους καρπούς ελιάς, χρησιμοποιώντας τον ωοθέτη τους για να τρυπήσουν τη φλούδα του καρπού. Τα αυγά εκκολάπτονται 2-3 μέρες αργότερα και η προνύμφες αρχίζουν να τρέφονται από τον καρπό (Rice, 2000; Nardi et al., 2003). Το στάδιο της προνύμφης, διαρκεί περίπου 20 μέρες (Rice, 2000). Η μετατροπή της προνύμφης σε βομβύκιο μπορεί να συμβαίνει στο έδαφος συνήθως τον χειμώνα και το στάδιο αυτό διαρκεί έως και έξι μήνες, σε αντίθεση με τη μετατροπή που συμβαίνει μέσα στον καρπό και διαρκεί 8-10 μέρες (Vossen et al., 2006).

Ο θηλυκός δάκος μπορεί να εναποθέσει 10-12 αυγά ημερησίως ενώ μπορεί να φτάσει έως και τα 500 αυγά σε όλη τη διάρκεια της ζωής του (Katsoyannos, 1992), η οποία διαρκεί λιγότερο από έξι μήνες, αν και σε ευνοϊκές συνθήκες μπορεί να τους ξεπεράσει (Rice, 2000).

Η ιδανική θερμοκρασία για την ανάπτυξη των δάκνων είναι 20-30°C. Υψηλές θερμοκρασίες της τάξης των 38-41°C είναι θανατηφόρες τόσο για τους ενήλικους δάκνους, όσο και για τις προνύμφες στα φρούτα.

1.2.5 Αναπαραγωγή

Για πολλά χρόνια ο δάκνος της ελιάς θεωρείτο ως ένα έντομο ικανό να αναπαράγεται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, αν οι κλιματικές συνθήκες είναι κατάλληλες και αν υπάρχει διαθεσιμότητα ξενιστών (δηλαδή καρπών ελιάς) (Orphanidis, 1967; Sacantanis, 1957). Όμως, υπάρχει μια περίοδος (τέλος άνοιξης-αρχή φθινοπώρου) αναπαραγωγικής αδράνειας του εντόμου, παρά την καλή θερμοκρασία που επικρατεί (Stavrakis and Fytizas, 1980). Η περίοδος αυτή αποδίδεται στην έλλειψη ξενιστών, δηλαδή καρπών στους οποίους μπορούν να αποτεθούν αυγά (Fletcher, 1978; Fletcher, 1989).

Είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι η ωρίμανση των γεννητικών οργάνων ολοκληρώνεται περίπου τέσσερις ημέρες μετά την εκκόλαψη του ενήλικου ατόμου από το βομβύκιο (Fytizas, 1973). Ο τρόπος προσέλκυσης των εντόμων για αναπαραγωγή, έχει ως εξής: Τα θηλυκά έντομα απελευθερώνουν ένα μίγμα φερομονών που προσελκύει τα αρσενικά άτομα. Η απελευθέρωση των φερομονών αρχίζει από την τρίτη μέρα ζωής του ενήλικου εντόμου και τα αρσενικά μπορούν να αποκριθούν στη φερομόνη από την τρίτη μέρα της ζωής τους, αλλά συνήθως αποκρίνονται μεταξύ έβδομης και ενδέκατης ημέρας. Αξίζει να σημειωθεί ότι, τα αρσενικά σπάνια απορρίπτουν μια ευκαιρία να ζευγαρώσουν, ασχέτως με το πόσες φορές έχουν ήδη συζευχθεί και θα δοκιμάσουν να συζευχθούν ακόμα και αν τα θηλυκά δεν αποκρίνονται ή παρέχουν σήματα απόρριψης (Thornhill and Alcock, 1983). Αντίθετα τα θηλυκά σπάνια ζευγαρώνουν πάνω από δυο φορές στη ζωή τους ενώ μετά από μια σύζευξη, δεν είναι δεκτικά σε νέα σύζευξη για 15-25 ημέρες.

Στη φύση, η προσέλκυση και η σύζευξη γίνονται κατά το τέλος της ημέρας (Cavalloro and Delrio, 1970). Η σεξουαλική ωριμότητα και στα δύο φύλα σηματοδοτείται από αυξημένη κινητική δραστηριότητα, τρίψιμο των ποδιών στην κοιλιά, στα φτερά, στο κεφάλι, στις κεραίες και μεταξύ τους, καθώς και δονήσεις των φτερών στα αρσενικά άτομα (Economidou et al., 1971). Η μέση διάρκεια της σύζευξης είναι περίπου 2,5 ώρες (Economidou et al., 1976).

Στο εργαστήριο, η γονιμότητα των θηλυκών μπορεί να είναι έως και 470 αυγά ανά άτομο που έχει ζευγαρώσει μία φορά. Στη φύση, η γονιμότητα επηρεάζεται από τις κλιματικές συνθήκες, την διαθεσιμότητα σε καρπό ελιάς και την κατάσταση των θηλυκών ατόμων, η οποία εξαρτάται από τη διατροφή τους. Η ιδανική θερμοκρασία για αναπαραγωγή είναι μεταξύ 25-29°C. Σε θερμοκρασίες κάτω από 23°C η αναπαραγωγή μειώνεται σημαντικά ενώ σταματάει εντελώς στους 17°C (Avidon, 1954; Pappas, 2011).

1.3 Βιολογικός έλεγχος πληθυσμών

Όπως ήδη αναφέρθηκε, ο δάκνος της ελιάς μπορεί να προκαλέσει πολύ μεγάλη ζημιά στους ελαιοπαραγωγούς καταστρέφοντας ή υποβαθμίζοντας την ποιότητα των καρπών της ελιάς. Το γεγονός αυτό καθιστά αναγκαίο τον έλεγχο των φυσικών πληθυσμών του εντόμου.

Σήμερα για την καταπολέμηση του δάκου χρησιμοποιούνται ποικίλες μέθοδοι χημικές ή μη, οι οποίες είναι φιλικές ή μη προς το περιβάλλον.

1.3.1 Έλεγχος πληθυσμών με χημικές μεθόδους

Η κυριότερη μέθοδος που εφαρμόζεται σήμερα είναι χημική με τη χρήση συμβατικών εντομοκτόνων με τη μορφή ψεκασμών (Montiel and Jones, 2002). Υπάρχουν δύο τύποι ψεκασμών εντομοκτόνων, οι προληπτικοί (bait sprays) και οι ψεκασμοί κάλυψης (cover sprays) ανάλογα με το αν έχουν ως στόχο τα ενήλικα άτομα του εντόμου, ή τις προνύμφες που βρίσκονται ήδη εντός του καρπού. Στον πρώτο τύπο εκμεταλλευόμαστε τις διατροφικές συνήθειες των ενήλικων εντόμων και χρησιμοποιούμε ως δόλωμα υποστρώματα που προσελκύουν το έντομο όπως προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών αναμεμιγμένα με οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Nadel, 1966; Manousis and Moore, 1987). Επίσης, η χρήση πυρεθροειδών εντομοκτόνων έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια. Με τον τρόπο αυτό ο ψεκασμός γίνεται μόνο σε ένα μέρος του δέντρου με αποτέλεσμα να μην θανατώνονται και χρήσιμα έντομα ενώ πρέπει να σημειωθεί ότι ο χρόνος εφαρμογής αυτών των εντομοκτόνων είναι κρίσιμης σημασίας εφόσον οι ψεκασμοί αυτοί είναι μικρής διάρκειας. Οι προληπτικοί ψεκασμοί αποσκοπούν στην προσέλκυση και θανάτωση των ενήλικων εντόμων πριν αυτά προχωρήσουν στη διαδικασία της ωοαπόθεσης. Έτσι αποφεύγεται η προσβολή του ελαιόκαρπου. Πρόσφατα, το εντομοκτόνο spinosad έχει ενσωματωθεί σε ένα σπρέι που χρησιμοποιείται ως δόλωμα, για αυξημένη αποτελεσματικότητα με λιγότερα ενεργά συστατικά (Wang et al., 2011). Ο δεύτερος τύπος χρησιμοποιεί εντομοκτόνα που δρουν ως προνυμφοκτόνα. Αυτή η μέθοδος, χρησιμοποιούταν ευρύτατα κατά το παρελθόν, ωστόσο σήμερα έχει ατονήσει. Οι ψεκασμοί αυτοί γίνονταν από αέρος, σήμερα όμως γίνονται με τοπικό ψεκασμό. Παρόλα αυτά η συνεχής χρήση των εν λόγω προϊόντων έχει αρχίσει να αμφισβητείται τα τελευταία χρόνια κυρίως από τους οικολόγους. Και αυτό γιατί έχουν ανιχνευθεί υπολείμματα εντομοκτόνων τόσο στο ελαιόλαδο, όσο και στο περιβάλλον όπου καλλιεργούνται οι ελιές (EC, 2010; Daane KM, 2010), ενώ μέσω των ψεκασμών πολλά ωφέλιμα είδη του οικοσυστήματος θανατώνονται (Denholm & Rowland, 1992). Επιπλέον, οι συνεχείς ψεκασμοί είχαν ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ανθεκτικότητας από τα έντομα στα συγκεκριμένα εντομοκτόνα. Η ανθεκτικότητα αυτή οφείλεται σε μεταλλάξεις σε συγκεκριμένα γονίδια που τα καθιστούν ανθεκτικά σε αυτά τα εντομοκτόνα (Vontas et al., 2001; 2002).

Για τον έλεγχο των πληθυσμών του δάκου απαραίτητη προϋπόθεση είναι η παρακολούθηση και η εκτίμηση των φυσικών πληθυσμών. Αυτή γίνεται είτε με τη χρήση διαφόρων παγίδων (παγίδες McPhail, χρωματικές παγίδες όπως φαίνονται στην Εικόνα 8) είτε με δειγματοληψία καρπών. Οι προσπάθειες για τον έλεγχο του δάκου της ελιάς, δελεάζοντάς τους σε συσκευές οι οποίες προκαλούσαν τον θάνατό τους, ξεκίνησαν να εφαρμόζονται από τη δεκαετία του 1960. Οι παγίδες McPhail προσελκύουν τα έντομα με ένα διάλυμα από προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών (Orphanidis et al., 1958). Υπάρχουν επίσης παγίδες, οι οποίες προσελκύουν τα έντομα οπτικά και έχουν κίτρινο χρώμα και ένα κολλώδες υλικό στην επιφάνειά τους (Economopoulos et al., 1977), αλλά όπως έχει τονιστεί, αυτές οι παγίδες μπορεί να προκαλέσουν τον θάνατο και σε ωφέλιμα έντομα τα οποία μπορεί να ανταποκρίνονται στο ερέθισμα (Broumas et al., 1983; Karatos and Fletcher, 1983; Jones, 1987). Από τη στιγμή που ταυτοποιήθηκαν οι φερομόνες του δάκου

(Baker et al., 1980; Mazomenos and Haniotakis, 1981; 1985), έχουν αναπτυχθεί και δοκιμαστεί ως εργαλεία ελέγχου και παρακολούθησης, παγίδες φερομονών (Mazomenos et al., 1983; Ramos et al., 1983; Broumas and Haniotakis, 1987; Montiel-Bueno, 1987; Haniotakis et al., 1987; 1991). Επιπλέον, η δειγματοληψία δίνει άμεσες πληροφορίες για το βαθμό της ζημιάς που έχει γίνει στην παραγωγή, καθώς και έμμεσες πληροφορίες για το μέγεθος του πληθυσμού του εντόμου.



Εικόνα 8 Παγίδες McPhil κίτρινου χρώματος.

1.3.2 Τεχνική στείρου εντόμου (SIT)

Η τεράστια ανάγκη για την εύρεση μεθόδων καταπολέμησης του δάκου με τρόπο ασφαλή προς το περιβάλλον, έδωσε νέα ώθηση στην έρευνα για τον βιολογικό έλεγχο του παρασίτου. Βιολογικός έλεγχος των φυσικών πληθυσμών του εντόμου, μπορεί να συμβεί είτε με έλεγχο των φυσικών εχθρών του εντόμου, είτε με στείρωση ατόμων του πληθυσμού του με σκοπό τον περιορισμό του. Ο βιολογικός έλεγχος του δάκου με φυσικούς εχθρούς, έχει επιχειρηθεί, με μικρή επιτυχία μέχρι σήμερα, αλλά με την προοπτική βελτίωσης μέσω περαιτέρω έρευνας (Borowiec N, 2012; Hoelmer KA, 2011).

Το γεγονός της ύπαρξης υπολειμμάτων εντομοκτόνων στα προϊόντα και στο περιβάλλον έχει προκαλέσει ανησυχία στις περισσότερες χώρες παραγωγής της ελιάς και έχει οδηγήσει σε μια συντονισμένη προσπάθεια να μειωθεί η ποσότητα εντομοκτόνων που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των εντόμων σε ελαιώνες. Έτσι, όπως συνέβη και σε πολλές άλλες γεωργικές καλλιέργειες, έτσι και στην καλλιέργεια της ελιάς, για την αντιμετώπιση επιβλαβών εντόμων έχει αρχίσει να εφαρμόζεται μια νέα εναλλακτική μέθοδος, η μέθοδος της ολοκληρωμένης διαχείρισης παρασίτων (IPM, integrated pest management), που ορίζεται από τον Οργανισμό Βιολογικού Ελέγχου (IOBC) ως μια στρατηγική ελέγχου επιβλαβών εντόμων που συνδυάζει όλες τις μεθόδους σύμφωνες με τις οικονομικές, οικολογικές και τοξικολογικές απαιτήσεις, για να διατηρήσει τα παράσιτα κάτω από το οικονομικό όριο (economic threshold), ενώ δίνει προτεραιότητα σε φυσικούς περιοριστικούς παράγοντες. Η μέθοδος IPM είναι πλέον ευρέως αποδεκτή ως η καλύτερη στρατηγική για την προστασία των καλλιεργειών.

Μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση βιολογικού ελέγχου του δάκου, φιλική προς το περιβάλλον, είναι η τεχνική του στέρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT). Σκοπός της τεχνικής αυτής είναι η μείωση της μέσης γονιμότητας των θηλυκών του είδους, η οποία θα οδηγήσει στην ραγδαία μείωση του μεγέθους του πληθυσμού (Knipling, 1955). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μαζική εργαστηριακή καλλιέργεια ατόμων του είδους, στέρωση μετά από έκθεση σε ακτινοβολία γ των βομβυκίων ή ενηλίκων ατόμων και στη συνέχεια απελευθέρωσή τους (Tsitsipis, 1977; Cavalloro and Delrio, 1973; Cavalloro and Delrio, 1974). Στη φύση, τα θηλυκά έντομα που ζευγαρώνουν με τα στείρα αρσενικά δεν γεννούν απογόνους (στείρα ωτοκία) και το αποτέλεσμα της μεθόδου είναι η σταδιακή μείωση του αριθμού των εντόμων. Ο ανταγωνισμός δηλαδή μεταξύ των στέρων εντόμων που απελευθερώνονται και των άγριων εντόμων για τη σύζευξη με τα θηλυκά, οδηγεί στη μείωση του αναπαραγωγικού δυναμικού. Τις τελευταίες δεκαετίες η SIT εφαρμόστηκε με επιτυχία στην καταπολέμηση εντόμων οικονομικής σημασίας, όπως η μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* (Hendrichs et al., 1983) και η μύγα του πεπονιού *Bactrocera cucurbitae* (Steiner et al., 1965; Ito & Koyama, 1982).

Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε στον δάκο της ελιάς χωρίς όμως επιτυχία τη δεκαετία του 1970 (Economidou et al., 1972). Η αποτυχία της μεθόδου αποδόθηκε στις διαφορές στη φυσιολογία και τη συμπεριφορά σύζευξης μεταξύ των στέρων ατόμων που απελευθερώθηκαν και των φυσικών πληθυσμών. Πιο συγκεκριμένα, τα εργαστηριακά έντομα ωρίμαζαν σεξουαλικά πιο γρήγορα (2-3 ημέρες) σε σχέση με τους άγριους πληθυσμούς που ωρίμαζαν έπειτα από 4-6 ημέρες μετά τη γέννησή τους (Economidou et al., 1971). Επιπλέον προβλήματα παρουσιάστηκαν στην προτίμηση της ώρας σύζευξης με τα εργαστηριακά έντομα να δείχνουν προτίμηση στη σύζευξη 4 ώρες πριν το τέλος της φωτόφασης, ενώ τα άγρια να προτιμούν να ζευγαρώνουν τις 2 τελευταίες ώρες της φωτόφασης (Zervas & Economidou, 1982). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι τα εργαστηριακά έντομα ζευγάρωναν λιγότερες φορές σε σχέση με τα άγρια (Economidou et al., 1972).

Με βάση την κλασική SIT, πραγματοποιείται απελευθέρωση τόσο αρσενικών όσο και θηλυκών ατόμων, ωστόσο έχει γίνει αντιληπτό ότι η εξαπόλυση αποκλειστικά αρσενικών ατόμων είναι προτιμότερη. Αυτό συμβαίνει λόγω του ότι ακόμα και στείρα, τα θηλυκά άτομα είναι ικανά να προκαλέσουν ζημιά στους καρπούς της ελιάς, προκαλώντας νύγματα, ενώ επίσης δρουν ανταγωνιστικά προς τα εργαστηριακά αρσενικά ως προς τη σύζευξη με αποτέλεσμα να περιορίζονται οι συζεύξεις ανάμεσα στα εργαστηριακά αρσενικά και τα άγρια θηλυκά (Whitten, 1969; Fletcher, 1989). Τα προβλήματα αυτά ξεπεράστηκαν σε οργανισμούς στους οποίους ο διαχωρισμός των φύλων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια είναι εύκολος. Αντίθετα, σε οργανισμούς που δεν είναι δυνατός ο καθορισμός του φύλου στα αρχικά αναπτυξιακά στάδια, στους οποίους ανήκει και ο δάκος, τα παραπάνω προβλήματα δεν ήταν εύκολο να λυθούν. Η δυσκολία αυτή έγκειται στο γεγονός ότι στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια δεν υπάρχουν μορφολογικά χαρακτηριστικά που να μπορούν να καταδείξουν τον διαχωρισμό ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά άτομα, όπως για παράδειγμα υπάρχει στα ενήλικα θηλυκά ο ωοθέτης. Ένα ακόμα πρόβλημα που προκύπτει από τη χρήση της κλασικής SIT, είναι ότι λόγω της χρήσης ακτινοβολίας για την πραγματοποίηση της στέρωσης, τα έντομα που υπόκεινται σε αυτή τη διαδικασία δεν είναι ικανά να ανταγωνιστούν τα άγρια αρσενικά. Συνεπώς, κρίνεται απαραίτητη η εύρεση

αποτελεσματικών μεθόδων φυλοδιαχωρισμού και στείρωσης με ελάχιστη έως καθόλου επίδραση στην προσαρμοστικότητα και την ανταγωνιστικότητα των εργαστηριακών αρσενικών εντόμων έναντι στα άγρια.

Για το λόγο αυτό, τα τελευταία χρόνια έχει αρχίσει να εφαρμόζεται μια παραλλαγή της κλασικής SIT, η μέθοδος RIDL (Release of Insects carrying a Dominant Lethal) κατά την οποία εξαπολύονται στη φύση αρσενικά έντομα τα οποία δεν στερώνονται με εφαρμογή ακτινοβολίας. Αντίθετα, δημιουργείται ένα στέλεχος εντόμου που φέρει ένα θνησιγόνο επικρατές γονίδιο το οποίο βρίσκεται σε καταστολή στο εργαστήριο με εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών (χρήση τετρακυκλίνης). Κάτι τέτοιο δεν μπορεί να συμβεί στη φύση και έτσι όταν το έντομο αυτό συζευχθεί με κάποιο άγριο, οι απόγονοι που θα προκύψουν θα είναι ετερόζυγοι ως προς το επικρατές θνησιγόνο, με αποτέλεσμα τον θάνατό τους, αφού δεν θα υπάρχει η τετρακυκλίνη για να διατηρεί σε καταστολή το θνησιγόνο γονίδιο. (Alrhey and Andearsen, 2002). Στον δάκο της ελιάς έχει χρησιμοποιηθεί η συγκεκριμένη τεχνική, με τη δημιουργία ενός διαγονιδιακού στελέχους στο οποίο έχει εισαχθεί ένα θνησιγόνο γονίδιο που προκαλεί το θάνατο των θηλυκών απογόνων όταν βρίσκονται ακόμα στο στάδιο της προνύμφης (Ant et al., 2012).

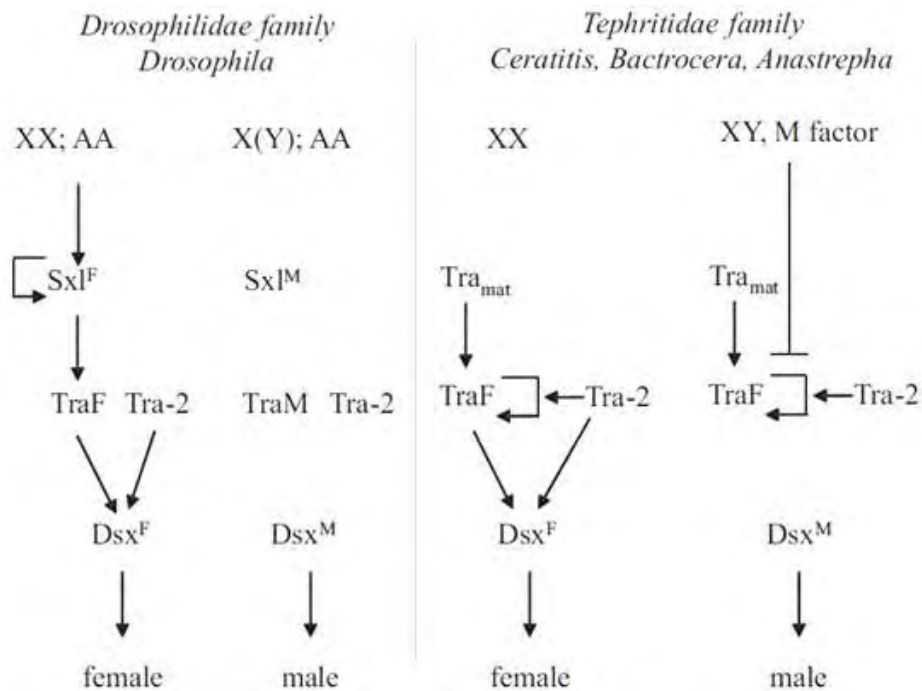
1.4 Φυλοκαθορισμός

Η διαιώνιση ενός είδους μέσω σεξουαλικής αναπαραγωγής είναι κανόνας εντός του ζωικού βασιλείου. Αρσενικά και θηλυκά άτομα παρουσιάζουν διαφορές σε μορφολογικά, φυσιολογικά και επίπεδα συμπεριφοράς. Αυτός ο φυλετικός διμορφισμός απορρέει από την ενοποίηση δυο διαδικασιών: τον φυλοκαθορισμό και τη φυλετική διαφοροποίηση. Ο φυλοκαθορισμός αναφέρεται στο αναπτυξιακό πρόγραμμα βάση του οποίου καθορίζεται αν το έμβρυο θα ακολουθήσει το μονοπάτι θηλυκοποίησης ή αρρενοποίησης. Τα γονίδια που διέπουν αυτό το πρόγραμμα, είναι γνωστά ως γονίδια φυλοκαθορισμού. Η φυλετική διαφοροποίηση αναφέρεται στην έκφραση φυλετικών γονιδίων διαφοροποίησης (που ελέγχονται από τα γονίδια φυλοκαθορισμού), η έκφραση των οποίων προκαλούν τον σχηματισμό φυλετικά διμορφικών δομών που χαρακτηρίζουν τα αρσενικά και τα θηλυκά ενήλικα άτομα (L.Sanchez, 2008).

Ο φυλοκαθορισμός συνήθως βασίζεται σε χρωμοσωμικές διαφορές, με το ένα φύλο να είναι ομομορφικό και το άλλο ετερομορφικό για τα φυλετικά χρωμοσώματα. Αυτό το βλέπουμε και στη *Drosophila*, όπου ο φυλοκαθορισμός βασίζεται στην αναλογία ανάμεσα στα X και στα αυτοσωμικά χρωμοσώματα, με τα θηλυκά να έχουν αναλογία 2X:2A και τα αρσενικά X:2A (όπου το X αντιπροσωπεύει το X χρωμόσωμα και το A για τα απλοειδή αυτοσωμικά χρωμοσώματα). Σε άλλα είδη, το ετερομορφικό φύλο φέρει τους παράγοντες αρρενοποίησης στο Y χρωμόσωμα. Αυτό συμβαίνει στην οικογένεια των Tephritidae (*Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha*) και στους περισσότερους πληθυσμούς της Musca. Σε όλα αυτά τα παραδείγματα, το θηλυκό είναι το ομομορφικό (XX) και το αρσενικό είναι το ετερομορφικό (XY) (L.Sanchez, 2008). Στα περισσότερα είδη, το φύλο κάθε ατόμου καθορίζεται κατά τη γονιμοποίηση όπως συμβαίνει στα: *Drosophila*, *Ceratitis*, *Bactrocera*, *Anastrepha* και *Musca*, η χρωμοσωμική σύσταση του ζυγωτού είναι άμεση συνέπεια της

χρωμοσωμικής σύστασης των γαμετών. Επιπλέον, σε γονιδιακό επίπεδο, το φύλο μπορεί να καθοριστεί από έναν γονιδιακό τόπο ή από πολλούς (Bull, 1983).

Στη *D.melanogaster*, ο φυλοκαθορισμός είναι υπό τον έλεγχο του γονιδίου *Sex lethal (Sxl)* (Cline, 1978; reviewed in Renalva and Sánchez, 2003), (Εικόνα 9). Οι επιστατικές σχέσεις ανάμεσα στο *Sxl* και άλλα γονίδια φυλοκαθορισμού όπως το *transformer (tra)*, το *transformer-2 (tra-2)* και το *doublesex (dsx)* έχουν αποκαλύψει ότι υπάρχει μια ιεραρχική αλληλεπίδραση μεταξύ τους με το *Sxl* στην κορυφή αυτής (Baker and Ridge, 1980). Το συγκεκριμένο γονίδιο έχει βρεθεί και στον δάκο της ελιάς (Lagos et al., 2005) όπου όμως φαίνεται να μην παίζει τον ίδιο σημαντικό ρόλο στο φυλοκαθορισμό όπως στη *Drosophila*. Αντίθετα στον δάκο έχει βρεθεί ο παράγοντας M ο οποίος συνδέεται με το Y και φαίνεται να μπλοκάρει την έκφραση βασικών γονιδίων του φυλοκαθορισμού όπως το *tra* και το *dsx* (Saccone G et al., 2002; Willhoeft U, 1996). Επιπλέον μοριακές προσεγγίσεις, είχαν ως αποτέλεσμα την κατασκευή μιας γονιδιωματικής και δυο cDNA βιβλιοθηκών που προέρχονταν από ενήλικα άτομα δάκου και των δυο φύλων ενώ έγινε και κλωνοποίηση των γονιδίων *Sxl (Sex-lethal)*, *dsx (double sex)* και *tra (transformer)* που εμπλέκονται στον φυλοκαθορισμό του εντόμου (Lagos et al., 2005; Lagos et al., 2007). Η ανάπτυξη τεχνικών και μεθόδων που θα επιτρέπουν τον αποτελεσματικό φυλοδιαχωρισμό σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια εντόμων γεωργικής σημασίας, θα βοηθήσει είναι πολύ σημαντική και θα βοηθήσει στην αποτελεσματικότερη SIT όπως προαναφέρθηκε.



Εικόνα 9 Τα μονοπάτια μεταγωγής σήματος που καθορίζουν το φύλο στις οικογένειες *Drosophilidae* (αριστερά) και *Tephritidae* (δεξιά).

1.5 Υ χρωμόσωμα

Το Υ χρωμόσωμα στα Tephritidae, παρά το γεγονός ότι παρουσιάζει μεταβλητότητα στο μέγεθός του, είναι αναγκαίο για τον προσδιορισμό της ανάπτυξης των αρσενικών ατόμων (Willhoeft U, 1996), ενώ εμφανίζει σαφή μορφολογική διαφοροποίηση σε σχέση με το Χ χρωμόσωμα αλλά και με τα υπόλοιπα αυτοσωμικά (Charlesworth, 1996). Το Υ χρωμόσωμα του δάκου είναι πολύ μικρό, με σχήμα τελείας και υψηλά ετεροχρωματινικό ενώ εμφανίζει πολύ υψηλό ετερομορφισμό σε σχέση με το Χ χρωμόσωμα (Mavragani-Tsipidou P et al., 1992; Mavragani-Tsipidou P et al., 2002). Στο Υ χρωμόσωμα φαίνεται να έχουν συσσωρευτεί μικρές και μεγάλες διαχρωμοσωμικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Gabrieli et al., 2011) Επιπλέον, χαρακτηριστικός είναι ο μικρός αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν λειτουργικές πρωτεΐνες σε σχέση με τα αυτοσωμικά ενώ επίσης είναι και εμπλουτισμένα σε αλληλουχίες χαμηλής πολυπλοκότητας.

Με βάση το μοντέλο που σχεδιάστηκε για το περισσότερο μελετημένο είδος των Tephritidae, την *Ceratitis capitata*, ένας παράγοντας προσδιορισμού των αρσενικών, M (male determining factor, M) που συνδέεται με το Υ χρωμόσωμα μπλοκάρει είτε άμεσα είτε έμμεσα τις ρυθμιστικές λειτουργίες των βασικών γονιδίων φυλοκαθορισμού. Ωστόσο, η μοριακή του φύση και ο ακριβής του ρόλος δεν έχει ακόμα εξακριβωθεί (Saccone et al., 2002). Επιπλέον, το Υ χρωμόσωμα του δάκου φαίνεται να έχει συσσωρεύσει μικρούς και μεγάλους επαναλαμβανόμενους διπλασιασμούς, οι οποίοι δεν είναι κοινοί με το Χ χρωμόσωμα, γεγονός που υποδηλώνει μοριακή διαφοροποίηση μεταξύ αυτών των χρωμοσωμάτων (Gabrieli et al., 2011).

1.5.1 Υ-ειδικά γονίδια

Το Υ χρωμόσωμα στην οικογένεια των Tephritidae είναι απαραίτητο για τον καθορισμό του φύλου. Έτσι, ο χαρακτηρισμός Υ-ειδικών αλληλουχιών, εκτός από τη διευκρίνιση της μοριακής φύσης του παράγοντα προσδιορισμού των αρσενικών, είναι ζωτικής σημασίας και για τον χαρακτηρισμό της μοριακής φύσης των φυλετικών γονιδίων και της εξελικτικής ιστορίας εντός της οικογένειας των διπτέρων ενώ η εύρεσή τους θα μας βοηθήσει επίσης στον επιτυχημένο βιολογικό έλεγχο του εντόμου. Πιο συγκεκριμένα, η εύρεση Υ-ειδικών αλληλουχιών και γονιδίων τα οποία εμπλέκονται στον φυλοκαθορισμό, μπορούν να συμβάλουν στον αποτελεσματικότερο βιολογικό έλεγχο και την SIT. Και αυτό γιατί θα μπορέσουν να δώσουν λύση στο πρόβλημα καθορισμού του φύλου των εντόμων τα οποία βρίσκονται σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα να μπορούν να διαχωριστούν τα αρσενικά από τα θηλυκά τα οποία δεν θέλουμε να εξαπολύουμε κατά τις διαδικασίες βιολογικού ελέγχου καθώς προκαλούν προβλήματα τόσο στους καρπούς όσο και στον ανταγωνισμό κατά το ζευγάρωμα. Αντίθετα, θα μπορούμε εύκολα να επιλέγουμε τα αρσενικά στα οποία στη συνέχεια μπορεί να προκληθεί στειρώση ή να επιδράσουμε σε αυτά διαγονιδιακά και τέλος να τα εξαπολύσουμε στο περιβάλλον.

Επιπλέον, το αυξανόμενο ενδιαφέρον για την κατανόηση της εξελικτικής ιστορίας του Υ χρωμοσώματος των Tephritidae, μπορεί να εξηγηθεί από τις θεμελιώδεις διαφορές στα

μοριακά μονοπάτια φυλοκαθορισμού μεταξύ των *Drosophilidae* και των *Tephritidae*. Το θεμελιώδες ερώτημα είναι κατά πόσο είναι δυνατόν να βρεθεί ένα μοντέλο εξέλιξης του Y το οποίο να μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα χρωμόσωμα στο οποίο ενυπάρχει ο παράγοντας αρρενοποίησης.

Μέχρι στιγμής, οι προσπάθειες για την απομόνωση Y-ειδικών γονιδίων ή αλληλουχιών είχαν ως αποτέλεσμα την απομόνωση μιας Y-ειδικής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας στη μεσογειακή μύγα και ελαχίστων άλλων σε άλλα είδη (Anleitner JE et al., 1992; Zhou Q et al., 2000), αλλά η μοριακή φύση του παράγοντα M παραμένει άγνωστη. Το Y χρωμόσωμα στο συγκεκριμένο είδος περιλαμβάνει πολλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ενώ χαρακτηρίζεται και από τη μεγάλη συσσώρευση μεταθετών στοιχείων (Torti et al., 2000). Επίσης, δεν βρέθηκαν παράγοντες που να σχετίζονται με τη γονιμότητα εκτός της περιοχής αρρενοποίησης στο Y χρωμόσωμα της μεσογειακής μύγας (Willhoeft et al., 1996). Ωστόσο, αυτές οι αλληλουχίες μπορούν να μας παρέχουν ένα χρήσιμο σύστημα για τη μελέτη διαφόρων πτυχών της εξέλιξης των φυλετικών χρωμοσωμάτων.

Η μεγαλύτερη βοήθεια όμως, που θα προσφέρει η μελέτη και η εύρεση Y ειδικών αλληλουχιών, έχει να κάνει με τον παράγοντα αρρενοποίησης (maleness factor). Και αυτό γιατί η ικανότητα αυτού του παράγοντα να καθορίζει το φύλο στην οικογένεια των *Tephritidae* θα φανεί πολύ χρήσιμη στη δημιουργία διαγονιδιακών σειρών εντόμων. Πιο συγκεκριμένα, θα μπορέσουν να δημιουργηθούν διαγονιδιακές σειρές εντόμων στα οποία η έκφραση του παράγοντα θα ελέγχεται από την παρουσία τετρακυκλίνης. Σε αυτά τα έντομα, η ύπαρξη και των δύο φύλων θα διατηρείται παρουσία τετρακυκλίνης, ενώ η απομάκρυνση αυτής από το μέσο ανάπτυξης, θα έχει ως αποτέλεσμα την ύπαρξη μόνο αρσενικών. Θα μπορούμε δηλαδή να χρησιμοποιήσουμε τον παράγοντα αρρενοποίησης ως διακόπτη ο οποίος θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί υπό συγκεκριμένες προϋποθέσεις για τον έλεγχο του φύλου σε εγκαταστάσεις καλλιέργειας εντόμων. Επιπρόσθετα, η εύρεση του παράγοντα αρρενοποίησης θα ρίξει φως στην εξελικτική του πορεία ανάμεσα στα είδη των *Tephritidae* ή ακόμα και στη *D. Melanogaster*.

1.5.2 Το γονιδίωμα του δάκου

Το γενετικό υλικό ενός οργανισμού οργανώνεται σε χρωμοσώματα τα οποία βρίσκονται μέσα στον πυρήνα. Λόγω του ότι η χρωματίνη (μια δομή που αποτελείται από DNA συνδεδεμένο με πρωτεΐνες) μπορεί να αλλάξει τη διαμόρφωσή της κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, οδηγούμαστε εξαιτίας της συσπείρωσης του DNA, στο σχηματισμό διακριτών χρωμοσωμάτων (Moser & Swedlow, 2011). Η χρωματίνη του πυρήνα ενός ευκαρυωτικού κυττάρου που βρίσκεται στη μεσόφαση δεν είναι εντελώς αποσυσπειρωμένη, αντίθετα διακρίνεται σε ευχρωματίνη και ετεροχρωματίνη. Ο καρύοτυπος ενός οργανισμού (Εικόνα 10) αποτελεί τον αριθμό και την εμφάνιση των χρωμοσωμάτων στον πυρήνα ενός ευκαρυωτικού κυττάρου. Τα χρωμοσώματα στον καρύοτυπο εμφανίζονται σε σειρά μειούμενου μεγέθους (White, 1973).

Το γονιδίωμα του δάκου της ελιάς, έχει μέγεθος περίπου 320 Mb (Tsoumani and Mathiopoulos, 2011) και αποτελείται από έξι ζεύγη χρωμοσωμάτων, από τα οποία τα πέντε είναι αυτοσωμικά και το ένα φυλετικό, με το αρσενικό να είναι το ετερογαμετικό φύλο

(Mavragani-Tsipidou et al., 1992; Krimbas, 1963). Τα φυλετικά χρωμοσώματα, που ταυτοποιούνται από το ετερομορφικό ζεύγος χρωμοσωμάτων XX/XY, είναι τα μικρότερα χρωμοσώματα του καρυοτύπου. Το Y χρωμόσωμα είναι πολύ μικρό με σχήμα τελείας (dot like), ενώ το X χρωμόσωμα είναι μικρότερο από όλα τα αυτοσωμικά, με το μέγεθός του να φτάνει το μισό του μικρότερου αυτοσωμικού χρωμοσώματος. Η αναλογία μήκους Y/X είναι 0.20 (Mavragani-Tsipidou, 2002). Για την αρίθμηση του καρυοτύπου ακολουθήθηκε η αντίστοιχη αρίθμηση που έγινε για την *Ceratits capitata* από τον Redu (1975). Με βάση αυτή, το ζεύγος των φυλετικών χρωμοσωμάτων ορίζεται ως νούμερο 1 και τα υπόλοιπα αυτοσωμικά ως 2-6 σε σειρά μειούμενου μεγέθους. Με τη χρήση C-banding τεχνολογιών έχει βρεθεί ότι το Y χρωμόσωμα καθώς και ο μικρός βραχίονας και η κεντρομερική περιοχή του μεγάλου βραχίονα του X χρωμοσώματος, είναι υψηλά ετεροχρωματινικές περιοχές. Το υπόλοιπο μέρος του μεγάλου βραχίονα, αν και η χρώση είναι πιο ελαφριά, δεν φτάνει την έκταση του χρωματιδικού διαχωρισμού που βλέπουμε στα αυτοσωμικά, κάτι που δείχνει ότι αυτή η περιοχή έχει χαρακτηριστικά τόσο ευχρωματινής όσο και ετεροχρωματινής (Mavragani-Tsipidou et al., 1992). Ο αριθμός των έξι ζευγών χρωμοσωμάτων που βρίσκουμε στον δάκο της ελιάς συμφωνεί με τον αριθμό ζευγών που βρίσκουμε και στα περισσότερα έντομα που ανήκουν στην οικογένεια Calytratae, Diptera (Boyes & Brink, 1965).



Εικόνα 10 Καρυότυπος των χρωμοσωμάτων του *Bactrocera oleae* a) από θηλυκή προνύμφη και b) από αρσενική προνύμφη

1.6 Γενετικοί δείκτες

Οι γενετικοί δείκτες είναι ένα εύκολα αναγνωρίσιμο κομμάτι γενετικού υλικού, συνήθως DNA, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο εργαστήριο για να ξεχωρίσουμε κύτταρα, άτομα,

πληθυσμούς, είδη ή όπως στη συγκεκριμένη εργασία το φύλο. Η χρήση γενετικών δεικτών αρχίζει με την απομόνωση πρωτεϊνών ή χημικών (για βιοχημικούς δείκτες) ή DNA (για μοριακούς δείκτες) από τους επιθυμητούς ιστούς. Στη συνέχεια εφαρμόζονται εργαστηριακά πρωτόκολλα, τα αποτελέσματα των οποίων μετατρέπονται σε δεδομένα. Έτσι, οι γενετικοί δείκτες μας επιτρέπουν να χαρακτηρίσουμε τη γενετική ποικιλότητα.

Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη αυτών των δεικτών ήταν η ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών, όπως της χρήσης των ενδονουκλεασών περιορισμού (Meselson and Yuan, 1968), της υβριδοποίησης κατά Southern (Southern, 1975), της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), και γενικά των τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA. Ως πολυμορφισμός ορίζεται η εμφάνιση δύο ή περισσότερων γενετικά καθορισμένων εναλλακτικών φαινοτύπων σε ένα πληθυσμό, σε τέτοια συχνότητα, ώστε ο σπανιότερος δεν θα μπορούσε να διατηρηθεί μόνο με αλληπάλληλες μεταλλάξεις.

Επιπλέον, αξίζει να γίνει αναφορά στους μικροδορυφόρους, οι οποίοι αποτελούν πολύ δυνατούς γενετικούς και μοριακούς δείκτες (Bruford MW et al., 1993; Schottener C et al., 1994; Tautz D et al., 1994). Οι μικροδορυφόροι έχουν χρησιμοποιηθεί στη μεσογειακή μύγα για τον εντοπισμό της προέλευσής της, για τα φαινόμενα εισβολής καθώς και για τον σχεδιασμό στρατηγικών ελέγχου (Bonizzoni M et al., 2000; 2001; 2004) αλλά και για τη γενετική χαρτογράφηση των ειδών (Stratikoroulos EE et al., 2008). Αυτή η δυνατότητα χρήσης των μικροδορυφόρων είναι που τους καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμους στη μελέτη του δάκου της ελιάς, καθώς μετά από αρκετά χρόνια προσπαθειών δεν έχουν βρεθεί κάποιοι μορφολογικοί δείκτες και ως εκ τούτου η ανάπτυξη μεθόδων κλασσικής γενετικής έχει παρεμποδιστεί πλήρως. Επιπλέον, τέτοιοι δείκτες μπορούν να αποδειχθούν πολύ χρήσιμοι στην ανάπτυξη της SIT καθώς θα μπορούσαν να προσφέρουν λύση στο πρόβλημα καθορισμού του φύλου σε έντομα που βρίσκονται στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και που αυτή τη στιγμή καθίσταται αδύνατο να καθοριστεί το φύλο τους.

1.6.1 Εκκινητές

Οι εκκινητές είναι μικρές αλληλουχίες νουκλεϊκών οξέων (περίπου δέκα βάσεων), οι οποίες παρέχουν ένα σημείο εκκίνησης για τη σύνθεση του DNA. Σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, οι εκκινητές είναι μικροί κλώνοι RNA. Οι εκκινητές συντίθενται από το ένζυμο πριμάση, το οποίο είναι μια RNA πολυμεράση, πριν συμβεί η αντιγραφή του DNA. Η σύνθεση των εκκινητών είναι απαραίτητη διότι τα ένζυμα που συνθέτουν το DNA (δηλ. οι DNA πολυμεράσες) μπορούν να προσθέσουν νέα νουκλεοτίδια μόνο σε μια προϋπάρχουσα έλικα DNA. Οι εκκινητές απομακρύνονται πριν την ολοκλήρωση της αντιγραφής και τα κενά στην αλληλουχία συμπληρώνονται με δεοξυριβονουκλεοτίδια από DNA πολυμεράσες. Εργαστηριακά μπορεί να γίνει σχεδιασμός και σύνθεση εκκινητών DNA με εξειδικευμένη αλληλουχία η οποία είναι συμπληρωματική σε μια επιθυμητή για τον ερευνητή. Αυτοί οι DNA εκκινητές έχουν μέγεθος συνήθως περίπου 20 βάσεων και χρησιμοποιούνται για την εκτέλεση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) για την ενίσχυση επιθυμητών κομματιών DNA ή για την αλληλούχιση DNA (Patricia S, 2009). Οι εκκινητές αποτελούν κομβικό κομμάτι της παρούσας εργασίας καθώς με τη χρήση τους, ενισχύουμε Υ-ειδικές αλληλουχίες, σε μια προσπάθεια για την εύρεση Υ-ειδικών γονιδίων που εκφράζονται μόνο σε αρσενικά άτομα και που με περαιτέρω μελέτες μπορούν να μας βοηθήσουν να

φτάσουμε στην εύρεση του παράγοντα αρρενοποίησης (maleness factor). Η διαδικασία ενίσχυσης επιθυμητών αλληλουχιών DNA με τη μέθοδο της PCR περιγράφεται αναλυτικά σε επόμενη ενότητα.

1.5 Σκοπός

Τα θηλυκά έντομα του είδους *Bactrocera oleae* έχουν την ικανότητα να εναποθέτουν τα αυγά τους μέσα σε καρπούς ελιάς, προκαλώντας πολύ μεγάλες ζημιές στην παραγωγή τόσο της επιτραπέζιας ελιάς όσο και του ελαιολάδου. Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στην εύρεση αρρενοειδικών δεικτών στο δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*, με αποτέλεσμα την μοριακή ανίχνευση του φύλου σε άτομα του είδους και κυρίως σε άτομα που βρίσκονται σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, όπως, το αυγό, η προνύμφη και η νύμφη, καθώς η ανίχνευση του φύλου στα στάδια αυτά είναι αυτή τη στιγμή αδύνατη. Ο προσδιορισμός του φύλου στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια είναι πολύ σημαντικός καθώς θα λύσει το βασικό πρόβλημα εφαρμογής της τεχνικής στείρου εντόμου (SIT), δίνοντάς μας την ικανότητα να απελευθερώνουμε μόνο αρσενικά έντομα στο περιβάλλον και όχι θηλυκά τα οποία προκαλούν προβλήματα στους καρπούς και δρουν ανταγωνιστικά για το ζευγάρι με τα εργαστηριακά αρσενικά έντομα. Έτσι, θα έχουμε αποτελεσματικότερο βιολογικό έλεγχο καθώς αφενός θα σταματήσει η χρήση χημικών μεθόδων οι οποίες βλάπτουν το περιβάλλον και αφετέρου δεν θα γίνεται στείρωση με ακτινοβολία η οποία καθιστά τους εργαστηριακούς πληθυσμούς λιγότερο ανταγωνιστικούς σε σχέση με τους φυσικούς.

Από την απομόνωση Υ-ειδικών αλληλουχιών στο γονιδίωμα του *B. oleae*, έγινε ανάλυση μεγάλου αριθμού δεικτών με στόχο τη μετέπειτα χρησιμοποίησή τους για την ταυτοποίηση του φύλου. Οι πληροφορίες που θα συλλέξουμε θα μας βοηθήσουν εκτός από τη βελτίωση της τεχνικής στείρου εντόμου (SIT) και στον προσδιορισμό της μοριακής φύσης του παράγοντα αρρενοποίησης. Η εύρεση του παράγοντα αρρενοποίησης θα καταστήσει δυνατή την κατασκευή διαγονιδιακών σειρών εντόμων στα οποία ο παράγοντας αρρενοποίησης θα λειτουργεί ως διακόπτης ο οποίος θα ενεργοποιείται με εφαρμογή κατάλληλων συνθηκών για την παραγωγή μόνο αρσενικών εντόμων σε εγκαταστάσεις καλλιέργειας και παραγωγής δάκων. Η εύρεση του παράγοντα αρρενοποίησης θα μας δώσει και πληροφορίες ως προς την εξελικτική πορεία των Υ χρωμοσωμάτων στην τάξη των διπτέρων.

Τέλος, θα μπορεί να επιτευχθεί λειτουργική ανάλυση στα αναπτυξιακά στάδια του δάκου για γονιδιακούς τόπους οι οποίοι βρέθηκε ότι είναι Υ-ειδικοί. Από την ανάλυση αυτή θα μπορούμε να συμπεράνουμε σε ποιο στάδιο εκφράζονται αυτοί οι Υ-ειδικοί γονιδιακοί τόποι. Κατά συνέπεια λοιπόν, θα ξέρουμε σε ποια χρονική στιγμή της ζωής του εντόμου εκφράζονται και θα μπορούμε να πραγματοποιήσουμε επιτυχώς αποσιώπηση αυτού του τόπου με την τεχνική RNAi και άρα να δούμε και τη λειτουργία του. Αυτό εκτός από τη θεωρητική γνώση που θα μας προσφέρει σε ότι αφορά τις λειτουργίες γονιδίων του Υ χρωμοσώματος, μπορεί να έχει και πρακτική εφαρμογή σε περίπτωση που τα γονίδια βρεθούν να εμπλέκονται σε μονοπάτια φυλοκαθορισμού ή να σχετίζονται με τη γονιμότητα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Προέλευση εντόμων και συλλογή αυγών

Ο εργαστηριακός πληθυσμός που χρησιμοποιήθηκε για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, εκτρέφεται στο εργαστήριο Μοριακής βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Πρόκειται για αποικία του εργαστηρίου εντομολογίας του ΕΚΕΦΕ "Δημόκριτος" με κωδικό ΑΤ. Τα έντομα εκτρέφονται σε ειδικά ορθογώνια κλουβιά, τα οποία έχουν άνοιγμα στο πάνω και στο κάτω μέρος τους, ενώ στο πάνω άνοιγμα τοποθετείται υγρό σφουγγάρι για την εξασφάλιση των καλών συνθηκών υγρασίας. Το άνοιγμα αυτό διαπερνάει ειδικός κώνος από οργάντζα, ο οποίος είναι εμβαπτισμένος σε παραφίνη. Αυτό το υλικό αποσκοπεί στην προσέλκυση των θηλυκών εντόμων ώστε να εναποθέτουν τα αυγά τους σε αυτό. Τα έντομα εκτρέφονται σε σταθερή θερμοκρασία 23°C με απόκλιση 2 βαθμών και σε ελεγχόμενες και σταθερές συνθήκες σχετικής υγρασίας και φωτοπεριόδου 12:12 (φως:σκοτάδι). Η τροφή των εντόμων παρέχεται σε τρυβλίο petri μέσα στο κλουβί και ανανεώνεται τακτικά (Tzanakakis, 1989; Hagen et al., 1963).

Όπως αναφέραμε, απαραίτητος για τη συλλογή αυγών είναι ο ειδικός κώνος που έχει εμβαπτιστεί σε παραφίνη. Ο κώνος αυτός τοποθετείται αντεστραμμένος στο κλουβί τόσο για την ευκολότερη εναπόθεση των αυγών από τα έντομα όσο και για την ευκολότερη συλλογή τους από εμάς. Τα ενήλικα έντομα έχουν ωριμάσει και είναι ικανά για αναπαραγωγή περίπου την τέταρτη μέρα της ζωής τους. Η συλλογή των αυγών γίνεται συνήθως από την έβδομη μέρα. Τα θηλυκά έντομα διαπερνούν με τον ωοθέτη τους τον κώνο και εναποθέτουν τα αυγά τους στην εσωτερική επιφάνεια αυτού. Η διαδικασία συλλογής έχει ως εξής:

- i) Χρησιμοποιούμε ποτήρι ζέσεως το οποίο τοποθετούμε κάτω από τη βάση του κλουβιού εκεί που βρίσκεται το άνοιγμα του κώνου.
- ii) Ρίχνουμε dH₂O στην κορυφή του κλουβιού στο πάνω άνοιγμα του κώνου με αποτέλεσμα αυτό να συμπαρασύρει τα αυγά που έχουν εναποτεθεί στην εσωτερική του επιφάνεια. Προσέχουμε να ρίξουμε απιονισμένο νερό σε όσο περισσότερη από την εσωτερική επιφάνεια γίνεται ώστε να καθαρίσουμε όλο τον κώνο.
- iii) Στη συνέχεια εμβαπτίζουμε σε προπιονικό οξύ, διηθητικό χαρτί το οποίο τοποθετούμε σε τριβλίο petri.
- iv) Αποχύνουμε την περίσσεια νερού από το ποτήρι ζέσεως αφήνοντας λίγο νερό για να μας βοηθήσει να συλλέξουμε τα αυγά και να τα εναποθέσουμε στο χαρτί.

Να σημειωθεί ότι η χρήση του προπιονικού οξέος είναι απαραίτητη για την προστασία των αυγών από πιθανή ανάπτυξη μυκήτων.

2.2 Απομόνωση RNA και DNA

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του Wizard® Genomic DNA Purification Kit για τα ενήλικα άτομα ενώ για τα αναπτυξιακά στάδια του εντόμου: αυγό, προνύμφη και νύμφη (egg, larva, pupa)

πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του TRI-REAGENT (εταιρία). Απαραίτητη προϋπόθεση για την επιτυχία της απομόνωσης νουκλεϊκών οξέων είναι αρχικά:

- i) η λύση των κυττάρων που επιτυγχάνεται με τη διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης, μηχανικά όπως περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω,
- ii) η απομάκρυνση των πρωτεϊνών και
- iii) η απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος (RNA ή DNA) με κατακρήμνιση.

Για την απομόνωση γονιδιωματικού DNA από τα ενήλικα άτομα, η μεθοδολογία περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1) Προετοιμασία ιστών

Αρχικά, παίρνουμε τους δάκους από το κλουβί όπου γίνεται η εκτροφή τους και τους τοποθετούμε στον πάγο μέχρι να πεθάνουν. Στη συνέχεια. Τους κόβουμε κρατώντας μόνο το κεφάλι και τον θώρακα αλλά όχι την κοιλιά.

2) Λύση και κατακρήμνιση πρωτεϊνών

Τοποθετούμε τα έντομα σε erpendorf και προσθέτουμε 400 μl από DNA lysis solution. Στη συνέχεια, γίνεται ομογενοποίηση αυτών και τοποθέτησή τους σε υδατόλουτρο για 30 min στους 65°C. Μετά το πέρας των 30 λεπτών, τοποθετούνται στον πάγο για 5 min και ακολουθεί πρόσθεση 135 μl από protein precipitation solution (1/3 της ποσότητας του DNA lysis solution που έχουμε προσθέσει στην αρχή. Τέλος, γίνεται φυγοκέντρηση για 5 min σε max speed και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο erpendorf.

3) Κατακρήμνιση και ενυδάτωση του DNA

Στο erpendorf όπου προσθέσαμε το υπερκείμενο στο προηγούμενο βήμα, προσθέτουμε 400 μl ισοπροπανόλης για την κατακρήμνιση. Ανακινούμε ελαφρά και φυγοκεντρούμε σε max speed για 3 min. Στη συνέχεια κρατάμε το ίζημα, πετάμε το υπερκείμενο και προσθέτουμε 500 μl 70% αιθανόλης. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε max speed για 3 min και αφαιρείται προσεκτικά όλο το υπερκείμενο. Τέλος, αφήνουμε για 15 min τα erpendorf ανοιχτά για να εξατμιστούν τα όποια υπολείμματα έχουν απομείνει και προσθέτουμε 100 μl από T-buffer (Tris και EDTA) και ανακινούμε ελαφρά για να διαλυθεί πλήρως το ίζημα. Τα αφήνουμε για μια ώρα σε room temperature και τα βάζουμε στο ψυγείο στους 4°C.

Για την απομόνωση του RNA (Bird IM ,2005) η μεθοδολογία περιλαμβάνει 5 βήματα:

1) Ομογενοποίηση

Αρχικά συλλέγουμε τους ιστούς του εντόμου από τους οποίους θα εξαγάγουμε το RNA και ομογενοποιούμε σε διάλυμα TRI-REAGENT (1ml/50-100 gr ιστού) με χρήση πλαστικού

εμβόλου (pestle) σε μικρά tubes τύπου erpendorf. Να σημειωθεί ότι ο όγκος του δείγματος δεν πρέπει να υπερβαίνει το 10% του όγκου του TRI-REAGENT.

2) Διαχωρισμός φάσης

I) Διατηρούμε το ομογενοποίημα για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (room temperature), ώστε να επιτευχθεί πλήρης αποδιάταξη νουκλεοπρωτεϊνικών συμπλόκων και στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 12000 g για 10 min στους 4°C.

II) Προσθέτουμε 0,1 ml BCP ή 0,2 ml χλωροφόρμιο/1ml TRI-REAGENT, κλείνουμε τα tubes και τα ανακινούμε βίαια για 15 sec.

III) Αφήνουμε τα δείγματα για 2-15 min σε θερμοκρασία δωματίου και τα φυγοκεντρούμε σε 12000 g για 15 min στους 4°C.

IV) Στη συνέχεια, έχουμε τρεις φάσεις από τις οποίες το RNA παραμένει στην άνω, άχρωμη, υδατική φάση ενώ οι πρωτεΐνες και το DNA στη μεσόφαση και την οργανική κάτω φάση. Η υδατική φάση είναι το 60% του TRI-REAGENT που χρησιμοποιήθηκε (Sambrook et al., 1989).

3) Κατακρήμνιση RNA

I) Μεταφέρουμε την υδατική φάση σε νέο tube και διατηρούμε σε πάγο τη μεσόφαση και την οργανική φάση για την απομόνωση DNA και πρωτεϊνών σε επόμενο βήμα.

II) Για την κατακρήμνιση του RNA προσθέτουμε στην υδατική φάση 0,5 ml ισοπροπανόλης / 1ml TRI-REAGENT.

III) Αφήνουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 5-10 min και τα φυγοκεντρούμε σε 12000 g για 8 min στους 4-25°C. Με αυτόν τον τρόπο έχουμε τη δημιουργία ενός λευκού ιζήματος (pellet) στον πάτο του tube λόγω της κατακρήμνισης του RNA.

4) Πλύση RNA

Απομακρύνουμε το υπερκείμενο και πραγματοποιούμε πλύση του RNA pellet με 75% αιθανόλη, προσθέτοντας 1 ml/ 1 ml TRI-REAGENT και στη συνέχεια το φυγοκεντρούμε σε 7500 g για 5 min στους 4-25°C. (Σε περίπτωση που το pellet δεν κατακρημνίζεται, πραγματοποιούμε τη φυγοκέντρηση σε 12000 g).

5) Διαλυτοποίηση RNA

I) Απομακρύνουμε την αιθανόλη και στεγνώνουμε το RNA pellet, αφήνοντας το tube ανοιχτό σε θερμοκρασία δωματίου, για 3-5 min.

II) Τέλος, προσθέτουμε 8 μl H₂O και το αφήνουμε για 10-15 min στους 55-60°C.

Σε ότι αφορά την απομόνωση DNA για δείγματα από τα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια του δάκου (αυγό, προνύμφη και νύμφη) ακολουθήσαμε την παρακάτω μεθοδολογία, η οποία αποτελείται από 3 βήματα:

1) Κατακρήμνιση DNA

I) Στα δείγματα που περιέχουν τη μεσόφαση και την οργανική φάση και έχουμε κρατήσει από προηγούμενο βήμα, απομακρύνουμε την περίσσεια υδατικής φάσης που βρίσκεται πάνω από τη μεσόφαση.

II) Προσθέτουμε 0,3 ml 100% αιθανόλη / 1 ml TRI REAGENT.

III) Αφήνουμε τα δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 min και τα φυγοκεντρούμε σε 2000 g για 5 min στους 4°C.

2) Πλύση DNA

I) Απομακρύνουμε το υπερκείμενο.

II) Πραγματοποιούμε πλύση του DNA pellet δύο φορές με χρήση 1 ml 0,1 M sodium citrate σε 10% αιθανόλη/ 1 ml TRI-REAGENT. Σε κάθε πλύση αφήνουμε το δείγμα για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου με περιοδική ανάδευση και φυγοκεντρούμε σε 2000 g για 5 min στους 4-25°C. Σημείωση: για την παρασκευή 5ml sodium citrate 0,1 M σε 10% αιθανόλη, ζυγίζουμε 0,147 gr σκόνη κιτρικού και στη συνέχεια προσθέτουμε 0,5 ml αιθανόλη 100% και 4,5 ml H₂O.

III) Στη συνέχεια πραγματοποιούμε πλύση στο ίζημα του DNA σε 75% αιθανόλη (1,5-2 ml / 1ml TRI-REAGENT), το αφήνουμε για 10-20 min σε θερμοκρασία δωματίου με περιοδική ανάδευση και το φυγοκεντρούμε σε 2000 g για 5 min στους 4-25°C.

3) Διαλυτοποίηση DNA

I) Απομακρύνουμε την αιθανόλη και στεγνώνουμε το DNA pellet, κρατώντας τα tubes ανοιχτά σε θερμοκρασία δωματίου για 3-5 min.

II) Τέλος, διαλύουμε το DNA pellet σε 8 mM NaOH.

Έτσι, μπορούμε πλέον να χρησιμοποιήσουμε τα RNA και DNA που απομονώσαμε για περαιτέρω ανάλυση.

2.3 Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζης

Η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ανάλυση (προσδιορισμό μεγέθους) μορίων όπως το DNA, το RNA και οι πρωτεΐνες. Και αυτό γιατί η ηλεκτροφόρηση βασίζεται στον διαχωρισμό μορίων με βάση το μέγεθος (μοριακό βάρος) και το φορτίο τους (Sambrook et al., 2001; Jean-Louis Viovy, 2000). Για το διαχωρισμό πρωτεϊνών ή μικρών μορίων (DNA, RNA, ολιγονουκλεοτίδια) χρησιμοποιείται πήκτωμα ακρυλαμίδης ενώ για το διαχωρισμό μεγάλων μορίων νουκλεϊνικών οξέων (περισσότερο των 100bp) χρησιμοποιείται πήκτωμα αγαρόζης. Στη συγκεκριμένη εργασία χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα αγαρόζης. Πιο συγκεκριμένα η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα μετακίνησης των μορίων σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, σύμφωνα με το φορτίο και το μέγεθος τους. Ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται λόγω του ηλεκτρικού πεδίου κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια προς τα θετικά ηλεκτρόδια της καθόδου της ηλεκτροφορητικής συσκευής. Ένας περιοριστικός παράγοντας της ταχύτητας μετακίνησης των μορίων, είναι το μέγεθος των πόρων της πηκτής το οποίο εξαρτάται από

τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα, δηλαδή την πυκνότητα αυτού. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερα είναι τα μόρια τόσο πιο αργά μετακινούνται διαμέσου μικρών πόρων και όσο πιο πυκνό είναι το πήκτωμα, τόσο πιο μικροί είναι οι πόροι. Ένας ακόμη παράγοντας που επηρεάζει την κινητικότητα των μορίων που ηλεκτροφορούνται είναι η τάση του ρεύματος που εφαρμόζεται. Ο εντοπισμός των νουκλεϊκών οξέων γίνεται με τη χρώση τους με βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια ουσία η οποία δημιουργεί σύμπλοκα με τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων και εκπέμπει φθορισμό όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία. Τέλος απαραίτητη είναι η ύπαρξη ενός μάρτυρα (ladder) γνωστού μοριακού βάρους ώστε να μπορεί να γίνει η σύγκριση με τα τμήματα που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων μας (Sambrook et al., 1989). Τα βήματα που ακολουθούνται για την επίτευξη της ηλεκτροφόρησης μορίων σε πηκτή αγαρόζης έχουν ως εξής:

- Παρασκευή πηκτώματος
 1. Ετοιμάζουμε το καλούπι για την παρασκευή του πηκτώματος και τοποθετούμε τα χτενάκια.
 2. Σε μια κωνική φιάλη προσθέτουμε TBE 0,5% και αγαρόζη τα οποία υπολογίζουμε ανάλογα με το πόσο πυκνό θέλουμε να είναι το gel που θα παρασκευάσουμε. Για την παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης 1%, προσθέτουμε 100 ml TBE και 1 gr αγαρόζη.
 3. Πριν ξεκινήσουμε τη θέρμανση της κωνικής φιάλης, τη ζυγίζουμε έτσι ώστε μετά το πέρας της θέρμανσης να αναπληρώσουμε τη διαφορά στο βάρος με απιονισμένο νερό.
 4. Θερμαίνουμε την κωνική φιάλη μέχρι η αγαρόζη να διαλυθεί πλήρως μέσα στο TBE.
 5. Στη συνέχεια, προσθέτουμε το βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ εφόσον πρώτα μειωθεί σημαντικά η θερμοκρασία του (κρυώνουμε με βύθιση σε κρύο νερό).
 6. Τέλος, αδειάζουμε προσεκτικά στο καλούπι και απομακρύνουμε τυχόν φυσαλίδες.

- Ηλεκτροφόρηση
 1. Προετοιμάζουμε τα δείγματα προς ηλεκτροφόρηση με την προσθήκη σε αυτά loading buffer 6X (προσθέτουμε 1 μl loading buffer / 6 μl δείγματος). Το loading buffer περιέχει και γλυκερόλη. Το διάλυμα αυτό επιτρέπει στο DNA να τοποθετηθεί στα πηγαδάκια και να μην διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, ενώ η χρωστική επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.
 2. Σε ένα από τα πηγαδάκια θα τοποθετηθεί ο ladder (GeneON).
 3. Στη συνέχεια τοποθετούμε το πήκτωμα αγαρόζης μέσα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης την οποία γεμίζουμε με TBE 0,5X μέχρι το διάλυμα να καλύψει όλο gel και τα πηγαδάκια.
 4. Στη συνέχεια φορτώνουμε όλα τα δείγματα και τον μάρτυρα στα πηγαδάκια και συνδέουμε τα ηλεκτρόδια στη συσκευή εφαρμόζοντας τάση 100V για περίπου 50 min.

5. Τέλος, με την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εκτίθεται σε UV ακτινοβολία με αποτέλεσμα οι ζώνες που δημιουργήθηκαν από τη μετανάστευση των μορίων να είναι πλέον ορατές.

2.4 Ποσοτικοποίηση DNA

Η ποσοτικοποίηση του DNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση (Tweedie and Stowell, 2005). καθώς και με το Qubit kit. Στην πρώτη περίπτωση, έγινε η ηλεκτροφόρηση δείγματος που περιείχε 5 μl DNA που θέλουμε να ποσοτικοποιήσουμε, χρωστική loading buffer 6X και τέλος, σύγκριση με μάρτυρα γνωστού μοριακού βάρους. Για την ποσοτικοποίηση με το Qubit kit, αρχικά παρασκευάζουμε tubes με 200 μl working solution, που αποτελείται από 199 μl Qubit buffer και 1 μl reagent. Στη συνέχεια δημιουργούμε δυο διαλύματα standard 1 και standard 2, τα οποία αποτελούνται από 10 μl standard και 190 μl working solution. Τέλος, παρασκευάζουμε τα δείγματα τα οποία θα έχουν 1 μl δείγματος και 199 μl working solution. Έτσι, τοποθετούμε στη συσκευή αρχικά τα δυο standard διαλύματα και στη συνέχεια τα δείγματα προς ποσοτικοποίηση και παίρνουμε το αποτέλεσμα από τη μέτρηση. Είναι σημαντικό πριν τοποθετήσουμε τα δείγματα να έχει προηγηθεί vortex για 2-3 sec καθώς και επώαση των δειγμάτων για 2 min σε room temperature.

2.5 Επίδραση με DNase και σύνθεση cDNA

Η δεοξυριβονουκλεάση (DNase) είναι ένα ένζυμο που καταλύει την υδρόλυση φωσφοδιεστερικών δεσμών στο DNA με αποτέλεσμα την αποδόμησή του (Kunitz, 1950). Στη συγκεκριμένη περίπτωση λοιπόν, η DNase χρησιμοποιείται για την αποδόμηση των υπολειμμάτων DNA από την απομόνωση RNA, έτσι ώστε να μην υπάρχει παρεμβολή DNA κατά τη σύνθεση του cDNA. Το cDNA είναι ένα μόριο που προκύπτει από ολικό ώριμο mRNA, το οποίο λειτουργεί ως εκμαγείο για τη σύνθεση συμπληρωματικού DNA με τη χρήση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (Cooper et al., 2007; Croy, 1998). Η μεθοδολογία που ακολουθείται για τη σύνθεση του cDNA με την βοήθεια και της DNase (Ambion) έχει ως εξής:

1. Δημιουργούμε διάλυμα με:

Για νύμφη και προνύμφη	Για αυγό
18 μl RNA	10 μl RNA
2,5 μl DNase buffer	2,0 μl DNase buffer
1,0 μl DNase	1,0 μl DNase
3,5 μl H ₂ O	7,0 μl H ₂ O

Αφού το παρασκευάσουμε, το αφήνουμε στους 37°C για 25 min.

2. Προσθέτουμε 2,5 μl inhibition buffer, το αφήνουμε για 5 min σε room temperature με παράλληλη ανάδευση και τέλος, το φυγοκεντρούμε σε 10000 g για 5 min και μεταφέρουμε το υπερκείμενο σε νέο tube.

3. Στη συνέχεια παίρνουμε 18 μl από το παραπάνω δείγμα (10 μl για egg) και προσθέτουμε 1,0 μl από Random Primers (300 ng) και 1,0 μl H₂O και το αφήνουμε για 10 min στους 70°C και στη συνέχεια για 5 min στον πάγο.
4. Τέλος, για τη σύνθεση του cDNA προσθέτουμε σε ένα tube:
 - 2,0 μl 10X Buffer
 - 1,0 μl dNTPS 2,5 mM each
 - 1,0 μl RNase Inhibitor
 - 1,0 μl MMLUV Reverse Transcriptase
 - 15,0 μl H₂O
5. Γίνεται μίξη των δυο διαλυμάτων.

Αφήνουμε το διάλυμα στους 45°C για 45 min και στη συνέχεια στους 70°C για 10 min. Οι ιστοί είναι έτοιμοι για να πραγματοποιήσουμε Real Time PCR.

2.6 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια εύχρηστη *in vitro* τεχνική που επιτρέπει την ενίσχυση και τον πολλαπλασιασμό ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, με δεδομένο ότι είναι γνωστή η νουκλεοτιδική του αλληλουχία. Η γνώση της αλληλουχίας του τμήματος που θέλουμε να ενισχύσουμε είναι απαραίτητη για τον σχεδιασμό των εκκινητών, οι οποίοι είναι δυο πλευρικές αντιπαράλληλες ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες-, που χρησιμεύουν ως εναρκτήρια μόρια της σύνθεσης συμπληρωματικών αλυσίδων από ένα εκμαγείο DNA. Επίσης, απαραίτητη είναι η χρήση μιας ειδικής DNA πολυμεράσης, που καταλύει τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων, παρουσία περίσσειας δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs 2,5 mM each). Αυτή η DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση) που χρησιμοποιείται είναι βακτηριακής προέλευσης καθώς απομονώνεται από το βακτήριο *Thermus Aquaticus* για να μπορεί να αντέξει στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται (έως και 95°C) για να λειτουργήσει κατά τη διαδικασία της PCR. Επιπλέον, για να επιτύχει η διαδικασία της PCR απαραίτητη είναι η χρήση περίσσειας δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs 2,5 mM each) για να χρησιμοποιηθούν από την taq για τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων, καθώς και το ειδικό ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου (buffer) ενώ τέλος προστίθεται αποστειρωμένο νερό για τη συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης (συνήθως 20 μl). Ένας πλήρης κύκλος PCR περιλαμβάνει τρία στάδια:

- Αποδιάταξη του DNA (denaturation)
- Προσαρμογή των εκκινητών στο DNA εκμαγείο (annealing)
- Επιμήκυνση των εκκινητών (extension).

Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, προσαρμογής και επιμήκυνσης των εκκινητών από την πολυμεράση πραγματοποιούνται σε ειδική PCR συσκευή, η οποία είναι γνωστή ως θερμικός κυκλοποιητής (thermal cycler), που προγραμματίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα που εμείς

ορίζουμε. Ως αποτέλεσμα της διαδικασίας, η αρχική ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά, αφού διπλασιάζεται στο τέλος κάθε κύκλου. Με τον τρόπο αυτό μετά την ολοκλήρωση η κύκλων η αρχική αλληλουχία θα έχει πολλαπλασιαστεί 2^n φορές.

Σε μια τυπική αντίδραση, το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C . Στη συνέχεια οι εκκινητές σε περίσσια υβριδίζονται στις συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA εκμαγείου με ψύξη του δείγματος στους $50^{\circ} - 60^{\circ}\text{C}$. Η θερμοκρασία αυτή ρυθμίζεται στο σημείο τήξης (T_m) των εκκινητών. Ακολουθεί επώαση στους 72°C για την επιμήκυνση των εκκινητήρων από την θερμοανθεκτική ταq πολυμεράση, παρουσία περίσσειας των τεσσάρων νουκλεοτιδίων (dNTPs 2,5mM each). Τέλος, τα προϊόντα κάθε κύκλου, λειτουργούν ως μήτρες του επόμενου κύκλου και η διαδικασία επαναλαμβάνεται με την εκθετική αύξηση των νέων δίκλωνων αλυσίδων DNA. Τα προϊόντα ενίσχυσης που προκύπτουν από την παραπάνω αντίδραση αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης όπως αναλύθηκε παραπάνω (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988).

Η μέθοδος για την επίτευξη της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) είναι ως εξής:

Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται οι εξής ποσότητες για τη σύσταση μιας τυπικής PCR:

DNA (40 ng/μl)	1 μl
PCR buffer 10X	2 μl
dNTPs (2,5 mM each)	0,4 μl
Εκκινητής forward (10 pmol/μl)	0,7 μl
Εκκινητής reverse (10 pmol/μl)	0,7 μl
Τaq πολυμεράση (5U/μl)	0,2 μl
dH₂O	15 μl
Τελική ποσότητα	20 μl

Στη συνέχεια τα σωληνάκια προστίθενται στον θερμικό κυκλοποιητή και ακολουθείται η εξής διαδικασία :

- Αρχική αποδιάταξη: $94^{\circ}\text{C} \rightarrow 3 \text{ min}$
 - Αποδιάταξη: $94^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$
 - Υβριδισμός: T_m εκάστωτε εκκινητή $\rightarrow 30 \text{ sec}$
 - Επιμήκυνση: $72^{\circ}\text{C} \rightarrow 30 \text{ sec}$
 - Τελική επιμήκυνση: $72^{\circ}\text{C} \rightarrow 5 \text{ min}$
- } Για 30 κύκλους

2.6.1 Re-PCR (Repeat PCR)

Η μέθοδος re-PCR αποτελεί ουσιαστικά μια τυπική μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) η οποία επαναλαμβάνεται και δεύτερη φορά με χρήση ως template του προϊόντος από την πρώτη PCR. Η re-PCR γίνεται για να ενισχύσουμε ακόμα περισσότερο ένα τμήμα DNA όταν αυτό δεν έχει ενισχυθεί στον επιθυμητό βαθμό από την τυπική PCR (Comi et al., 1997).

Όπως είπαμε η διαδικασία είναι παρόμοια με την τυπική PCR, έτσι αρχικά σε ένα σωληνάκι τύπου erpendorf προσθέτουμε τις ίδιες ποσότητες όπως και παραπάνω.

Στη συνέχεια εκτελούμε νέα PCR με τις εξής ποσότητες:

DNA (40 ng/μl) (Ως δείγμα DNA παίρνουμε δείγμα από την PCR που μόλις εκτελέσαμε)	2 μl
PCR buffer 10X	2 μl
dNTPs (2,5 mM each)	0,4 μl
Εκκινητής forward (10 pmol/μl)	0,7 μl
Εκκινητής reverse (10 pmol/μl)	0,7 μl
Ταq πολυμεράση (5U/μl)	0,2 μl
dH₂O	14 μl
Τελική ποσότητα	20 μl

Στη συνέχεια επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία έχοντας ως δείγμα DNA 1 μl από την PCR που μόλις εκτελέσαμε.

2.7 PCR πραγματικού χρόνου (Real Time PCR)

Η PCR πραγματικού χρόνου είναι μια μέθοδος που βασίζεται στην τυπική αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης και επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών στόχων. Επίσης, η real time PCR μπορεί να μας δώσει δεδομένα για τη γονιδιακή έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων που μας ενδιαφέρουν. Στη real time PCR σε αντίθεση με την τυπική PCR, η διαδικασία ενίσχυσης του τμήματος της αλληλουχίας που μας ενδιαφέρει, καταγράφεται κατά τη διάρκεια όλης της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού μιας φθορίζουσας ουσίας σε κάθε κύκλο, στη συγκεκριμένη περίπτωση της SYBR green. Η χρωστική αυτή προσδένεται στα δίκλινα μόρια του DNA με

αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση του προϊόντος που παράγεται. Η ποσοτικοποίηση προκύπτει από τη χρήση μιας πρότυπης καμπύλης η οποία δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων (Higuchi et al., 1992; Bustin SA, 2000; Kubista et al., 2006).

Η μέθοδος που ακολουθείται έχει ως εξής:

- Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται από :
 - SYBR που λειτουργεί ως ρυθμιστικό διάλυμα ενώ περιέχει και το ένζυμο
 - Εκκινητή forward 150 nM
 - Εκκινητή reverse 150 nM
 - dH₂O για να πληρώσει το υπόλοιπο της αντίδρασης η οποία συνήθως είναι 15 μl
 - 1μl του επιθυμητού δείγματος DNA
- Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή και έχουμε την αντίδραση στις ακόλουθες συνθήκες:
 1. Επώαση στους 50°C → για 2 min
 2. Αρχική αποδιάταξη στους 95°C → για 3 min
 3. Αποδιάταξη στους 95°C → για 10 sec
 4. Υβριδισμός στους 55°C → για 20 sec
 5. Επιμήκυνση στους 72°C → για 30 sec- 6. Τέλος, έχουμε τη σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από 55-95°C κατά 0,5°C ανά 5 sec για το σχηματισμό της καμπύλης τήξης (melt curve).

2.8 Σχεδιασμός και έλεγχος εκκινητών

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, οι εκκινητές είναι μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες οι οποίες σχεδιάζονται με τέτοιο τρόπο, ώστε να υβριδίζονται με υψηλή εξειδίκευση εκατέρωθεν των τμημάτων που θέλουμε να ενισχύσουμε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Οι εκκινητές σχεδιάζονται και στη συνέχεια ελέγχονται για το αν ενισχύουν την αλληλουχία του αναμενόμενου μεγέθους. Ο έλεγχος αυτός γίνεται με PCR και με ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Ο σχεδιασμός των εκκινητών επιτεύχθηκε με τη χρήση του προγράμματος Primer-BLAST(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome). Για τον σχεδιασμό χρησιμοποιήθηκαν αλληλουχίες από male specific scaffolds που προέκυψαν έπειτα από σύγκριση αρσενικών και θηλυκών ατόμων δάκου.

	F	R	Size (bp)
Sc 67702	CTGCCATTATTAGCTTGG	CGAACTTATAGACGGATATG	100
Sc 27532	ATGTTATACAGCGTCTCAG	ATGCGTGCACTTTACTTG	463
Sc 6617	TAGTCTAACGGTGGAAACC	TTTATAGTAAGGGGAAGCAG	252
Sc 23723	ACAAGCGAAGAAGAAGAG	AACAGCCTAGAACTTAGG	303
Sc 6873 reg 4	TTCAGGGTACGGCTTTTACA	TTATGAAAACACCAGCACCGA	100
AB12	ACCATGCGACGGAACATCTT	CCTGCACATCCGAGTTACCA	103
Y-importin	CAGCTCTGCAATGAATTTCCG	ATGGCCTCATTTTCGTTTTCC	106

Sc 2952	GGAAGTGATATTCCAAAGTG	AAGTTCGTGCCAAACATAG	500
Sc 3738	GCACACACACATACATAGTTC	GTGATTACCATCTTTTCCTG	523
Sc 6626	TTAGATAGACTCAGGGAACG	AATTGAAGTGTAGGCAGAG	500
Sc 6131	AGACGTTTTCGAGTATGTTG	TGAAGAATGGACTGGATG	500
Sc 4074	CCAGCACTGTTTCGTTTCGTG	CCTGCGAGATACCATTGCGA	341
Sc 30487	CCGTTATGTGGACGTAACCTGA	TCACTCAATTGATGGTGGGGA	237
Sc 6873 reg1	CCCGCGACAGCAATACATTT	CCACCTCGGCTTTGCAATTG	113
Sc 30951	AACAGATTTTCAGCGTCAC	GTGATAGTGTATTAGTGGTGGTG	194
Sc 42650	TGAAATTACCTCTCGTTGG	AAGTATCGCATGATGTGC	131
Sc 6873 reg5	ATGCGATATCATGGCCAGCA	ACAATGTGATTGGCTGGCAG	184
Rpl19	CTTCACGTACTTTATGCCTTC	GCAAGGGTAATGTGTTCAA	126
14-3-3zeta	GTCTTCTCGACAAACACC	CCACCTCAGCTAAATACC	102

Πίνακας 3. Στον παραπάνω πίνακα αναγράφονται τα ονόματα και οι αλληλουχίες των 17 ζευγών εκκινητών (forward και reverse) και των δύο housekeeping genes που χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και το μέγεθος των βάσεων που αυτά ενισχύουν.

Η επιλογή των κατάλληλων εκκινητών είναι σημαντική καθώς οι τυπικοί εκκινητές έχουν μήκος 20-25 νουκλεοτίδια, περιεκτικότητα σε βάσεις G,C περίπου 20-60%, και $T_m = 55$. Ενώ, δεν πρέπει να έχουν συμπληρωματικά άκρα, ούτε συμπληρωματικές μεταξύ τους περιοχές για να αποτραπεί η ενίσχυση μη επιθυμητών τμημάτων DNA. Για τον έλεγχο των εκκινητών έγινε PCR και ηλεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης. Τα ζεύγη εκκινητών που ενισχύουν τμήματα DNA του αναμενόμενου μεγέθους, επιλέχθηκαν για να χρησιμοποιηθούν σε περαιτέρω αναλύσεις. Επίσης, πριν τον εργαστηριακό έλεγχο και κατά τη σχεδίαση των εκκινητών, γίνεται μια προσομοίωση του τμήματος που ενισχύεται με το διαδικτυακό τόπο blast για να δούμε αν μέσω βιοπληροφορικής προκύπτει ενίσχυση μόνο του συγκεκριμένου γονιδίου και όχι και άλλων γονιδίων που μοιάζουν στην αλληλουχία με αυτό.

2.9 Λειτουργική ανάλυση σε αναπτυξιακά στάδια και στο αναπαραγωγικό σύστημα αρσενικών ατόμων δάκου

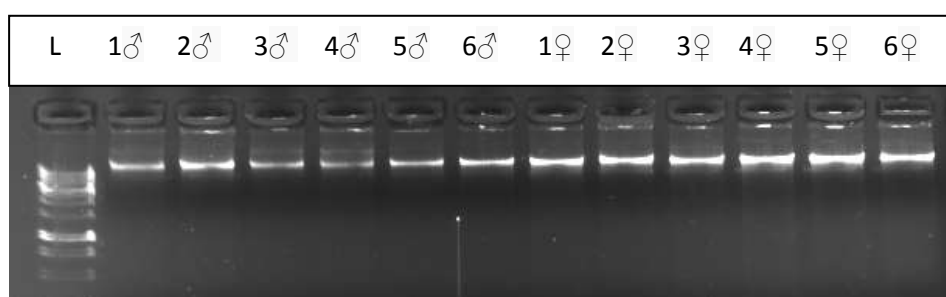
Για να επιτευχθεί η δημιουργία προφίλ έκφρασης των δυο αρρενοειδικών γονιδιακών τόπων, AB12 (ιμπορτίνη) και Sc 6873 reg4 (smoothelin), στα αναπτυξιακά στάδια του δάκου της ελιάς *B.oleae*, πραγματοποιήθηκε λειτουργική ανάλυση με Real Time PCR. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε Real time PCR σε δείγματα από αυγά, προνύμφες, νύμφες και στάδια ενηλίκου του είδους για κάθε έναν από δυο δείκτες οι οποίοι βρέθηκαν να είναι Υ-ειδικοί. Για τη λειτουργική ανάλυση των δυο αυτών γονιδίων σε κάθε αναπτυξιακό στάδιο χρησιμοποιήσαμε housekeeping genes, τα οποία αποτελούν γονίδια που απαιτούνται για την υποστήριξη των βασικών κυτταρικών λειτουργιών, με αποτέλεσμα να εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα ενός οργανισμού υπό φυσιολογικές συνθήκες (Butte, AJ., et al., 2001). Τα γονίδια αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν εμφανίζονται στον πίνακα 3 και προέρχονται από προηγούμενη μελέτη του εργαστηρίου (Sagri et al., 2014a, b). Ο λόγος που χρησιμοποιούνται housekeeping genes είναι για να διορθωθούν οι μη ειδικές διακυμάνσεις, όπως οι διαφορές στην ποιότητα και την ποσότητα του RNA που χρησιμοποιήθηκε και οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της

αντίστροφης μεταγραφής και ως εκ τούτου όλη τη διαδικασία της real time PCR (Brunner, 2004). Στη συνέχεια, για την επεξεργασία και την ανάλυση των αποτελεσμάτων των real time PCRs, έγινε κανονικοποίηση (normalization) των δεδομένων μέσω του λογισμικού προγράμματος BIORAD CFX software. Η κανονικοποίηση της έκφρασης του γονιδίου στόχου γίνεται σε σχέση με την έκφραση του γονιδίου αναφοράς, διότι με αυτόν τον τρόπο αντισταθμίζεται η όποια διαφορά μπορεί να υπάρχει στην ποσότητα του ιστού ανάμεσα στα δείγματα που ελέγχονται. Τα αποτελέσματα λοιπόν που παίρνουμε, έχουν να κάνουν με την αύξηση ή μείωση της έκφρασης του γονιδίου στόχου σε σχέση με τη σταθερή έκφραση του γονιδίου αναφοράς.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Ποσοτικοποίηση DNA

Όπως ήδη αναφέρθηκε παραπάνω, πραγματοποιήθηκε απομόνωση DNA από αρσενικά και θηλυκά άτομα *Bactrocera oleae* μέσω του DNA extraction kit και στη συνέχεια προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του DNA στα άτομα αυτά. Ο ποιοτικός έλεγχος των DNA πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση (Εικόνα 11). Η ποσοτικοποίηση επιβεβαιώθηκε με τη μέθοδο Qubit. Σε γενικές γραμμές, τα αποτελέσματα των δυο μεθόδων συμφωνούν μεταξύ τους, καθώς είναι φανερό μέσω της ηλεκτροφόρησης ότι τα θηλυκά άτομα έχουν μεγαλύτερη ποσότητα DNA λόγω της πιο έντονης ζώνης που εμφανίζουν στην ηλεκτροφόρηση η οποία είναι ανάλογη με την ποσότητα του DNA που ηλεκτροφορείται. Αντίστοιχα, μεγαλύτερη ποσότητα DNA για τα θηλυκά μας προκύπτει και από τη μέθοδο Qubit η οποία είναι πιο εξειδικευμένη δίνοντάς μας ακριβώς την ποσότητα DNA που υπάρχει σε ένα δείγμα.



Εικόνα 11 Ποσοτικοποίηση DNA με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης 1% (L: Ladder, ♂:Males, ♀:Females).

	Males (ng/μl)	Females (ng/μl)
1	4,86	12,3
2	7,17	10,4
3	4,28	7,43
4	6,43	9,01
5	7,30	9,48
6	9,23	6,23

Πίνακας 4 Ποσοτικοποίηση του DNA από 12 δείγματα ατόμων *Bactrocera oleae*, με τη μέθοδο Qubit.

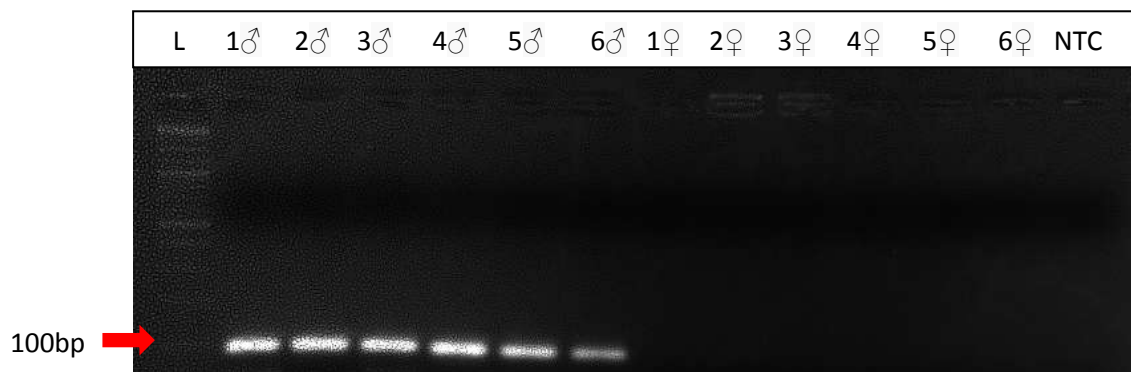
Στη συνέχεια έγιναν αραιώσεις με σκοπό να επιτευχθεί η ίδια συγκέντρωση DNA για το κάθε δείγμα και να μην έχουμε μεγάλες αποκλίσεις στα αποτελέσματα της real time PCR τα οποία μπορεί να οφείλονται σε διαφορετικές συγκεντρώσεις DNA ανάμεσα στα δείγματα. Τα δείγματα αυτά στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αρρενοειδικότητας εκκινητών μέσω της μεθόδου PCR.

3.2 Ενίσχυση με PCR σε 17 αρρενοειδικούς γενετικούς τύπους του είδους *B. oleae*

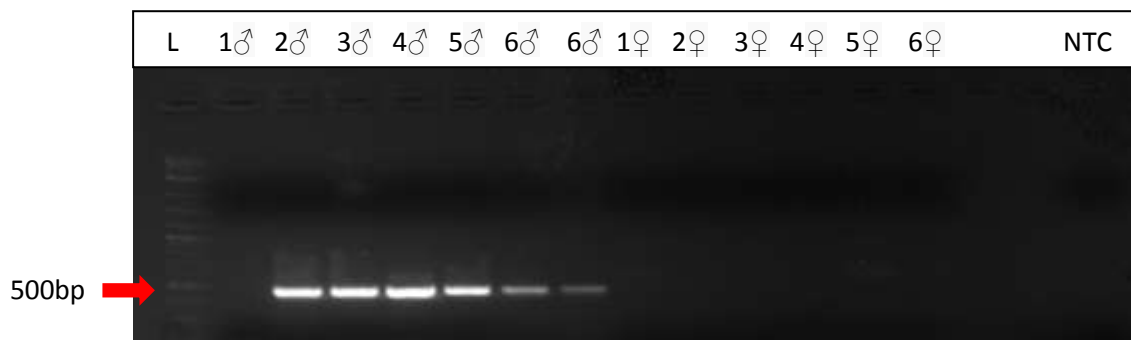
Συνολικά, μελετήθηκαν 17 γενετικοί τύποι, οι οποίοι προέρχονται από male specific scaffolds που προέκυψαν έπειτα από σύγκριση ανάμεσα σε αρσενικά και θηλυκά άτομα δάκου. Στους 17 αυτούς γενετικούς τύπους, πραγματοποιήθηκαν αντιδράσεις PCR και στη συνέχεια ηλεκτροφορήσεις σε πηκτή αγαρόζης με σκοπό να ελεγχθεί κατά πόσο οι γονιδιακοί τύποι που ελέγξαμε είναι Y-ειδικοί. Για τις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιήθηκαν 6 αρσενικά και 6 θηλυκά άτομα, ειδικού μεγέθους ladder (μάρτυρας) για την εκτίμηση του μεγέθους που ενισχύεται καθώς και ένα αρνητικό control για τον εντοπισμό τυχόν επιμολύνσεων. Τα αποτελέσματα ενίσχυσης από τα 17 ζεύγη εκκινητών, παρουσιάζονται στις παρακάτω εικόνες ενώ στον πίνακα που ακολουθεί αναγράφονται, τα γονίδια και οι πρωτεΐνες, που βρέθηκαν να έχουν μεγάλη ομολογία με τον κάθε αρρενοειδικό εκκινητή που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, εκτός από τον Y-importin, ο οποίος έχει δείχθει ότι αντιστοιχεί στο γονίδιο της ιμπορτίνης, από προηγούμενη εργασία (Gabrieli et al., 2011).

	primer	Ομόλογο γονίδιο	E-value
1	Sc67702	Μιτοχονδριακή NADH-ουβικινόνη	0,060
2	Sc27532	Πρωτεΐνη af-10	2e-04
3	Sc6617	Γονίδιο eve	2e-06
4	Sc 23723	Πρωτεϊνική κινάση Ser/thr	0,24
5	Sc 6873 reg4	Smoothelin	2,6
6	AB12	Ιμπορτίνη-4	0,22
7	Sc 2952	Γονίδιο ovoA	0,41
8	Sc 3738	Histone-lysine N- μεθυλοτρανσφεράση	6e-09
9	Sc 6626	Πεψίνη	2e-11
10	Sc 6131	uncharacterized	4e-08
11	Sc 4074	Ελικάση	1e-08
12	Sc 30487	Γονίδιο για κυτοχρωμική οξειδάση	0,051
13	Sc 6873 reg 1	Ελικάση	2e-05
14	Sc 30951	Cuticle protein 16.5	0,048
15	Sc 42650	Βαριά αλυσίδα δυνεΐνης 5	0,72
16	Sc 6873 reg 5	Ελικάση	1e-14

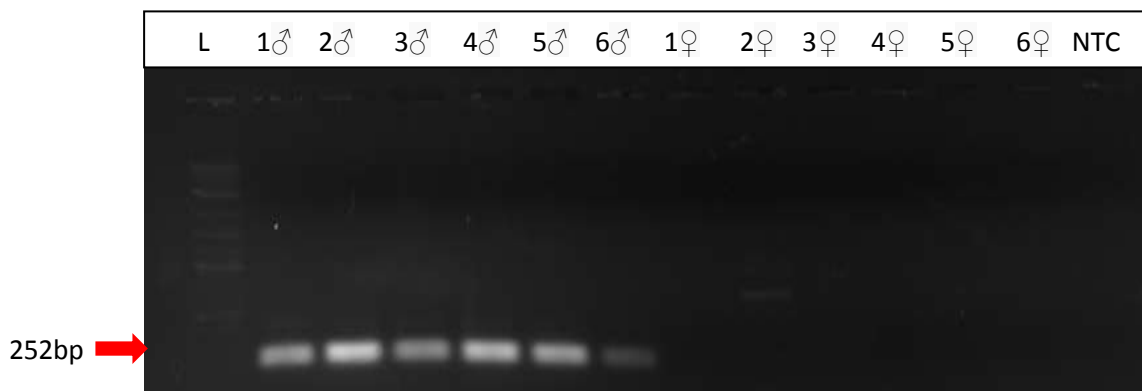
Πίνακας 5 Γίνεται αντιστοίχιση του κάθε εκκινητή που ελέγχθηκε στην παρούσα εργασία, με ένα γονίδιο το οποίο βρέθηκε να έχει τη μεγαλύτερη ομολογία με τις βάσεις που ενισχύθηκαν. Επιπλέον, αναγράφονται και οι τιμές E-value για κάθε ένα από αυτά.



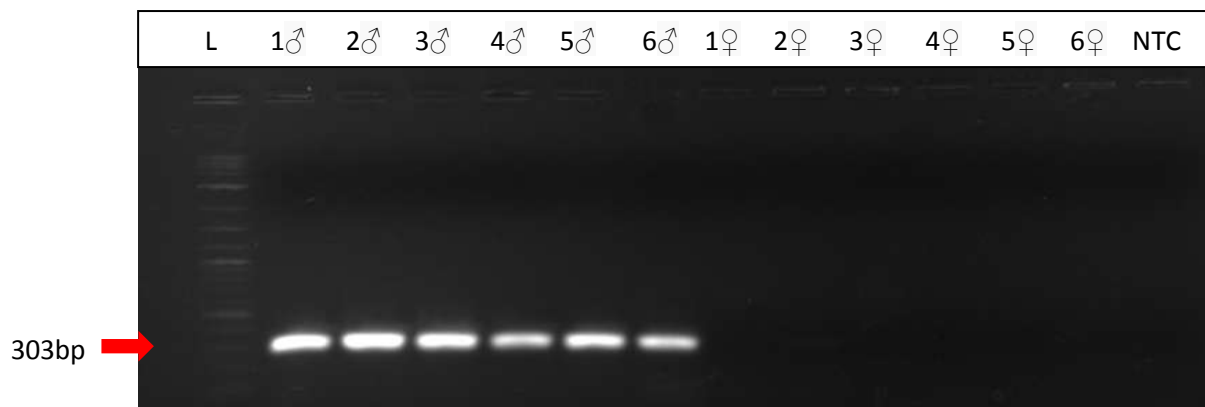
Εικόνα 12. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη των προϊόντων PCR με τον εκκινητή *Sc 67702* (Μιτοχονδριακή *NADH-ουβικινόνη*), που ενισχύει 100 bp.



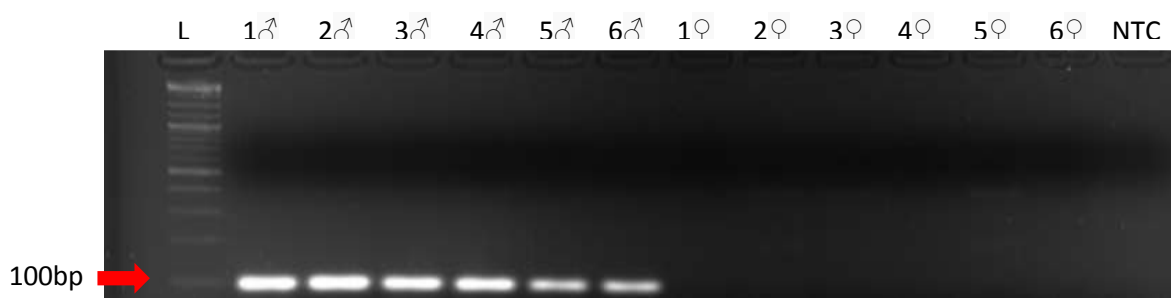
Εικόνα 13. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη των προϊόντων PCR με τον εκκινητή *Sc 27532* (πρωτεΐνη *af-10*), που ενισχύει 500 bp.



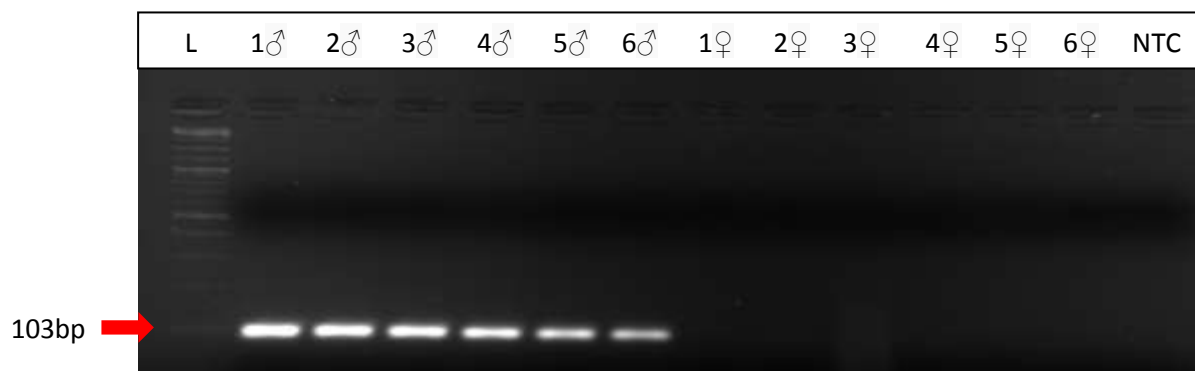
Εικόνα 14. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτική αγαρόζη των προϊόντων PCR με τον εκκινητή *Sc 6617* (γονίδιο *ene*), που ενισχύει 252 bp.



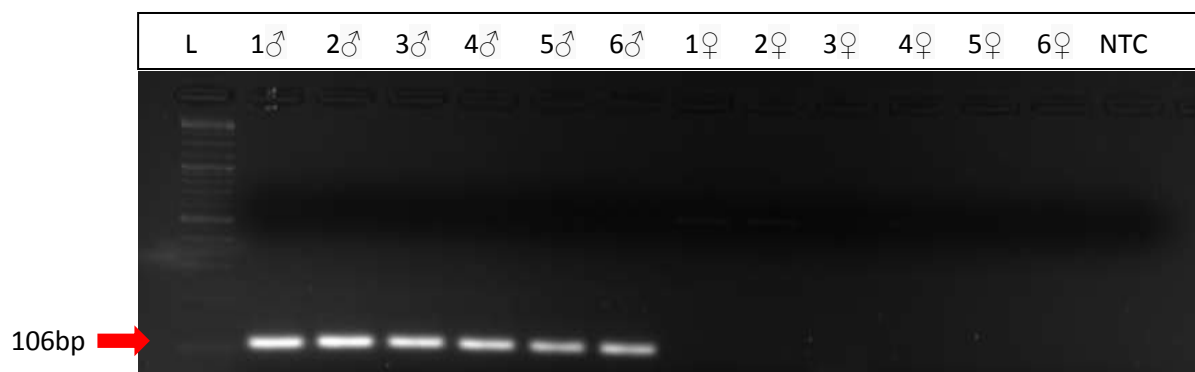
Εικόνα 15. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 23723 (πρωτεϊνική κινάση *Ser/thr*), που ενισχύει 303 bp.



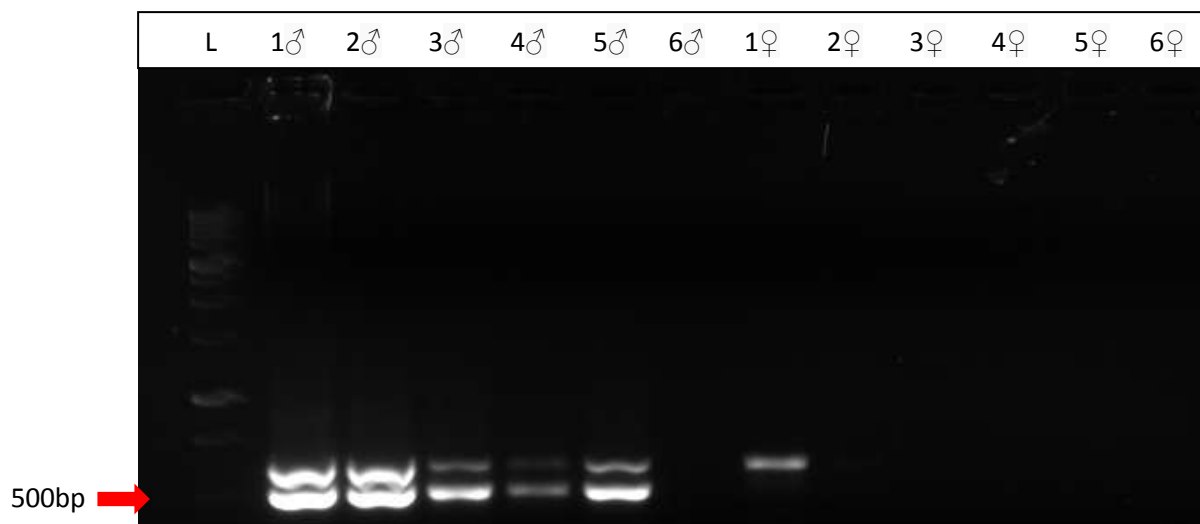
Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 6873 reg 4 (*Smoothelin*), που ενισχύει 100 bp.



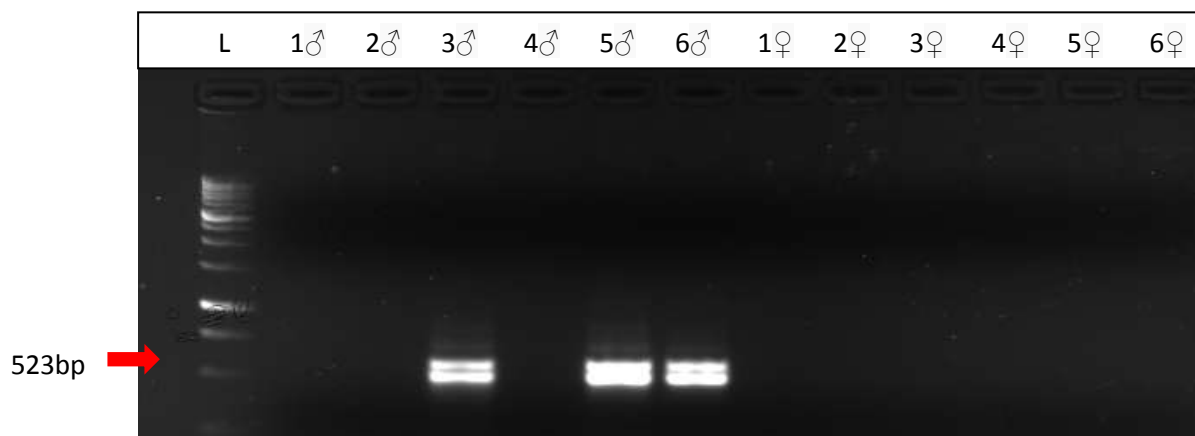
Εικόνα 17. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR με τον εκκινητή AB12 (*ιμπορτίνη*), που ενισχύει 103 bp.



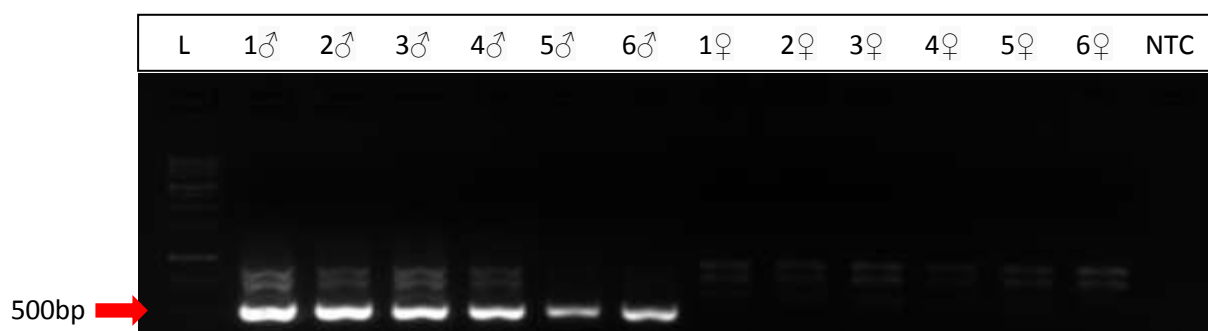
Εικόνα 18. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης των προϊόντων PCR με τον εκκινητή *Y-importin*, που ενισχύει 106 bp.



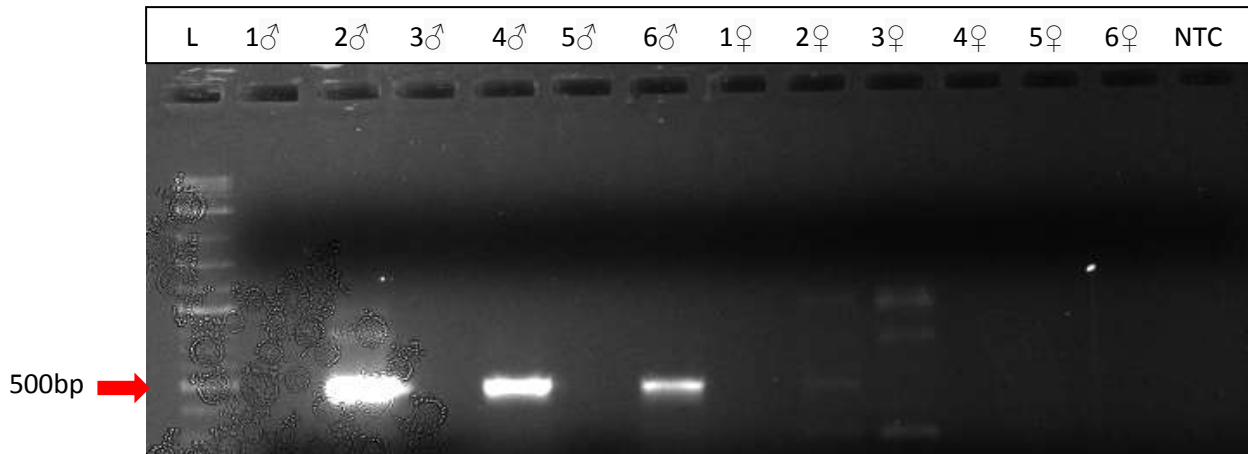
Εικόνα 19. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη των προϊόντων pcr με τον εκκινητή Sc 2952 (γονίδιο *onoA*), που ενισχύει 500 bp.



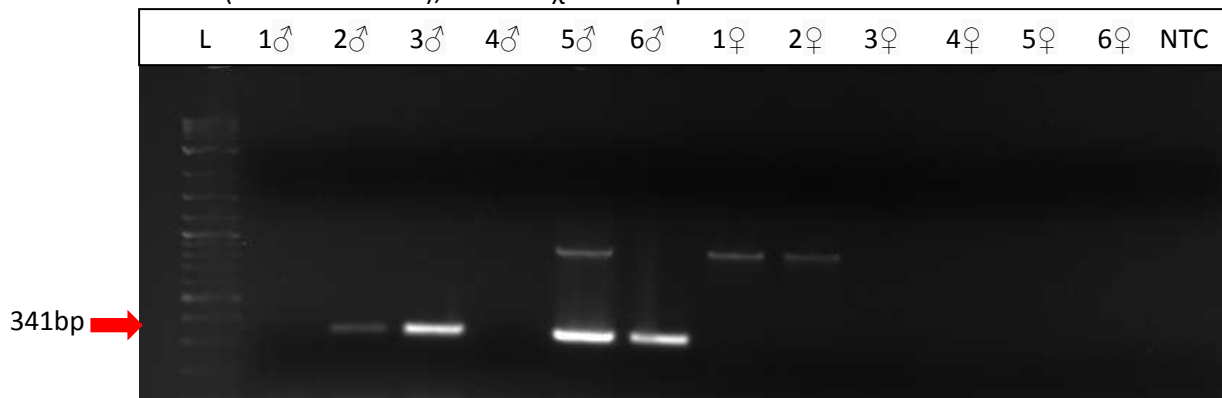
Εικόνα 20. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 3738 (*Histone-lysine N-μεθυλοτρανσφεράση*), που ενισχύει 523 bp.



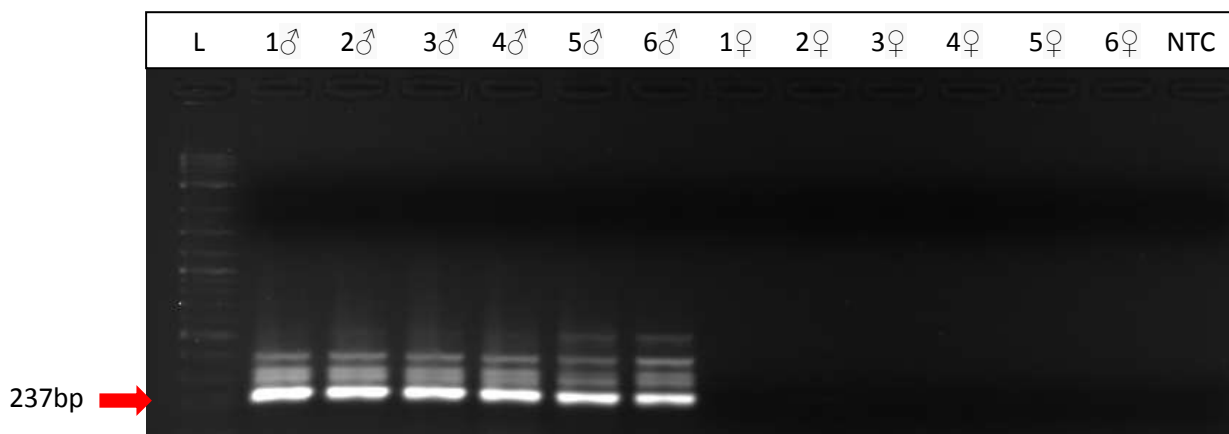
Εικόνα 21. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη των προϊόντων pcr με τον εκκινητή Sc 6626 (*πεψίνη*), οποίος ενισχύει 500 bp.



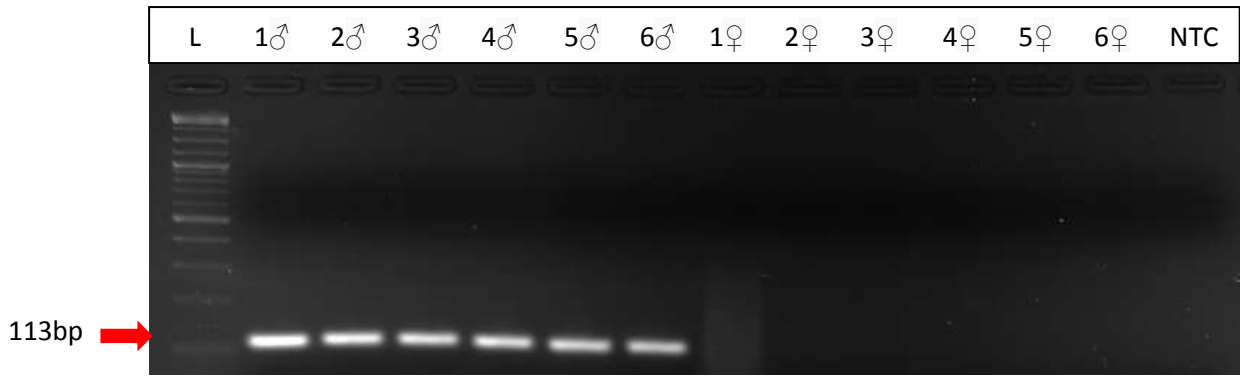
Εικόνα 22. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 6131 (*uncharacterized*), που ενισχύει 500 bp.



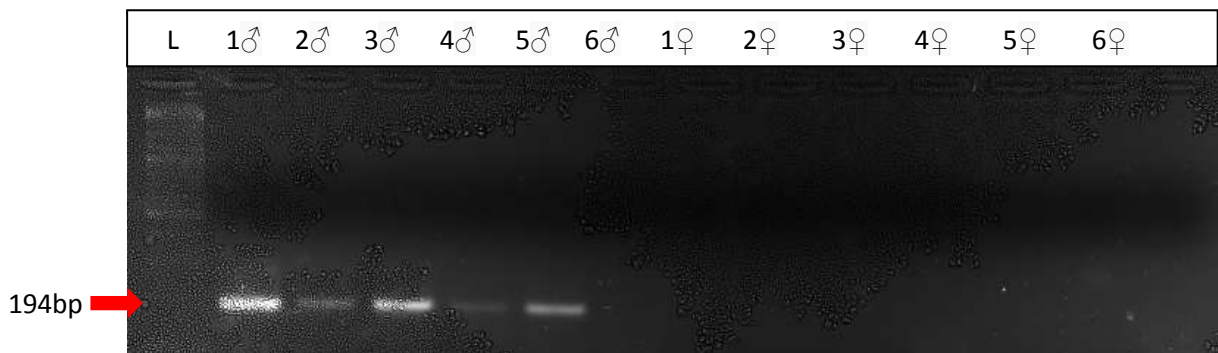
Εικόνα 23. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 4074 (*ελικάση*), οποίος ενισχύει 341 bp.



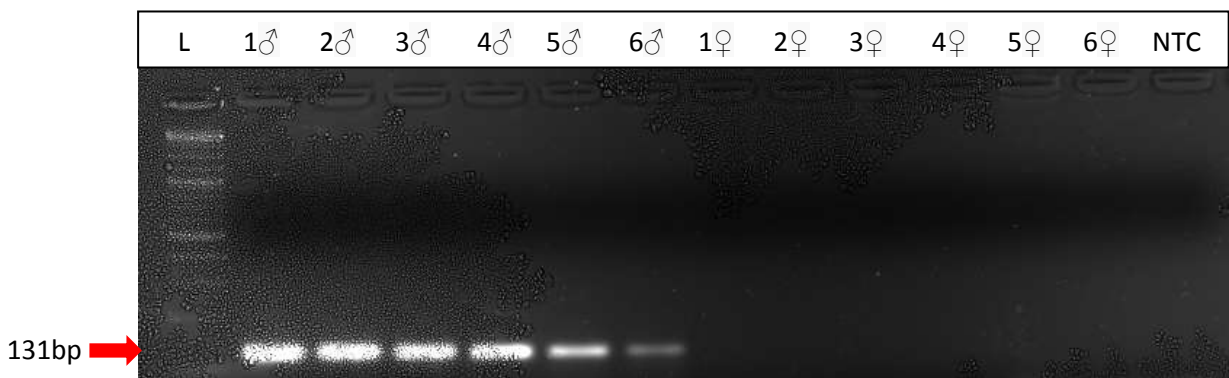
Εικόνα 24. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζη των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 30487 (γονίδιο για *κυτοχρωμική οξειδάση*), που ενισχύει 237 bp.



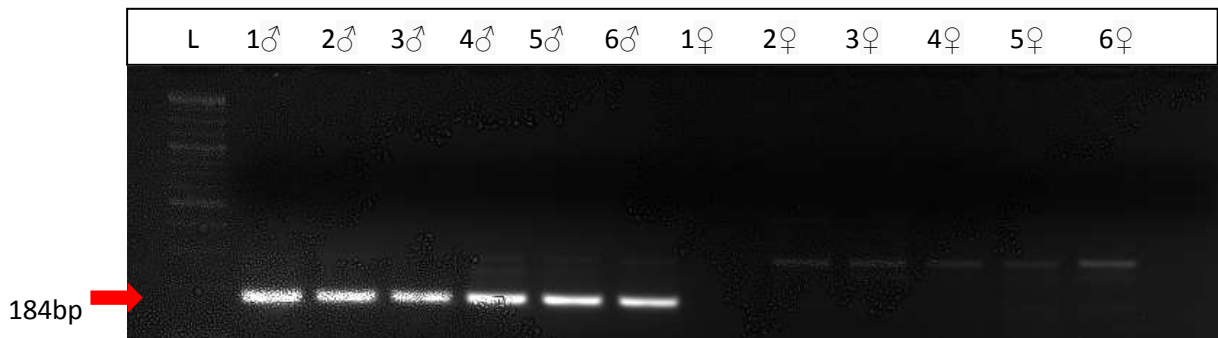
Εικόνα 25. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 6873 reg1 (ελικάση), που ενισχύει 113 bp.



Εικόνα 26. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 30951 (*cuticle protein 16.5*), που ενισχύει 194 bp.



Εικόνα 27. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 42650 (βαριά αλυσίδα *δυνείνης 5*), που ενισχύει 131 bp.

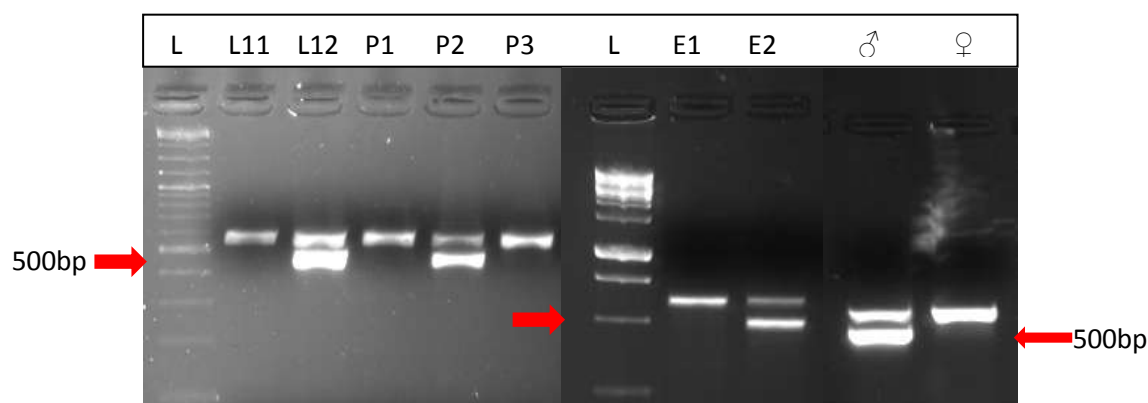


Εικόνα 28. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αгарόζης των προϊόντων PCR με τον εκκινητή Sc 6873 reg5 (ελικάση), που ενισχύει 184 bp.

Όπως προκύπτει από τις παραπάνω εικόνες, οι εκκινητές που έχουν ομολογία με την πεψίνη, την πρωτεΐνη *af-10*, το γονίδιο *ene*, την πρωτεϊνική κινάση, την κυτοχρωμική οξειδάση, την ελικάση, την *smoothelin*, τη *δυνείνη*, την μιτοχονδριακή *NADH* ουβικινόνη, *Y-importin* και την *ιμπορτίνη* δίνουν προϊόν ενίσχυσης στα αρσενικά μόνο άτομα. Οι υπόλοιποι εκκινητές (*cuticle protein 16.5*, *uncharacterized*, *μεθυλοτρανσφεράση*, γονίδιο *ονοΑ*) φαίνεται ότι εμφανίζουν αρρενοειδικότητα καθώς έχουμε ζώνες στο μέγεθος που ενισχύσαμε μόνο στα αρσενικά άτομα, χωρίς καμία εμφάνιση της αναμενόμενης ζώνης στα θηλυκά. Από τις αντίστοιχες εικόνες, γίνεται εμφανές ότι δεν επετεύχθη ενίσχυση όλων των δειγμάτων, καθώς κάποια αρσενικά άτομα δεν έδωσαν αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό μπορεί να οφείλεται σε προσθήκη μικρής ποσότητας DNA στην αντίδραση PCR. Ωστόσο επιβεβαιώνεται, η κατάλληλη χρήση των 17 εκκινητών ως δείκτες για τον διαχωρισμό αρσενικών και θηλυκών ατόμων στον δάκο της ελιάς.

3.3 Απομόνωση DNA

Για την πραγματοποίηση του ελέγχου της έκφρασης αρρενοειδικών γονιδίων στα αναπτυξιακά στάδια του δάκου της ελιάς, προηγήθηκε η απομόνωση DNA από τα στάδια αυτά (αυγό, προνύμφη και νύμφη). Τα αποτελέσματα της απομόνωσης του DNA παρουσιάζονται ενδεικτικά στην παρακάτω εικόνα.

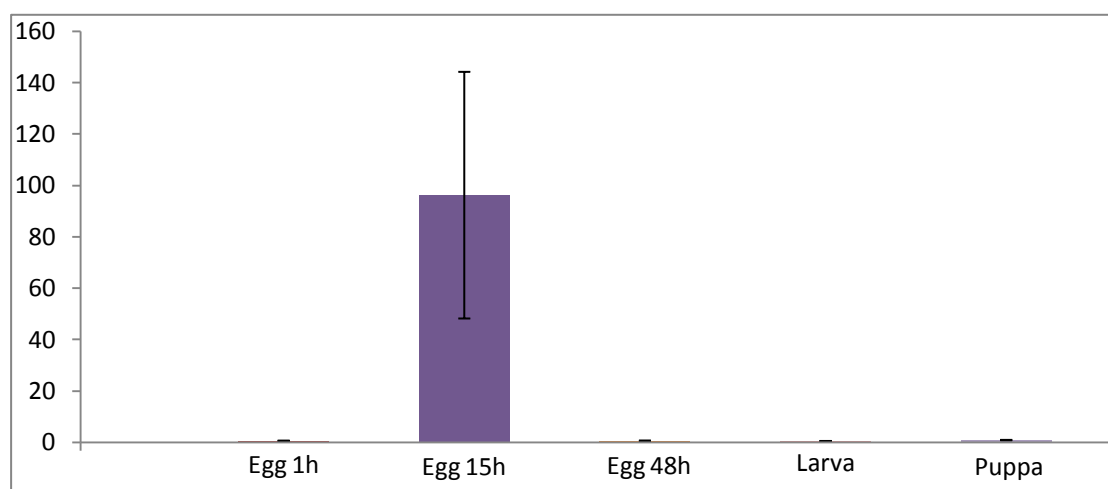


Εικόνα 29. Ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης, του DNA που απομονώθηκε από τα αναπτυξιακά στάδια του αυγού (E, egg), της προνύμφης (L, larvae) και της νύμφης (P, pupae).

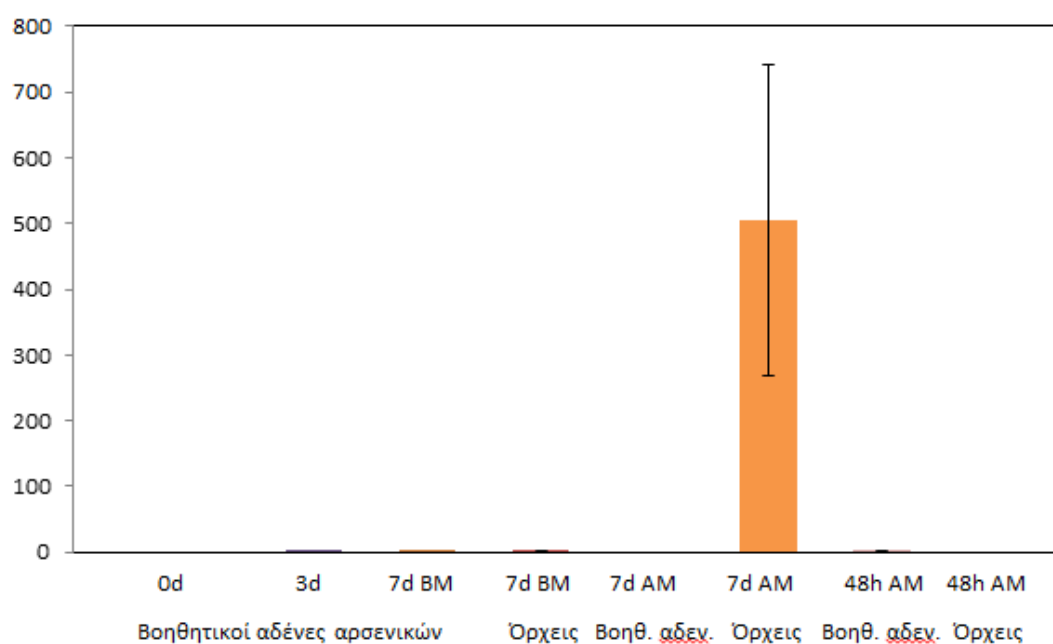
Ο εκκινητής που χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση των δειγμάτων στην εικόνα 28, είναι ο *Sc 6626* (πεψίνη) ο οποίος ενισχύει 500 bp. Στην ηλεκτροφόρηση χρησιμοποιήθηκαν και ένα αρσενικό και ένα θηλυκό ενήλικο άτομο σαν δείκτης του φύλου του κάθε δείγματος για τα αναπτυξιακά στάδια που ελέγχθηκαν. Όπως προκύπτει από την Εικόνα 28, η προνύμφη 12 (L12), η νύμφη 2 (P2) και το αυγό 2 (E2) είναι αρσενικά έντομα ενώ αντίστοιχα η προνύμφη 11 (L11), η νύμφη 1 (P1) και το αυγό 1 (E1) είναι θηλυκά έντομα. Η συγκεκριμένη προσέγγιση πραγματοποιήθηκε για όλους τους εξεταζόμενους ιστούς της μελέτης αυτής.

3.4 Προφίλ έκφρασης με χρήση Real time PCR

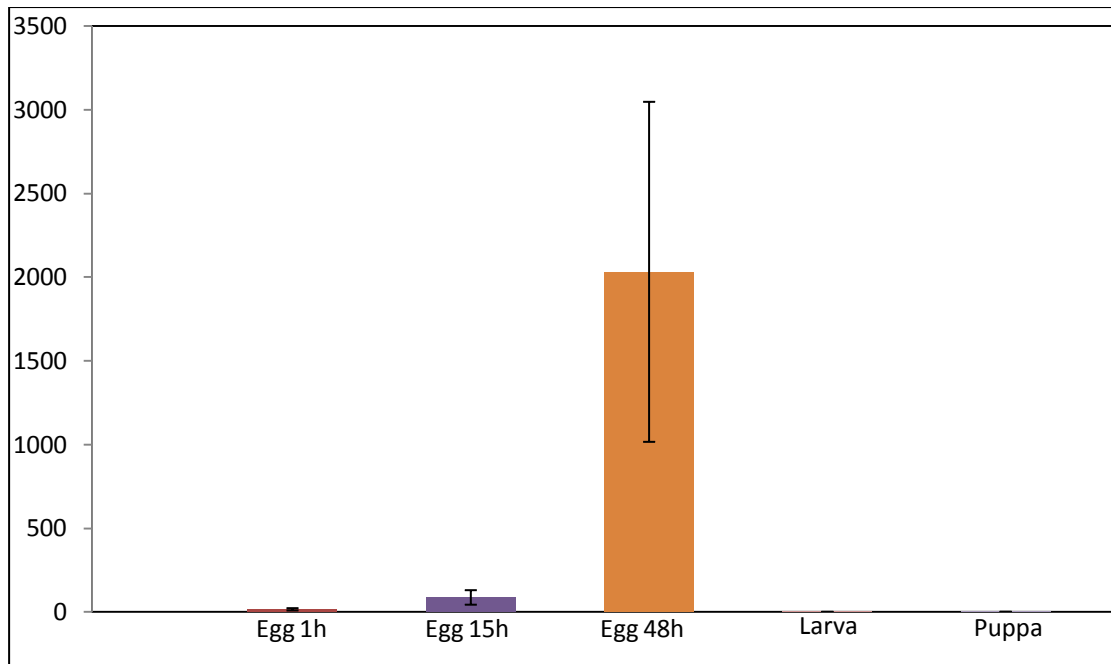
Με το πέρας της απομόνωσης DNA, πραγματοποιήθηκε real time PCR στα ακόλουθα αναπτυξιακά στάδια του δάκου: αυγά 1 hour (E1h), αυγά 15 hours (E15h), αυγά 48 hours (E48h), προνύμφες (L) και νύμφες (P). Επιπλέον, πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις real time PCR για την ιστοειδική έκφραση κατά την ανάπτυξη ενηλίκων. Για τη δημιουργία των προφίλ έκφρασης χρησιμοποιήθηκαν δυο γονίδια τα οποία από τις PCR που προηγήθηκαν. έδειξαν να είναι αρρενοειδικά. Τα γονίδια αυτά είναι η *μπορτίνη-4* (AB12) και η *smoothelin* (6873 reg 4). Στα διαγράμματα που ακολουθούν παρουσιάζονται τα προφίλ έκφρασης του κάθε γονιδίου στα αναπτυξιακά στάδια που προαναφέρθηκαν σε αρσενικά άτομα καθώς στα θηλυκά άτομα, η έκφραση των συγκεκριμένων γονιδίων ήταν μηδενική.



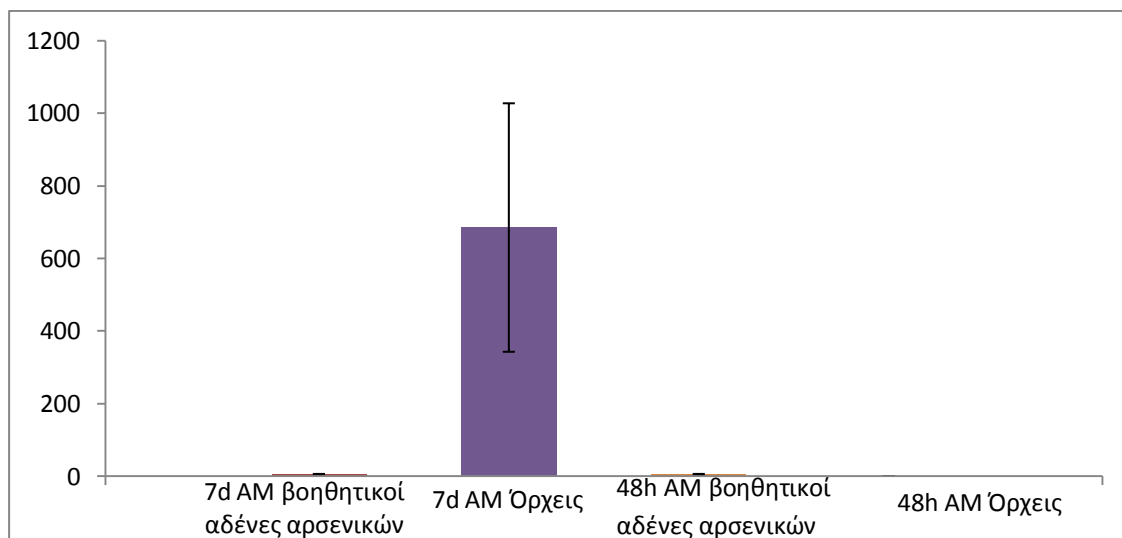
Εικόνα 30. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου της *μπορτίνης* (AB12) στα αναπτυξιακά στάδια του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*.



Εικόνα 31. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου της *μπορτίνης* (AB12) σε ενήλικα άτομα του δάκου της ελιάς. (AM: After Mating, BM: Before Mating).



Εικόνα 32. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου *smoothelin* (6873 reg 4) στα αναπτυξιακά στάδια του δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*.



Εικόνα 33. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου *smoothelin* (6873 reg 4) σε ενήλικα άτομα του δάκου της ελιάς. (AM: After Mating).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα μπορούμε να δούμε αρχικά για το γονίδιο της *μπορτίνης* (AB12), ότι έχουμε μια μικρή έκφραση στο πρώτο στάδιο των αυγών 1h, η οποία στη συνέχεια αυξάνεται κατακόρυφα στο στάδιο των αυγών 15h για να μειωθεί στη συνέχεια απότομα αλλά σταδιακά μέχρι το στάδιο της νύμφης. Αντίθετα, στο *smoothelin* (6873 reg 4) έχουμε σταδιακή αύξηση της έκφρασης του γονιδίου και κατακόρυφη αύξηση αυτής στο στάδιο του αυγού 48h. Στη συνέχεια η έκφραση μειώνεται όπως και στο γονίδιο της *μπορτίνης* στα στάδια της νύμφης και της προνύμφης.

Σε ότι αφορά τα ενήλικα άτομα, η έκφραση του γονιδίου της *μπορτίνης* ξεκινά από τα MAGs 3 days η οποία παραμένει σχεδόν σταθερή στο 7 days BM (Before Mating) αλλά αυξάνεται κατακόρυφα στους όρχεις 7 days AM με μηδενική ωστόσο έκφραση για τους βοηθητικούς αδένες των αρσενικών του αντίστοιχου σταδίου. Στο τελευταίο στάδιο έχουμε μηδενική έκφραση για τους όρχεις αντίθετα με τους βοηθητικούς αδένες αρσενικών στα οποία η έκφραση του γονιδίου παρουσιάζει μια μικρή αύξηση σε σχέση με το προηγούμενο στάδιο. Αντίστοιχο προφίλ έκφρασης μας δίνει και το γονίδιο *smoothelin* (6873 reg 4) με μόνη διαφορά την έκφραση του γονιδίου στους βοηθητικούς αδένες αρσενικών 7 days AM η οποία παραμένει σταθερή και στο επόμενο στάδιο. Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω των μεγάλων αποκλίσεων των τιμών που εμφανίζονται σε συγκεκριμένα στάδια, ο επανέλεγχος της έκφρασης των γονιδίων στα συγκεκριμένα στάδια είναι επιβεβλημένος.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.Συζήτηση

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας, έγινε εντοπισμός και ανάλυση αρρενοειδικών διαγνωστικών δεικτών στη σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς, τον δάκο *Bactrocera oleae*. Η ανάγκη για την εύρεση μεθόδων αποτελεσματικής καταπολέμησης του δάκου έχει δώσει ώθηση στην έρευνα του εντόμου σε μοριακό και γενετικό επίπεδο. Η ανάπτυξη μοριακών και γενετικών μεθόδων θα βοηθήσει σημαντικά και στη βελτιστοποίηση της τεχνικής στείρου εντόμου (SIT), η οποία αποσκοπεί στον έλεγχο των πληθυσμών του δάκου της ελιάς η οποία μέχρι σήμερα παρουσιάζει προβλήματα στην εφαρμογή της. Τα προβλήματα αυτά εμφανίζονται λόγω της δυσκολίας διαχωρισμού του φύλου των εντόμων με βάση τα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά όταν αυτά βρίσκονται σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια (αυγό, νύμφη, προνύμφη).

Για τον σκοπό αυτό στην παρούσα εργασία, έγινε μια προσπάθεια εύρεσης αρρενοειδικών δεικτών, οι οποίοι θα αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για το διαχωρισμό του φύλου στα πρώιμα αυτά στάδια. Οι μέθοδοι μοριακής ανίχνευσης του φύλου βασίζονται στη χρήση αρρενοειδικών γονιδιωματικών αλληλουχιών, αλληλουχιών δηλαδή που εντοπίζονται στο Y χρωμόσωμα. Στην οικογένεια των Terphritidae στην οποία ανήκει και ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae*, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι για την ανίχνευση του φύλου μοριακά κατά κύριο λόγο στη μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* (Douglas et al., 2004). Για την εφαρμογή του μοριακού διαχωρισμού των εντόμων απαιτείται μικρή ποσότητα DNA από το αναπτυξιακό στάδιο που μας ενδιαφέρει. Στη συνέχεια εφαρμόζεται η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR), η οποία έχει το πλεονέκτημα να μην απαιτεί μεγάλες ποσότητες γενετικού υλικού για την επιτυχή λειτουργία της. Οι αλληλουχίες που αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από αλληλουχίες του χρωμοσώματος Y καθώς αυτό αποτελεί ιδανική πηγή φυλοειδικών αλληλουχιών DNA, λόγω του ότι είναι ετερομορφικό σε σχέση με το έτερο φυλετικό χρωμόσωμα (Zarater and Robinson, 1986).

Οι αλληλουχίες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία προέρχονται από male specific scaffolds τα οποία προέκυψαν έπειτα από σύγκριση ολόκληρης της αλληλουχίας (whole genome sequencing) ενώ κατά την απομόνωση του γενετικού υλικού από τα ενήλικα έντομα χρησιμοποιήθηκαν μόνο το κεφάλι και ο θώρακας και όχι η κοιλία, καθώς στην περιοχή αυτή υπάρχει το αναπαραγωγικό σύστημα, η ύπαρξη του οποίου μπορεί να μας δώσει λανθασμένα θετικά αποτελέσματα κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) λόγω πιθανής σύζευξης.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας έδειξαν την ύπαρξη 17 αρρενοειδικών αλληλουχιών οι οποίες όταν εξετάστηκαν για 6 αρσενικά και 6 θηλυκά άτομα, έδειξαν ενίσχυση στα αρσενικά και όχι στα θηλυκά άτομα. Οι δεκαεπτά αυτές αλληλουχίες εμφανίζουν ομολογία με πολλά γονίδια κάποια από τα οποία φέρονται να έχουν άμεση σχέση με τον φυλοκαθορισμό και τη γονιμότητα ενώ ο ρόλος των υπολοίπων σε αυτές τις δυο βιολογικές διεργασίες μένει να αποσαφηνιστεί. Η πρωτεϊνική κινάση *Ser/Thr* (SSTK) η οποία βρέθηκε να έχει μεγάλη ομολογία με τον εκκινητή Sc23723, φαίνεται να σχετίζεται με την στειρότητα σε ποντίκια καθώς έχει φανεί ότι η μη ύπαρξη του γονιδίου που την εκφράζει, οδηγεί σε στειρότητα λόγω αλλοίωσης της κινητικότητας και μορφολογίας των σπερματοζωαρίων (Nikolay A. Spiridonov et al., 2005). Παρόλα αυτά δεν έχει συσχετιστεί

ακόμα με κάποιο έντομο συγγενικό του *Bactrocera oleae*. Επίσης, το γονίδιο *smoothelin* (6873 reg4) έχει βρεθεί να σχετίζεται με τη γονιμότητα καθώς προκαλεί στειρότητα σε knock out ποντίκια. Το γονίδιο αυτό φαίνεται να σχετίζεται με τη ρύθμιση ορμονών οι οποίες όταν αυτό δεν εκφράζεται φέρονται να είναι down regulated (Bodoor K. et al., 2011). Επίσης, μελέτες στον *C. elegans* συσχετίζουν μια αλληλουχία ελικάσης (Sc 4074, Sc 6873 reg 1 and reg 5) με τον φυλοκαθορισμό σε αρσενικά άτομα καθώς φαίνεται ότι η ελικάση κωδικοποιείται από το γονίδιο *laf-1* το οποίο έχει βασικό ρόλο στον καθορισμό του αρσενικού ρυθμίζοντας αρνητικά την έκφραση του *tra-2* (Hubert and Anderson, 2009).

Σε ότι αφορά γονίδια που εκφράζονται σε πιο συγγενικά είδη για τον δάκο της ελιάς, η κυτοχρωμική οξειδάση COII (Sc 30487), έχει βρεθεί στη *Drosophila melanogaster* να προκαλεί στειρότητα στα αρσενικά άτομα προκαλώντας βλάβες στην ανάπτυξη και τη λειτουργία του σπέρματος χωρίς να προκαλεί βλάβη σε άλλες λειτουργίες των αρσενικών ή των θηλυκών ατόμων (Patel et al., 2016). Επίσης, η βαριά αλυσίδα δυνεΐνης (Sc 42650) έχει βρεθεί ότι προκαλεί στειρότητα σε αρσενικά άτομα του είδους *Drosophila hydei*, καθώς η ύπαρξη αυτών των μορίων είναι απαραίτητη για τη συναρμολόγηση χειρών δυνεΐνης στο εσωτερικό του αξωνήματος της ουράς του σπέρματος (sperm tail axoneme). Έτσι, η απουσία μορίων βαριάς αλυσίδας δυνεΐνης, μπορεί να προκαλέσει βλάβη στην κινητικότητα του σπέρματος και κατ'επέκταση στειρότητα στα άτομα αυτά (Kurek et al., 1998). Επιπρόσθετα, το γονίδιο *onoA* (Sc 2952) αποτελεί ένα από τα δυο μετάγραφα του γονιδίου *ono* το οποίο έχει βρεθεί ότι είναι ο βασικός καθοριστής της ωογένεσης στη Μεσογειακή μύγα. Στην *Drosophila*, το γονίδιο *ono* ανήκει στο σύμπλεγμα γονιδίων *ono/shavenbaby (svb)* (Mével-Ninio et al., 1991). Τα γονίδια *ono/svb* έχουν εντοπιστεί και στο *Bactrocera oleae*, παρόλο που αυτά τα δυο είδη βρίσκονται φυλογενετικά μακριά (Diptera). Στη *Drosophila*, τα γονίδια *ono/svb* κωδικοποιούν την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων C2H2 zinc-finger που απαιτούνται για την ανάπτυξη της αναπαραγωγικής σειράς και της επιδερμίδας. Ο μεταγραφικός παράγοντας *onoA* έχει δράση καταστολέα και ενεργοποιείται στα τελικά στάδια της ωογένεσης. Το γεγονός αυτό αυξάνει την πιθανότητα η αλληλουχία που ενισχύσαμε με τον εκκινητή Sc 2952 και εμφανίζει ομολογία με το *onoA* να εμπλέκεται στον φυλοκαθορισμό και να είναι Y-ειδική.

Τέλος, η *ιμπορτίνη-4* (Y-importin, AB12) φαίνεται να εμπλέκεται στον φυλοκαθορισμό. Πιο συγκεκριμένα, γονίδια της οικογένειας των ιμπορτινών κωδικοποιούν πυρηνικούς υποδοχείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν σήματα πυρηνικού εντοπισμού πρωτεϊνών φορτίου όπως τα ετεροδιμερή a/b (Nakielný S, Dreyfuss G, 1999). Ειδικότερα, πρωτεΐνες *importin b-like*, στις οποίες ανήκει και η ιμπορτίνη-4, εισάγουν πρωτεΐνες SR μέσα στον πυρήνα καθώς αναγνωρίζουν μια περιοχή RS (πλούσια σε αργινίνη και σερίνη) ως σήμα πυρηνικού εντοπισμού (Hedley ML et al., 1995). Αξίζει να σημειωθεί ότι το γονίδιο *Bo-transformer*, που παίζει βασικό ρόλο στο μονοπάτι φυλοκαθορισμού στο *B.oleae* (Lagos et al., 2007) είναι μέλος της υπεροικογένειας των πρωτεϊνών SR. Επιπλέον, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι ένα προϊόν της ιμπορτίνης-4 εμπλέκεται στην πυρηνική παλινδρόμηση του ανθρωπίνου παράγοντα αρρενοποίησης, SRY (Gontan et al., 2009). Με βάση τα παραπάνω δεδομένα θα μπορούσαμε να συμπεράνουμε ότι η *ιμπορτίνη-4* εμπλέκεται στον φυλοκαθορισμό στο *B.oleae*, ωστόσο περεταίρω μελέτες είναι επιβεβλημένες καθώς δεν μπορούμε να αποκλείσουμε την πιθανότητα η *ιμπορτίνη-4* όταν μετατέθηκε στο Y χρωμόσωμα του δάκου, να έχασε τις αρχικές της λειτουργίες και να ανέπτυξε νέες (Gabrieli

et al., 2011). Εν κατακλείδι, οι 7 αλληλουχίες που βρέθηκαν φαίνονται να είναι Υ-ειδικές ενώ και πολλά από τα γονίδια με τα οποία εμφανίζουν ομολογία φαίνεται να εμπλέκονται τόσο στο φυλοκαθορισμό όσο και στην γονιμότητα σε άλλους οργανισμούς, ωστόσο πρέπει να γίνουν και άλλες μελέτες για να μπορούμε να συμπεράνουμε με σιγουριά ότι οι παραπάνω αλληλουχίες εμπλέκονται σε κάποια από τις δυο διεργασίες.

Στη συνέχεια, από τις 17 αυτές αρρενοειδικές αλληλουχίες, επιλέχθηκαν δυο (*smoothelin*, *μπορτίνη -4*) για τη δημιουργία προφίλ έκφρασής τους στα αναπτυξιακά στάδια του δάκου και σε ενήλικα άτομα. Σε ότι αφορά την αλληλουχία *smoothelin-like* τα αποτελέσματα έδειξαν αυξανόμενη έκφραση από το στάδιο του αυγού 1h μέχρι την κατακόρυφη αύξηση της έκφρασης στα αυγά 48h ενώ στα επόμενα στάδια της προνύμφης και της νύμφης είχε πολύ μεγάλη μείωση στην έκφρασή του, γεγονός που μας κάνει να πιστεύουμε ότι υπάρχει καλή πιθανότητα να εμπλέκεται στον φυλοκαθορισμό. Το ίδιο ισχύει και για το γονίδιο της *μπορτίνης-4* η έκφραση της οποίας είναι πολύ μεγαλύτερη στο στάδιο των αυγών 15h σε σχέση με τα υπόλοιπα. Τα συμπεράσματα αυτά προκύπτουν διότι αν και το ακριβές στάδιο φυλοκαθορισμού δεν είναι ακόμα γνωστό, ξέρουμε ότι ο φυλοκαθορισμός συμβαίνει κάποια στιγμή από τη δημιουργία του αυγού μέχρι το στάδιο των 48h και όχι πιο μετά. Η αυξημένη έκφραση λοιπόν μέχρι εκείνο το στάδιο, είναι ισχυρή ένδειξη της πιθανότητας να εμπλέκεται στον φυλοκαθορισμό. Αξίζει επίσης να σημειωθεί ότι τα γονίδια αυτά εμφανίζουν μετρίως υψηλή έκφραση στο στάδιο του αυγού 16-18h στη *D.melanogaster*. Τέλος, σε ότι αφορά τα ενήλικα άτομα, και τα δυο γονίδια εμφανίζουν πολύ υψηλή έκφραση στους όρχεις 7 ημέρες μετά το ζευγάρωμα, κάτι που μας δείχνει ότι μπορεί να εμπλέκονται και στη γονιμότητα των ατόμων αυτών, ωστόσο θα χρειαστούν επαναλήψεις καθώς η απόκλιση στις τιμές σε αυτά τα αποτελέσματα είναι αρκετά μεγάλη για να βγάλουμε σαφή συμπεράσματα.

Εν κατακλείδι, οι 17 αλληλουχίες που εντοπίσαμε και αναλύσαμε φαίνεται να είναι Υ-ειδικές και η χρήση τους μπορεί να αποβεί καθοριστική στον επιτυχή καθορισμό του φύλου στα πρώιμα αναπτυξιακά στάδια και την επακόλουθη βελτιστοποίηση της τεχνικής στείρου εντόμου. Ενώ η ανάλυση με τη δημιουργία προφίλ έκφρασης ορισμένων από αυτά μας έδωσε μια πολύ καλή ένδειξη για την εμπλοκή τους ή μη στον φυλοκαθορισμό και τη γονιμότητα. Οι μελλοντικές προοπτικές επιβάλλουν τη δημιουργία προφίλ έκφρασης για όλα τα υπόλοιπα γονίδια που βρέθηκαν να είναι Υ-ειδικά, ενώ στη συνέχεια θα πρέπει να γίνει αποσιώπηση των συγκεκριμένων γονιδίων έτσι ώστε να μπορέσουμε να καταλήξουμε στη λειτουργία των γονιδίων αυτών και να μπορέσουμε να βγάλουμε ασφαλή και τελικά συμπεράσματα για το αν όντως συμμετέχουν στη διαδικασία του φυλοκαθορισμού και αν εμπλέκονται στη γονιμότητα ή όχι.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Amy Hubert and Philip Anderson (2009) The *C. elegans* sex determination gene *laf-1* encodes a putative DEAD-box RNA helicase. *Dev Biol.* 2009 Jun 15; 330(2): 358–367.
- Anleitner JE, Haymer DS (1992) Y enriched and Y specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Chromosoma* 101: 271–278.
- Ant T, Koukidou M, Rempoulakis P, Gong HF, Economopoulos A, Vontas J, Alphey L. 2012. Control of the olive fruit fly using genetics-enhanced sterile insect technique. *BioMed Central Biology* 10: 1-8.
- Augustinos A.A., Mamuris Z., Stratikopoulos E.E., D'Amelio S., Zacharopoulou A. & K.D. Mathiopoulos (2005) Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*, 125: 231-241.
- Augustinos A.A., Stratikopoulos E.E., Zacharopoulou A., Mathiopoulos K.D. (2002) Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Molecular Ecology Notes*, 2: 278-280.
- Avidov Z (1954) Further investigations on the ecology of the olive fly (*Dacus oleae*Gmel.) in Israel. *Ktavim* 4: 39–50.
- Baker R., R. Herbert, P.E. Howse, O.T. Jones, W. Franke, and W. Reith, 1980. Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly (*Dacus oleae*). *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* 52-53.
- BAKER, B. and RIDGE, K. (1980). Sex and the single cell. I. On the action of the major loci affecting sex determination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 94: 383–423.
- Benelli, G., Canale, A., Bonsignori, G., Ragni, G., Stefanini, C., Raspi, A., 2012. Male wing vibration in the mating behavior of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae). *Journal of Insect Behavior* 25, 590–603.
- Bird IM (2005). "Extraction of RNA from cells and tissue". *Methods Mol. Med.* 108: 139–48.
- Bodoor K, Lontay B, Safi R, Weitzel DH, Loisel D, Lengyel S, et al. Smoothelin-like 1 Protein Is a Bifunctional Regulator of the Progesterone Receptor during Pregnancy. *J Biomech.* 2011;286:31839–51.
- Bonizzoni M, Guglielmino CR, Smallridge CJ, Gomulski M, Malacrida AR, Gasperi G: On the origins of medfly invasion and expansion in Australia. *Molecular Ecology.* 2004, 13 (12): 3845-3855.

Bonizzoni M, Malacrida AR, Guglielmino CR, Gomulski LM, Gasperi G, Zheng L: Microsatellite polymorphism in the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Insect Molecular Biology*. 2000, 9 (3): 251-261.

Bonizzoni M, Zheng L, Guglielmino CR, Haymer DS, Gasperi G, Gomulski LM, Malacrida AR: Microsatellite analysis of medfly bioinfestations in California. *Molecular Ecology*. 2001, 10 (10): 2515-2524.

Borowiec N, Groussier-Bout G, Vercken E, et al. (2012) Diversity and geographic distribution of the indigenous and exotic parasitoids of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), in Southern France. *IOBC/WPRS Bulletin*, 79:71–78.

Boyes JW, Van Brink JM 1965. Chromosomes of calyprate Diptera. *Can Genet Cytol* 7: 537-550.

Broumas, T. and G. Haniotakis, 1987. Further studies on the control of the olive fruit fly by Mass-trapping. *Proc. II Intern. Symp. Fruit Flies/Crete Sept. 1986*, pp 561-565.

Broumas, T., C. Liaropoulos, P. Katsoyiannos, C. Yamvriasis and F. Strong, 1983. Control of the olive fruit fly in a pest management trial in olive culture. In *Fruit fly of Economic Importance*, R Cavalloro (ed). *Proc. of the CEC/IOBC, Intern. Sympos. Athens Greece, 16-19 Nov. 1982*, pp 584-592.

Brunner, AM; Yakovlev, IA; Strauss, SH (2004). "Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies". *BMC Plant Biol.* 4: 14.

BULL, J.B. (1983). *Evolution of sex determining mechanisms*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, Menlo Park, California, USA.

Burrack HJ, Zalom FG, 2008. Olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) ovipositional preference and larval performance in several commercially important olive varieties in California. *J. Econ. Entomol.* 101, 750–758.

Bustin, SA (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays". *J Mol Endocrinol* 25 (2): 169–93.

Butte AJ, et al. (2001) Comparing the similarity of time-series gene expression using signal processing metrics. *J Biomed Inform* 34(6):396-405.

Cavalloro R and Delrio G (1970) *Redia*, 52: 201-230.

Cavalloro R and Delrio G (1973) *Redia*, 54: 153-167.

Cavalloro R and Delrio G (1974) *Redia*, 55: 373-392.

Charlesworth, B (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Biol*, 6: 149–162.

Clarke AR, Armstrong KF, Carmichael AE et al. (2005) Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of tropical fruit flies. *Annual Review of Entomology*, 50, 293–319.

Cline, T.W. (1978). Two closely-linked mutations in *Drosophila melanogaster* that are lethal to opposite sexes and interact with *daughterless*. *Genetics* 90: 683–698.

Cooper, Geoffery M. *The Cell: A Molecular Approach*. 4th ed. Washington D.C.: ASM Press, 2007. 129-132.

Croy, Ron. (1998) "Molecular Genetics II - Genetic Engineering Course (Supplementary notes).

Daane KM & Johnson MW (2010) Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annu Rev Entomol* 55: 151-69.

Daane KM, Johnson MW (2010) Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times. *Annual Review of Entomology*, 55(1):151–169.

Denholm I & Rowland MW (1992) Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu Rev Entomo* 37: 91-112.

EC (2010) LIFE among the olives: Good practice in improving environmental performance in the olive oil sector.

Economopoulos AP (1972) Sexula competitiveness of gamma-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. *Environ Entomol* 1: 490-497.

Economopoulos AP, Giannakakis A, Tzanakakis ME and Voyadjoglou AV (1971) *Annals of the Entomological Society of America*, 64: 1112-1116.

Economopoulos AP, Voyadjoglou AV and Giannakakis A (1976) *Annals of the Entomological Society of America*, 69: 725-729.

Efthimia Sagri, Martin Reczko, Konstantina T Tsoumani, Maria-Eleni Gregoriou, Vaggelis Harokopos, Anna-Maria Mavridou, Spyros Tastsoglou, Konstantinos Athanasiadis, Jiannis Ragoussis† and Kostas D Mathiopoulos (2014) The molecular biology of the olive fly comes of age *BMC Genetics* 2014.

Efthimia Sagri, Martin Reczko, Maria-Eleni Gregoriou, Konstantina T Tsoumani, Nikolaos E Zygouridis, Klelia D Salpea, Frank G Zalom, Jiannis Ragoussis and Kostas D Mathiopoulos (2014) Olive fly transcriptomics analysis implicates energy metabolism genes in *spinosad* resistance, *BMC Genomics* 2014.

Fiestas RDU, Constante JA, Duran RM and Roncero AV (1972) *Annals of the Entomological Society of France*, 8: 179-188.

Fletcher BS (1989) Temperature-development rate relationships of the immature stages and adults of tephritid fruit flies. In: Robinson AS, Hooper G, editors. *Fruit flies, their biology, natural enemies and control*. World Crop Pests, 3B. Amsterdam: Elsevier. pp. 273–289.

Fletcher BS (1989). In: Robinson AS, Hooper G (eds) *Fruit flies, their biology, natural enemies and control*, vol 3B. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 195–208.

Fletcher BS, Pappas S, Kapatos E (1978) Changes in the ovaries of olive flies (*Dacus oleae* (Gmelin)) during the summer and their relationship to temperature, humidity and fruit availability. *Ecol Entomol* 3: 99–107.

Fytizas E (1973) *Z. Angrew. Entomol.*, 73: 74-82.

Gasperi G, Bonizzoni M, Gomulski LM et al. (2002) Genetic differentiation, gene flow and the origin of infestations of the medfly, *Ceratitis capitata*. *Genetica*, 116, 125–135.

Genc H. 2014. Embryonic development of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* Rossi (Diptera: Tephritidae), in vivo. *Turkish Journal of Zoology* 38: 598-602.

Gerhold D, Rushmore T and Caskey CT (1999) DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trands Biochem. Sci.*, 24: 168-173.

Girolami V, Strapazzon A and De Gerloni PF (1983) In: *Fruit flies of Economic Importance*. Proceedings of CEC/IOBC International Symposium, November 1982, Athens, p. 258- 267. Cavalloro R edition.

Gontan C, Guttler T, Engelen E, Demmers J, Fornerod M, et al. (2009) Exportin 4 mediates a novel nuclear import pathway for Sox family transcription factors. *J Cell Biol* 185: 27–34.

HAGEN, K. S., L. SANTAS, AND A. TSECOURAS. 1963. A technique of culturing the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmel. on synthetic media under xenic conditions, pp. 333-356 In *Radiation and Radioisotopes Applied to Insects of Agricultural Importance*. Proceedings Symposium, Athens 22-26 April 1963, International Atomic Agency, Vienna, STI/PUB/74, 333-356.

Haniotakis, G.E. M. Kozyrakis, and K. Bonatsos, 1987. Area-Wide management of the olive fruit fly by feeding attractant and sex pheromones on toxic traps. *Proc. II Intern. Symp. Fruit Flies/Crete Sept. 1986*, pp 549-560.

Haniotakis, G.E., M. Kozyrakis, Th. Fitsakis, and A. Antonidaki. 1991. An effective mass trapping method for control of the olive fruit fly *Dacus oleae* [Diptera: Tephritidae]. *J. Econ. Entomol.* 84: 3326-3331.

Hedley ML, Amrein H, Maniatis T (1995) An amino acid sequence motif sufficient for subnuclear localization of an arginine/serine-rich splicing factor *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 11524–11528.

Higuchi, R.; Dollinger, G.; Walsh, P.S.; Griffith, R. (1992). "Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences". *Bio-Technology* 10 (4): 413–417.

Hoelmer KA, Kirk AA, Pickett CH, Daane KM, Johnson MW (2011) Prospects for improving biological control of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), with introduced parasitoids (Hymenoptera). *Biocontrol Science and Technology*, 21(9):1005–1025.

Jean-Louis Viovy (2000). "Electrophoresis of DNA and other polyelectrolytes: Physical mechanisms". *Reviews of Modern Physics.* 72: 813–872.

John A. Tsitsipis Effect of Constant Temperatures on Larval and Pupal Development of Olive Fruit Flies Reared on Artificial Diet, 764-768 First published online: 1 December 1980.

Jones, O.T. 1987. The use of behaviour modifying chemicals in the integrated pest management of selected fruit species. *Proc. II Intern. Symp. Fruit Flies/Crete* Sept. 1986, pp 451-458.

Kapatos and Fletcher (1984) The Phenology of the Olive Fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae), in Corfu.

Kapatos, E.T. and Fletcher, B.S. 1983. Development of a pest management system of *Dacus oleae* in Corfu by utilizing ecological criteria. In: *Fruit Flies of Economic Importance*. R. Cavalloro (ed). *Proc. of the CEC/IOBC, Intern Sympos.* Athens Greece, 16-19 Nov. 1982, pp 593-602.

Katsoyannos P (1992) Olive pests and their control in the near East. *Fao Plant Production and Protection Paper* No 115.

Knipling GF (1955) *Journal of Economical Entomology*, 48: 459-462.

Krimbas CB (1963) A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Tephritidae): the salivary gland and mitotic chromosomes. *Caryologia*, 16: 371-376.

Kubista, M; Andrade, JM; Bengtsson, M; Forootan, A; Jonak, J; Lind, K; Sindelka, R; Sjogreen, B; Strombom, L; Stahlberg, A; Zoric, N (2006). "The real-time polymerase chain reaction". *Mol Aspects Med.* 27 (2-3): 95–125.

Kunitz, M (1950) *J. Gen Physiol* 33: 349-362

Kurek, R., Reugels, A.M., Glatzer, K.H., Bunemann, H. (1998). The Y chromosomal fertility factor threads in *Drosophila hydei* harbors a functional gene encoding an axonemal dynein beta heavy chain protein. *Genetics* 149(3): 1363—1376.

Lagos D, Koukidou M, Savakis C, Komitopoulou K (2007) The transformer gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Mol Biol* 16: 221–230.

Lagos D, Koukidou M, Savakis C, Komitopoulou K (2007). *Insect Mol. Biol.* 16: 221-230.

Lagos D, Ruiz MF, Sánchez L, Komitopoulou K (2005) Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster*.

Levinson HZ, Levinson AR, 1984. Botanical and chemical aspects of the olive tree with regards to fruit acceptance by *Dacus oleae* (Gmelin) and other frugivorous animals. *Z. Angew. Entomol.* 98, 136–149.

Macgregor H. and Varley J. Working with animal chromosomes. John Wiley and Sons Ltd (1983).

Manousis T, Moore N, 1987. Control of *Dacus oleae*, a major pest of olives. *Insect Sci. Appl.* 8, 1–9.

Manousis, T. and N.F. Moore, 1987. Mini-review. Control of *Dacus oleae* a major olive pest of olives. *Insect Science and its Application* 8(1), 1-9.

Maulik R Patel Ganesh K Miriyala Aimee J Littleton Heiko Yang Kien Trinh Janet M Young Scott R Kennedy Yukiko M Yamashita Leo J Pallanck Harmit S Malik (2016). A mitochondrial DNA hypomorph of cytochrome oxidase specifically impairs male fertility in *Drosophila melanogaster*, *eLife*.

Mavragani-Tsipidou P (2002) Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 116: 45-57.

Mavragani-Tsipidou P, Karamanlidou G, Zacharopoulou A, Koliais S and Kastritsis CD (1992) Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genome*, 35: 373-378.

Mazomenos, B.E. and G.E. Haniotakis, 1981. A multi component female sex pheromone of *Dacus oleae* Gmel. Isolation and bioassay. *J. Chem. Ecol.* 7: 437- 443.

- Mazomenos, B.E. and G.E. Hanriotakis. 1985 Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *J. Chem. Ecol.*, 11: 397-405.
- Meselson M and Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*, 217: 1110- 1114.
- MITTLER, T. E., AND J. A. TSITSIPIS. 1973 Economical rearing of larvae of the olive fruit fly, *Dacus oleae*, on a liquid diet offered on cotton toweling. *Entomol. Exp. Appl.* 16: 292-293.
- Montiel Bueno A, Jones O (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants West Palaearctic Regional Section (IOBC/ WPRS) Bulletin*, 25, 1–11.
- Montiel-Bueno, A., 1986. The use of sex pheromone for monitoring and control of olive fruit fly. *Proc. II Intren. Symp. Fruit Flies/Crete Sept. 1986*, pp 483-494.
- Moser SC, Swedlow JR (2011) How to be a mitotic chromosome. *Chromosome Res* (2011) 19: 307-309.
- Nadel, D.J. 1966. Control of the olive fly by hydrolasate baiting method through aerial and ground application. *FAO Plant Protection Bulletin*, 14(3). Vontas JG, Cosmidis N, Loukas M, Tsakas S, Hejasi MJ et al (2001) Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic Biochem Physiol* 71: 124-132.
- Nakielny S, Dreyfuss G (1999) Transport of proteins and RNAs in and out of the nucleus. *Cell* 99: 677–690.
- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F. 2003. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Molecular Biology* 12: 605-611.
- Neuenschwander P and Michelidakis S (1979) *Bull. Soc. Entomol. Suisse*, 52: 57-74.
- Nikolay A. Spiridonov, Lily Wong, Patricia M. Zervas, Matthew F. Starost, Svetlana D. Pack, Cloud P. Paweletz, and Gibbes R. Johnson, (2005) Identification and Characterization of SSTK, a Serine/Threonine Protein Kinase Essential for Male Fertility, *Molecular and Cellular Biology*.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(8):2766-70.

Orphanidis PS (1967) Nea Agrotiki Epitheorissis. July, p. 1-14.

P. Neuenschwander and S. Michelakis (1978) The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete.

Paolo Gabrieli, Ludvik M. Gomulski, Angelica Bonomi, Paolo Siciliano, Francesca Scolari, Gerald Franz, Andrew Jessup, Anna R. Malacrida, Giuliano Gasperi (2011) Interchromosomal Duplications on the *Bactrocera oleae* Y Chromosome Imply a Distinct Evolutionary Origin of the Sex Chromosomes Compared to *Drosophila*.

Pappas ML, Broufas GD, Koufali N, Pieri P, Koveos DS (2011) Effect of heat stress on survival and reproduction of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. *J Appl Entomol* 135: 359–366.

PASKOVÁ Ľ, M. 2007. New larval agar-based diet for laboratory rearing of Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata* (Diptera: Tephritidae). *Biologia, Bratislava* 62(4): 477-481.

Paul Sunnucks (2000) Efficient genetic markers for population biology.

PENALVA, L.O.F. and SÁNCHEZ, L. (2003). The RNA binding protein Sex-lethal (*Sxl*) and the control of *Drosophila* sex determination and dosage compensation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 343-359.

Phillips VT. 1946. The biology and identification of trypetid larvae (Diptera: Trypetidae). *Memoirs of the American Entomological Society* 12: 1-161.

Ramos, P., O.T. Jones and P.E. Howse. 1983. The present status of the olive fruit fly (*Dacus oleae*) in Granada Spain, and techniques for monitoring its populations. In: *Fruit Flies of Economic Importance*. R. Cavalloro (ed). Proc. of the CEC/IOBC, Intern. Sympos. Athens Greece, 16-19 Nov. 1982, pp 38-40.

REY, J. M. 1969. Development of a larval diet for the rearing of *Dacus oleae* Gmel. 8th FAO ad hoc Conference on the Control of Olive pests and Diseases. Athens, 8-12 May.

Rice R. (2000). Bionomics of the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae*. *University of California Plant Protection Quarterly* 10: 1-5.

Rice RE (1999) Olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae*. *UC Plant Protection Quarterly*, 9, 2.

Rice RE, Phillips PA, Stewart-Leslie J, Sibbett GS (2003) Olive fruit fly populations measured in centra

Roderick GK, Navajas M. Genes in new environments: genetics and evolution in biological control. *Nat Rev Gen* 4: 889-899.

Rossi A. M. Estes¹, D. Nestel², A. Belcari³, A. Jessup⁴, P. Rempoulakis⁵ & A. P. Economopoulos A basis for the renewal of sterile insect technique for the olive fly, *Bactrocera oleae*.

S. Patricia, Stock; John, Vanderberg; Itamar, Glazer; Noel, Boemare (2009). "1.6.2. Primers development and virus identification strategies". *Insect Pathogens: Molecular Approaches and Techniques*. CAB International. p. 22. ISBN 978-1-84593-478-1.

Sacantanis KB (1957) Οι επιστημονικές βάσεις μιας ορθολογιστικής καταπολέμησης του δάκου της ελιάς. *Georonica*, 33: 219-310; 340-345.

Saccone G, Pane A, Polito LC (2002) Sex determination in flies, fruitflies and butterflies. *Genetica* 116: 15–23.

SACCONE, G., PELUSO, I., ARTIACO, D., GIORDANO, E., BOPP, D. and POLITO, L.C. (1998). The *Ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sexdetermining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated. *Development* 125: 1495–1500.

Saiki, R.; Gelfand, D.; Stoffel, S.; Scharf, S.; Higuchi, R.; Horn, G.; Mullis, K.; Erlich, H. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase". *Science* 239 (4839): 487–491.

Saiki, R.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.; Horn, G.; Erlich, H.; Arnheim, N. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia". *Science* 230 (4732): 1350–1354.

Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY.

Sambrook L, Fritch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Santiago-Álvarez C., Quesada-Moraga E. 2007. The olive fruit fly. *Oleae* 26: 60–61.

Silvestri F (1916) Prima notizia sulla presenza della mosca delle olive e di un parassita di essa in India. *Rendiconti Della Reale Accademia dei Lincei*, 25, 424.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.

Stavrakis GN and Fytizas E (1980) Med. Fac. Landbouw. Rijksuniv. Gent., 45(3): 587-592.

Stratikopoulos EE, Augustinos AA, Petalas YG, Vrahatis MN, Mintzas A, Mathiopoulos KD, Zacharopoulou A: An integrated genetic and cytogenetic map for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, based on microsatellite and morphological markers. *Genetica*. 2008, 133: 147-157.

Thornhill, R., Alcock, J., 1983. Chapter 4: Timing of Mate Location, in: *The Evolution of Insect Mating Systems*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts and London, England, p. 547.

Torti C, Gomulski LM, Moralli D, Raimondi E, Robertson HM, et al. (2000) Evolution of different subfamilies of mariner elements within the medfly genome inferred from abundance and chromosomal distribution. *Chromosoma* 108: 523–532.

Tsitsipis JA (1977) An improved method for the mass rearing of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae). *Z. Angrew. Entomol.*, 83: 419-426.

TSITSIPIS, J. A. 1975. An improved method for the mass rearing of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) *Z. Angrew. Entomol.* 83: 419- 426.

TSITSIPIS, J. A., AND A. KONTOS. 1983. Improved solid adult diet for the olive fruit fly *Dacus oleae*. *Entomol. Hellenica* 1: 24-29

Tsoumani K, Mathiopoulos KD (2011). *J Appl Entomol* 136: 626-31.

Tweedie JW, Stowell KM (2005) Quantification of DNA by agarose gel electrophoresis and analysis of the topoisomers of plasmid and M13 DNA following treatment with a restriction endonuclease or DNA topoisomerase I. *Biochem Mol Biol Educ*. 2005 Jan;33(1):28-33.

Tyagi S, Bratu DP and Kramer FR (1998) Multicolot molecular beacons for allele discrimination. *Nature Biotechnology*, 16: 49-53.

Tzanakakis ME and Stavrinides AS (1973) *Entomol. Exp. App.*, 16: 39-47.

TZANAKAKIS, M. E. 1989. Small Scale Rearing, pp. 105- 118 In A. S. Robinson and G. Hooper [eds.], *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3B. Amsterdam: Elsevier, 105-118.

TZANAKAKIS, M. E., A. P. ECONOMOPOULOS, AND J. A. TSITSIPIS. 1966. Improved artificial food media for larvae *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera:Tephritidae). *Z. Angrew. Entomol.* 59: 127-130.

TZANAKAKIS, M. E., A. P. ECONOMOPOULOS, AND J. A. TSITSIPIS. 1970. Rearing and nutrition of the olive fruit fly. 1. Improved larval diet and simple containers. *J. Econ. Entomol.* 63: 317-318.

TZANAKAKIS, M. E., AND A. P. ECONOMOPOULOS. 1967. Two efficient larval diets for continuous rearing of the olive fruit fly. *J. Econ. Entomol.* 60: 660-663.

Vontas JG, Hejasi 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.

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995) *Nucleic Acids Research*, 23: 4407.

Vossen P, Varela L, Devarenne A. (2006). Olive fruit fly. University of California Cooperative Extension - Sonoma County.

Wang DG, Fan JB, Siao CJ et al., (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, 280: 1077-1082.

Wang X-G, Johnson MW, Opp SB, Krugner R, Daane KM (2011) Honeydew and insecticide bait as competing food resources for a fruit fly and common natural enemies in the olive agroecosystem. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 139(2):128–137.

White 1973, p. 28.

Whitten MJ (1969). *J Econ Entomol* 62:272–273.

Willhoeft U, Franz G (1996) Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144: 737–745.

Willhoeft U, Franz G (1996) Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144: 737–745.

Willhoeft U, Franz G (1996) Identification of the sex-determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping.

Zambetaki A, Kleanthous K and Mavragani-Tsipidou P (1995) Cytogenetic analysis of Malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). *Genome*, 38: 1070-1081.

Zhou Q, Untalan PM, Haymer DS (2000) Repetitive A-T rich DNA sequences from the Y chromosome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genome* 43: 434–438.

Zohary D (1994) The wild genetic resources of the cultivated olive. *Acta Horticulturae*, 365, 62–65.

Δ. Παπαγιαννόπουλος στο λήμμα "Ελαία", Μεγάλη Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια Π. Δρανδάκη, Αθήνα.

Η καλλιέργεια της ελιάς, Υπουργείο Γεωργίας, Φυσικών Πόρων και Περιβάλλοντος, Τμήμα Γεωργίας, Κύπρος 7/2013.