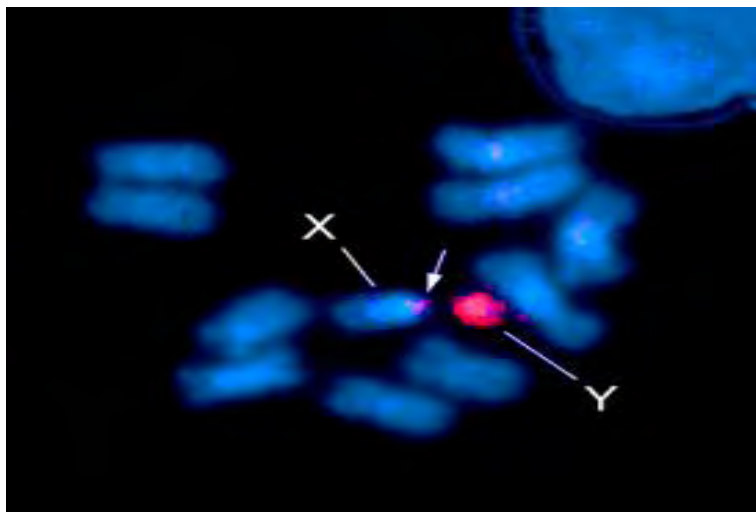




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ανάλυση της έκφρασης γονιδίων του Y
χρωμοσώματος του δάκου με πιθανή
συμμετοχή στη γονιμότητα του εντόμου



ΣΟΦΙΑ ΤΣΙΑΡΑ
ΛΑΡΙΣΑ 2017

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 ΠΔ 407/80 του τμήματος Βιοχημείας-Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Είναι όμορφο, αλλά και περίεργο το συναίσθημα όταν κάτι φτάνει στο τέλος του. Η αλήθεια είναι πως κάποιες μέρες ήταν πιο δύσκολες και μεγάλες από κάποιες άλλες. Ωστόσο, η κάθε μέρα ήταν διαφορετική και είχε να προσθέσει μία νέα εμπειρία, είτε μέσα από τις συζητήσεις μου με την Μαριλένα, είτε από τις συζητήσεις με τα υπόλοιπα κορίτσια του εργαστηρίου και το Λευτέρη φυσικά, είτε μέσα από συζητήσεις με την Κωνσταντίνα. Οι περιρρέουσες συζητήσεις που ακουγόταν είτε στο προσκήνιο, είτε στο παρασκήνιο ενώ γινόταν τα πειράματα αποτελούσαν σημαντική πηγή για να μαθαίνουμε νέα πράγματα ή να εμπλουτίζουμε τον τρόπο σκέψης μας και να επιλύουμε τα διάφορα προβλήματα που προέκυπταν.

Η συνεργασία μέσα στο εργαστήριο τόσο με την Μαριλένα και την Κωνσταντίνα, όσο και με τα κορίτσια ήταν εξαιρετική και δεν θα μπορούσα να έχω ζητήσει τίποτα καλύτερο από την πρώτη μου εμπειρία ως μέλος κάποιου Εργαστηρίου. Ευχαριστώ τον καθένα ξεχωριστά για την υπομονή που επέδειξε, τις ιδέες που μου μετέδωσε καθώς και την άψογη συμπεριφορά σε όλη τη διάρκεια της πτυχιακής μου.

Δεν θα μπορούσα παρά να ευχαριστήσω τον κύριο Μαθιόπουλο, ο οποίος ήταν παρών σε όλη την πορεία της πτυχιακής μου εργασίας και καθοδηγούσε τα βήματά μου. Η βοήθεια του ήταν πάντα πολύτιμη και έγκαιρη.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την κυρία Σαραφίδου, η οποία δέχτηκε να είναι μέλος της τριμελούς Επιτροπής και μου παρείχε πολύτιμη βοήθεια σε πολλές περιπτώσεις.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια και το στενό μου περιβάλλον για την κατανόηση που έδειξαν σε όλη την πορεία της πτυχιακής και την στήριξη που ο καθένας μου παρείχε με τον δικό του ιδιαίτερο τρόπο, βοηθώντας με να χαλαρώσω το άγχος που είχα κάποιες φορές.

Περίληψη

Ο φυλοκαθορισμός σε αντίθεση με άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες, δεν διαθέτει κάποιο αυστηρά συντηρημένο μηχανισμό ανάμεσα στα είδη των εντόμων, αλλά αντιθέτως τα φυλετικά χρωμοσώματα είναι εξαιρετικά μεταβλητές δομές που αλλάζουν μορφή αλλά και περιεχόμενο κατά την εξελικτική διαδικασία. Παρόλα αυτά, υπάρχουν, με κάποιες εξαιρέσεις βέβαια, κάποια συστήματα φυλοκαθορισμού τα οποία έχουν εμφανείς ομοιότητες στην δομή, την οργάνωση και την λειτουργία των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Η μελέτη των φυλετικών χρωμοσωμάτων είναι ένα από τα ραγδαία αναπτυσσόμενα πεδία της σύγχρονης έρευνας, όχι μόνο από την σκοπιά της συγκριτικής και της εξελικτικής βιολογίας, αλλά και από την σκοπιά της μοριακής βιολογίας. Η γνώση της δομής, της οργάνωσης και της λειτουργίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων επιτρέπει την ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνικών καταπολέμησης εντόμων τα οποία παρασιτούν σε διάφορα γεωργικά είδη με οικονομικό ενδιαφέρον. Τα συστήματα των φυλετικών χρωμοσωμάτων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διευκολύνουν την πρόβλεψη του φύλου των εντόμων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, την επιλογή μόνο του επιθυμητού φύλου, την αντιστροφή του ισοζυγίου των δυο φύλων κατά προτίμηση και την απελευθέρωση εντόμων μόνο του επιθυμητού φύλου σε προγράμματα SIT.

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας χρησιμοποιήθηκαν Υ-συνδεδεμένες αλληλουχίες που προέρχονται από ένα συνδυασμό μεθόδων αλληλούχησης του γονιδιώματος και του μεταγραφώματος του δάκου της ελιάς. Σκοπός ήταν να μελετηθεί το προφίλ έκφρασης γονιδιακών τόπων που εδράζονται μέσα σε αυτές τις αλληλουχίες και να γίνει *in silico* ανάλυσή τους. Τα επίπεδα έκφρασης καθορίστηκαν σε επιλεγμένα χρονικά στάδια της ανάπτυξης εντόμων και των δυο φύλων, καθώς και στο αναπαραγωγικό σύστημα των ενήλικων αρσενικών εντόμων. Τα δεδομένα που προέκυψαν αξιοποιήθηκαν για τη διερεύνηση του πιθανού τους ρόλου των Υ-συνδεδεμένων γονιδίων στη γονιμότητα του εντόμου.

Abstract

Mechanisms of sex determination, in contrast to other developmental processes, are not strictly conserved among different insect species; on the contrary, sex chromosomes are extremely labile structures that change in terms of morphology and gene content during the evolutionary process. Nonetheless, there are several mechanisms of sex determination that present high resemblance in the structure, organisation and function of sex chromosomes. The study of sex chromosomes consists one of the rapidly evolving fields of biology research, such as comparative and evolutionary biology, as well as molecular biology. Knowledge of the structure, organisation and function of sex chromosomes helps developing effective insect pest control techniques against various agricultural species of economic interest. Sex chromosome systems can be utilized in order to predict sex during early developmental stages, select only for the desired sex, reverse the ratio of two sexes and release of male only or female only insects in SIT programs.

*In the context of this study, Y-linked sequences of *Bactrocera oleae* derived from a combination of whole genome and transcriptome sequencing techniques were utilized. The aim was to study gene expression of gene loci harbored in these Y-linked sequences and analyse these sequences in silico. Expression levels were determined at several time checkpoints during male and female insect development, as well as in the reproductive system of male adult insects. The data conferred were used to determine whether these Y-linked loci play a putative role in male fertility.*

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	7
1.1. Συστήματα φυλοκαθορισμού και μοριακοί μηχανισμοί εδραίωσης του φύλου	7
1.2. Εξέλιξη του Υ χρωμοσώματος στα δίπτερα.....	10
1.3. Δομή και οργάνωση του Υ χρωμοσώματος.....	14
1.4. Γονίδια του Υ χρωμοσώματος.....	17
1.5. Πρακτικές εφαρμογές: έλεγχος του φύλου.....	19
1.6. Ο δάκος της ελιάς και η σημασία του.....	24
1.7. Τα χρωμοσώματα του δάκου της ελιάς.....	27
1.8. Αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου της ελιάς.....	29
2. Σκοπός.....	31
3. Μέθοδοι-Υλικά.....	32
3.1. Βιολογικό υλικό: εργαστηριακός πληθυσμός <i>Bactrocera oleae</i>	32
3.2. Συλλογή ιστών.....	32
3.2.1. Συλλογή αυγών.....	32
3.2.2. Συλλογή προνυμφών.....	33
3.2.3. Συλλογή νυμφών.....	33
3.2.4. Συλλογή ιστών από ενήλικα έντομα.....	34
3.3. Απομόνωση ολικού RNA από τους επιλεγμένους ιστούς.....	34
3.4. Απομόνωση ολικού DNA από τους επιλεγμένους ιστούς.....	35
3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.....	36
3.5.1. Απλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης.....	36
3.5.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (<i>quantitative real-time PCR, qRT-PCR</i>).....	38
3.6. Ηλεκτροφόρηση του DNA.....	40
3.7. Επεξεργασία με DNAση.....	41
3.8. Αντίστροφη μεταγραφή και δημιουργία cDNA.....	42
3.9. Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων.....	42
4. Αποτελέσματα.....	43
4.1 Επιλογή των γονιδίων.....	43
4.2. Κατεργασίες του ολικού DNA των δειγμάτων.....	44
4.3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων της <i>Real-time PCR</i>	45
4.3.1 Το γονίδιο 4074.....	46
4.3.1.1 Προφίλ έκφρασης γονιδίου 4074.....	46
4.3.1.2. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	47
4.3.2. Το γονίδιο AB12.....	49
4.3.2.1. Προφίλ έκφρασης γονιδίου AB12.....	49

4.3.2.2. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	50
4.3.3. Το γονίδιο 6873.reg1.....	51
4.3.3.1. Προφίλ έκφρασης γονιδίου 6873.reg1.....	51
4.3.3.2. Βιοπληροφορική ανάλυση.....	52
4.4. Τα γονίδια 2952 και 3738.....	53
5. Συζήτηση.....	54
6. Παράρτημα.....	58
7. Βιβλιογραφικές Παραπομπές.....	60

1. Εισαγωγή

1.1. Συστήματα φυλοκαθορισμού και μοριακοί μηχανισμοί εδραίωσης του φύλου

Ο καθορισμός του φύλου αναφέρεται στη διαδικασία με την οποία ένας σεξουαλικά αναπαραγόμενος οργανισμός ξεκινάει τη διαφοροποίησή του ως αρσενικός ή θηλυκός εκπρόσωπος του είδους. Η ύπαρξη συστημάτων φυλοκαθορισμού εξασφαλίζει την επιτυχή αναπαραγωγή και διαιώνιση των ειδών. Οι μηχανισμοί με τους οποίους συντελείται ο φυλοκαθορισμός χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ποικιλομορφία και πλαστικότητα μεταξύ των διαφόρων οργανισμών. Τέτοιου βαθμού ποικιλομορφία δεν συναντάται συνήθως σε άλλες αναπτυξιακές διαδικασίες. Είναι ενδεικτικό το γεγονός πως δεν υπάρχει κάποιο συγκεκριμένο γονίδιο το οποίο πυροδοτεί την έναρξη της διαδικασίας με καθολική αντιπροσώπευση σε όλα τα είδη. Ακόμη κι όταν υπάρχουν κοινά γονίδια σε διαφορετικούς οργανισμούς, συχνά εκφράζονται με διαφορετική σειρά κατά μήκος του μονοπατιού φυλοκαθορισμού.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους καθορίζεται το φύλο έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα επανειλημμένες φορές, όπως υποδηλώνει η τυχαία κατανομή τους στο φυλογενετικό δέντρο των σπονδυλωτών (Janzen & Phillips, 2006). Επιπλέον, ακόμη και τα στενά συγγενικά είδη μπορεί να διέπονται από διαφορετικούς μηχανισμούς, γεγονός που υποδηλώνει ότι υπάρχει μικρός περιορισμός στις μεταβάσεις μεταξύ των συστημάτων. Τα είδη παραδοσιακά ταξινομούνται με βάση το αν ο καθορισμός του φύλου διέπεται από γενετικούς παράγοντες (GSD, Genetic Sex Determination) ή περιβαλλοντικούς παράγοντες (ESD, Environmental Sex Determination), όπως για παράδειγμα η διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών ή η θερμοκρασία (TSD). Ωστόσο, έχουν εντοπιστεί πολλά είδη σπονδυλωτών στα οποία λειτουργούν συγχρόνως ή και διαδοχικά μηχανισμοί GSD και ESD (Ezaz *et al.*, 2006; Holleley *et al.*, 2015).

Τα περισσότερα θηλαστικά έχουν αναπτύξει ετερόμορφα φυλετικά χρωμοσώματα, και ως εκ τούτου βασίζονται στο σύστημα φυλοκαθορισμού XY. Το χρωμόσωμα Y φέρει το γονίδιο *sry* (sex determining region Y gene), το οποίο κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό παράγοντα ο οποίος επάγει την ανάπτυξη των όρχεων (Sinclair *et al.*, 1990; Koorman *et al.*, 1991). Το *sry* είναι μέλος της οικογένειας γονιδίων SRY-box (Sox), άλλα μέλη της οποίας είναι ο στόχος του *sry*, το γονίδιο *sox9* (Bishop *et al.*, 2000; Vidal *et al.*, 2001), καθώς και τα γονίδια *sox10* (Polanco *et al.*, 2010) και *sox3* (ο εξελικτικός πρόγονος του *sry*, Bergstrom *et al.*, 2000). Τα γονίδια αυτά μπορούν να υποκαταστήσουν το *sry* εάν εκφραστούν τη σωστή στιγμή και στο σωστό μέρος. Το μοντέλο εξέλιξης του *sry* προτείνει πως μία αλληλομορφική αλλαγή στην περιοχή του εκκινητή ή του ενισχυτή του γονιδίου *sox3* οδήγησε στην έκφρασή του στα σωματικά κύτταρα της πρώιμης γονάδας, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της ανάπτυξης των όρχεων και την εμφάνιση ενός ζεύγους φυλετικών χρωμοσωμάτων XY (Sato *et al.*, 2010). Μόλις ένα χρωμόσωμα αποκτήσει ένα γονίδιο το οποίο προωθεί την εδραίωση του ενός φύλου έναντι του άλλου, τότε τείνει να συσσωρεύσει κι άλλα γονίδια τα οποία αυξάνουν την αρμοστικότητα αυτού του φύλου (Graves, 1995). Για παράδειγμα το Y χρωμόσωμα φέρει επίσης πολλαπλά γονιδιακά αντίγραφα τα οποία

εμπλέκονται στην βελτιστοποίηση της σπερματογένεσης, κι έτσι ευνοείται η διατήρηση και η κληρονόμηση του Y χρωμοσώματος στους αρσενικούς απογόνους.

Τα περισσότερα διαθέσιμα στοιχεία για τον φυλοκαθορισμό στα σπονδυλωτά αφορούν τον ποντικό. Στα αρχικά στάδια της ανάπτυξης, το μεταγράφημα των κυττάρων τόσο στην XX όσο και στη XY γονάδα είναι σχεδόν πανομοιότυπο και "προκατειλημμένο" να ακολουθήσει μία πορεία διαφοροποίησης προς θηλυκό ζώο (Jameson *et al.*, 2012). Σε αυτό το στάδιο, στην XY γονάδα λειτουργεί ταυτόχρονα ένα θηλυκό και ένα αρσενικό δίκτυο (Munger *et al.*, 2009). Στους ποντικούς που φέρουν Y χρωμόσωμα εκφράζεται το γονίδιο *sry*, και ενεργοποιείται ο καθοδικός στόχος *sox9*. Η πρωτεΐνη SOX9 αλληλεπιδρά με θετική ανατροφοδότηση με τον αυξητικό παράγοντα των ινοβλαστών FGF9, του οποίου η κύρια λειτουργία είναι να καταστέλλει τον παράγοντα Wnt4 και με αυτόν τον τρόπο τη διαφοροποίηση προς θηλυκό ζώο. Απώλεια του *Fgf9* οδηγεί σε θετική ρύθμιση του Wnt4 και προκαλεί αναστροφή του φύλου στο θηλυκό (Colvin *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2006). Παρόμοιες ανταγωνιστικές σχέσεις έχουν αναφερθεί και μεταξύ του *sox9* και άλλων μελών του μονοπατιού Wnt, συμπεριλαμβανομένων της R-spondin 1 (*Rspo1*) και της κατενίνης β-1 (*Ctnnb1*) (Lavery *et al.*, 2012; Nicol & Yao, 2015).

Το τωρινό σύστημα XY των θηλαστικών με το γονίδιο Sry στην κορυφή του αναπτυξιακού καταρράκτη εξελίχθηκε μεταξύ 166 και 148 *mya* και έχει παραμείνει σταθερό στα θηλαστικά, με λίγες γνωστές εξαιρέσεις.

Τα πτηνά έχουν επίσης ένα σταθερό ζευγάρι φυλετικών χρωμοσωμάτων με τη διαφορά ότι εξαρτώνται από ένα σύστημα ZW, και όχι XY. Στο σύστημα αυτό, τα θηλυκά είναι το ετερογαμετικό φύλο (Capel, 2017). Στα πτηνά, ο καθορισμός του φύλου ελέγχεται από τη δόση του γονιδίου *dsx* στο χρωμόσωμα Z καθώς και από τον μεταγραφικό παράγοντα DMRT1 (*mab-3* related transcription factor 1). Πιο συγκεκριμένα, τα αρσενικά έχουν δυο αντίγραφα του γονιδίου που κωδικοποιεί τον DMRT1, ενώ τα θηλυκά έχουν ένα. Το γονίδιο που κωδικοποιεί τον DMRT1 είναι ορθόλογο της οικογένειας γονιδίων (DM) που περιλαμβάνει τα γονίδια *dsx* and *mab-3*, τα οποία σχετίζονται με την διαφοροποίηση του φύλου στην *D. melanogaster* και τον *C. elegans* (Raymond *et al.*, 1998). Τα μέλη αυτής της οικογένειας έχουν εξελιχθεί επανειλημμένες φορές για τον έλεγχο της διαφοροποίησης σε πολλά είδη (Herpin *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 2013), αν και ο ρόλος τους στα θηλαστικά είναι να διατηρούν την αρσενική εξειδίκευση αφού εδραιωθεί (Raymond *et al.*, 2000; Krentz *et al.*, 2009).

Παρά την παρουσία του συστήματος ZW στις όρνιθες, έχει παρατηρηθεί πως αρσενικά ZZ αυγά μπορεί να υποστούν αναστροφή φύλου προς θηλυκά ύστερα από εφαρμογή οιστρογόνου κατά την κρίσιμη περίοδο του σχηματισμού της γονάδας και της επιλογής της πορείας διαφοροποίησης. Τα πτηνά μπορούν επίσης να αναπτυχθούν ως γυνανδρόμορφοι οργανισμοί, δηλαδή να έχουν αρσενικά χαρακτηριστικά στη μία πλευρά του σώματος τους και θηλυκά χαρακτηριστικά στην άλλη. Το φαινόμενο αυτό έχει αναφερθεί σε πολλά είδη, παρατηρείται όμως συχνότερα σε πτηνά και αρθρόποδα (συμπεριλαμβανομένων των πεταλούδων) (Arnold, 2004; Arnold *et al.*, 2013).

Σε αντίθεση με τα σχετικά σταθερά συστήματα GSD των ενδόθερμων οργανισμών, ο καθορισμός του φύλου στους εξώθερμους οργανισμούς εμπλέκει τόσο συστήματα GSD, όσο

και TSD, ενώ παράλληλα εμφανίζει μία εξάρτηση και από την επίδραση διαφόρων ορμονών. Μέσα σε κάθε φυλογενετική τάξη, υπάρχουν παραδείγματα χρησιμοποίησης των συστημάτων XX/XY, ZZ/ZW, καθώς και του TSD και της ρύθμισης από ορμόνες. Τακτικά συμβαίνουν εξελικτικές μεταπτώσεις μεταξύ των συστημάτων GSD και TSD στα φυλογενετικά δένδρα των χελωνών και των σαυρών (Janzen & Phillips, 2006). Η TSD έχει μελετηθεί εκτενέστερα στα ερπετά. Η εκκόλαψη του αυγού σε διαφορετικές θερμοκρασίες κατά τη διάρκεια του αναπτυξιακού παραθύρου μέσα στο οποίο αναπτύσσεται η γονάδα επηρεάζει το ποσοστό των αρσενικών και θηλυκών απογόνων (Bull, 1980). Η θερμοκρασία που παράγει >90% αρσενικούς απογόνους συνήθως διαφέρει από τη θερμοκρασία που αποφέρει >90% θηλυκούς απογόνους μόνο κατά ~5 °C και κυμαίνεται μεταξύ των διαφόρων ειδών. Γενικά, είναι απίθανο το φύλο σε κάποιον οργανισμό να καθορίζεται μόνο υπό την επίδραση ενός συστήματος TSD (Capel, 2017).

Τα ψάρια επίσης χρησιμοποιούν έναν συνδυασμό μηχανισμών GSD και ESD. Περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η πυκνότητα του πληθυσμού, καθώς και οπτικά ερεθίσματα μπορούν να παίζουν σημαντικό ρόλο στον φυλοκαθορισμό. Κάποια είδη έχουν αναπτύξει XY ετερογαμετικά συστήματα, τα οποία εξελίχθηκαν όμως ανεξάρτητα από αυτά των θηλαστικών. Άλλα είδη χρησιμοποιούν συστήματα ZW, και πολλά συγγενικά είδη χρησιμοποιούν και τα δύο ετερογαμετικά συστήματα (Mank & Avise, 2009). Το γονίδιο που συνήθως ξεκινάει την διαφοροποίηση ποικίλλει ανάμεσα στα είδη, όμως ένας περιορισμένος αριθμός γονιδίων μπορεί να παίξει αυτόν τον ρόλο, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων της οικογένειας Sox και της οικογένειας DmrtH (Marshall Graves & Peichel, 2010; Graves, 2013). Ακόμη, κάποια είδη έχουν ομομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα που δεν είναι καλά διαφοροποιημένα, φέρουν όμως ένα γονίδιο που ελέγχει την διαφοροποίηση του φύλου (Devlin & Nagahama, 2002). Ορισμένα είδη ψαριών μάλιστα υφίστανται αναστροφή του φύλου τους που ρυθμίζεται από νευροενδοκρινή και οπτικά ερεθίσματα.

Μεταξύ των ειδών με φυλετικά χρωμοσώματα, υπάρχουν συστήματα φυλοκαθορισμού XY, όπως αυτό στη *Drosophila melanogaster*, καθώς και συστήματα ZW, όπως αυτά στις πεταλούδες και τους σκώρους. Σε κάποια είδη, όπως στη μύγα *Megaselia scalaris*, το X και το Y είναι ομομορφικά και δε μπορούν να διακριθούν μεταξύ τους στο μικροσκόπιο (Willhoeft & Traut, 1990). Στις πεταλούδες, το χρωμόσωμα W είναι γενικά πολύ μικρότερο από το Z και σχηματίζει ετεροχρωματινικά σωμάτια μέσα στα κύτταρα (Traut *et al.*, 2007). Σε είδη όπως οι ακρίδες, οι γρύλοι και οι κατσαρίδες, τα αρχικά Y χρωμοσώματα έχουν χαθεί τελείως και τα αρσενικά φέρουν ένα μόνο χρωμόσωμα X, ενώ τα θηλυκά δύο.

Αυτή η ποικιλία στους κυτταρογενετικούς μηχανισμούς που καθορίζουν το φύλο συνάδει με την ποικιλία των γενετικών μονοπατιών που προκαλούν τελικά τη φυλετική διαφοροποίηση. Στη *D. melanogaster*, το φύλο καθορίζεται από την αναλογία του αριθμού των χρωμοσωμάτων X προς τον αριθμό των αυτοσωμάτων (Cline, 1993). Τα γονίδια-κλειδιά που εμπλέκονται στο μοριακό μονοπάτι είναι το *slx*, το *tra* και το *dsx*. Το αρχικό σήμα είναι η ποσότητα των αντιγράφων διαφόρων γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και βρίσκονται στο χρωμόσωμα X, όπως για παράδειγμα των *sis-a*, *sis-b*, *sis-c* και *run*, σε σχέση με την ποσότητα των αντιγράφων αυτοσωμικών γονιδίων, όπως το *dpr*. Η σχετική αναλογία καθορίζει

αν το γονίδιο *slx* θα μεταγραφεί από τον πρώιμο υποκινητή του P_e , προκαλώντας μία πρώιμη αύξηση της ποσότητας της πρωτεΐνης *Sxl* μόνο στα θηλυκά έντομα, όπου η αναλογία είναι 2:1 (Cline, 1993). Άλλα βήματα στο μονοπάτι περιλαμβάνουν το εναλλακτικό μάτισμα φυλοκαθοριστικών γονιδίων, το οποίο αποδίδει μη λειτουργικές πρωτεΐνες *Six* από τον όψιμο υποκινητή P_m στα αρσενικά έντομα, μη λειτουργικές πρωτεΐνες *Tra* στα αρσενικά έντομα, ή πρωτεΐνες με διαφορετικές καρβοξυ-τελικές επικράτειες σε κάθε φύλο (*dsx*), οι οποίες είναι φυλο-ειδικές (Pomiankowski *et al.*, 2004).

Η οικιακή μύγα *Musca domestica*, επίσης χρησιμοποιεί το γονίδιο *dsx* στο μονοπάτι φυλοκαθορισμού της (Hediger, *et al.*, 2004; Hediger *et al.*, 2010). Πολύ πρόσφατα βρέθηκε ο παράγοντας αρρενοποίησης που κωδικοποιείται από το γονίδιο *Musca domestica male determiner (Mdmd)* (Sharma *et al.*, 2017).

Στο κουνούπι *Anopheles gambiae*, τα αρσενικά είναι το ετερογαμετικό φύλο, και το χρωμόσωμα X πιθανώς είναι ομόλογο με αυτό της *Drosophila* (Zdobnov *et al.*, 2002). Ο παράγοντας αρρενοποίησης αυτών των κουνουπιών ταυτοποιήθηκε ως το γονίδιο *Yob*, το οποίο ενεργοποιεί τον καταρράκτη του *dsx*, χωρίς να είναι γνωστό το ενδιάμεσο μόριο. Τα κουνούπια του γένους *Aedes* έχουν ομομορφικά χρωμοσώματα (Presgraves & Orr, 1998) και ο παράγοντας αρρενοποίησης τους κωδικοποιείται από το γονίδιο *Nix* (Hall *et al.*, 2015).

Στα λεπιδόπτερα, το αρχικό σήμα ποικίλλει, καθώς εμπλέκονται τόσο ένας παράγοντας από το Z όσο και ένας επικρατής παράγοντας από το W (Traut *et al.*, 2007). Το χρωμόσωμα W του μεταξοσκώληκα *Bombyx mori* για παράδειγμα, κωδικοποιεί έναν επικρατή παράγοντα θηλεοποίησης, τον *fem*, ενώ η αρρενοποίηση είναι η προκαθορισμένη πορεία (Hashimoto, 1933). Το γονίδιο *slx* χρησιμοποιείται μόνο στην *Drosophila melanogaster* ως φυλοειδικό ρυθμιστικό γονίδιο, παρόλο που υπάρχει και στον *Bombyx mori*, καθώς και σε κάποια ακόμη έντομα. Το ενδιάμεσο σήμα, δηλαδή το γονίδιο *tra*, που είναι κοινό μεταξύ των οικογενειών των διπτέρων, στα λεπιδόπτερα δεν συμμετέχει στον καθορισμό του φύλου (Traut *et al.*, 2007). Παρόλα αυτά, το γονίδιο *dsx* ματίζεται εναλλακτικά σε αρσενικά και θηλυκά έντομα, γεγονός που υποδηλώνει πως μάλλον εμπλέκεται στον φυλοκαθορισμό και στην τάξη των λεπιδοπτέρων (Ohbayash *et al.*, 2001).

Εκτός από τις πεταλούδες συστήματα ZW έχουν βρεθεί και σε κάποια είδη της οικογένειας των Tephritidae (*Tephritis californica*).

1.2. Εξέλιξη του Υ χρωμοσώματος στα δίπτερα

Σε πολλά ανώτερα Diptera (υποτάξη Brachycera), συμπεριλαμβανομένης της *Drosophila*, ο βασικός καρυότυπος (2n=12) αποτελείται από 5 ζεύγη μεγάλων ευχρωματινικών ράβδων (καλούνται στοιχεία Muller A–E στη *Drosophila* και το καθένα περιέχει πάνω από 2000 γονίδια) και από ένα μικρότερο ετεροχρωματινικό χρωμόσωμα σε σχήμα τελείας (στοιχείο F στην *Drosophila* και περιέχει περίπου 100 γονίδια) (Muller, 1940). Το γονιδιακό περιεχόμενο των στοιχείων Muller είναι υψηλά συντηρημένο μεταξύ των διαφόρων ομάδων των διπτέρων.

Ανάμεσα στις οικογένειες των διπτέρων εντοπίζονται, όμως, πολλές διαφορετικές

διαμορφώσεις των φυλετικών χρωμοσωμάτων. Από αυτές τις διαμορφώσεις, η διαμόρφωση του μικρού χρωμοσώματος σε σχήμα τελείας (small dot chromosome) χρησιμοποιείται επανειλημμένα ως το φυλετικό χρωμόσωμα, και πιθανώς αυτή η διαμόρφωση απαντιόνταν στον προγονικό καρυότυπο των ανώτερων διπτέρων. Ωστόσο, έχουν ανιχνευτεί είδη που φέρουν μη διαφοροποιημένα φυλετικά χρωμοσώματα, είδη στα οποία άλλα χρωμοσώματα έχουν αντικαταστήσει το μικρό χρωμόσωμα-τελεία ως φυλετικά χρωμοσώματα, καθώς και είδη στα οποία πάνω από τρία χρωμοσώματα ενσωματώθηκαν στα φυλετικά χρωμοσώματα (Vicoso & Bachtrog, 2015).

Τα διαθέσιμα δεδομένα υποστηρίζουν πως οι μύγες της οικογένειας Tipulidae, τα κουνούπια (Culicidae, Chironimidae, Chaoboridae) και οι μύγες της οικογένειας Psycholidae αποτελούν τις αρχαιότερες γενεαλογικές γραμμές, ενώ οι οικογένειες Scatopsidae και Cecidomyiidae είναι αδελφές ομάδες με τα ανώτερα Diptera (Brachycera) (Wiegmann et al., 2011).

Η οικογένεια Tipulidae χαρακτηρίζεται από διαφοροποιημένα φυλετικά χρωμοσώματα, με το μικρό χρωμόσωμα (στοιχείο F) να μεταβιβάζεται ως το χρωμόσωμα X. Οι οικογένειες Culicidae, Chironimidae, Chaoboridae και Psychodidae δεν διαθέτουν διαφοροποιημένα φυλετικά χρωμοσώματα, με εξαίρεση το γένος Anopheles (Culicidae) το οποίο έχει αποκτήσει ένα νέο ζεύγος φυλετικών χρωμοσωμάτων (αντιστοιχεί στο στοιχείο A). Στις οικογένειες Scatopsidae και Cecidomyiidae, το μικρό χρωμόσωμα μεταβιβάζεται επίσης ως φυλετικό χρωμόσωμα, αλλά στην δεύτερη οικογένεια το φυλετικό χρωμόσωμα έχει ενσωματώσει επιπρόσθετα χρωμοσωμικά στοιχεία (στοιχεία C και D και μέρος του στοιχείου E).

Οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των διπτέρων δεν έχουν ξεκαθαριστεί ακόμη πλήρως, κι έτσι δεν είναι εύκολο να ανακατασκευαστεί η αλληλουχία του κοινού προγονικού τους φυλετικού χρωμοσώματος. Ένα πιθανό σενάριο είναι πως όλα τα δίπτερα είχαν αρχικά ομομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα και η τελεία έγινε το φυλετικό χρωμόσωμα στην οικογένεια Tipulidae και στον πρόγονο των Scatopsidae, των Cecidomyiidae και των ανώτερων Diptera. Εναλλακτικά, μπορεί η τελεία να ήταν το προγονικό φυλετικό χρωμόσωμα και να επανήλθε σε αυτοσωμικό τρόπο κληρονομής στα κουνούπια και στα Psychodidae (Vicoso & Bachtrog, 2015).

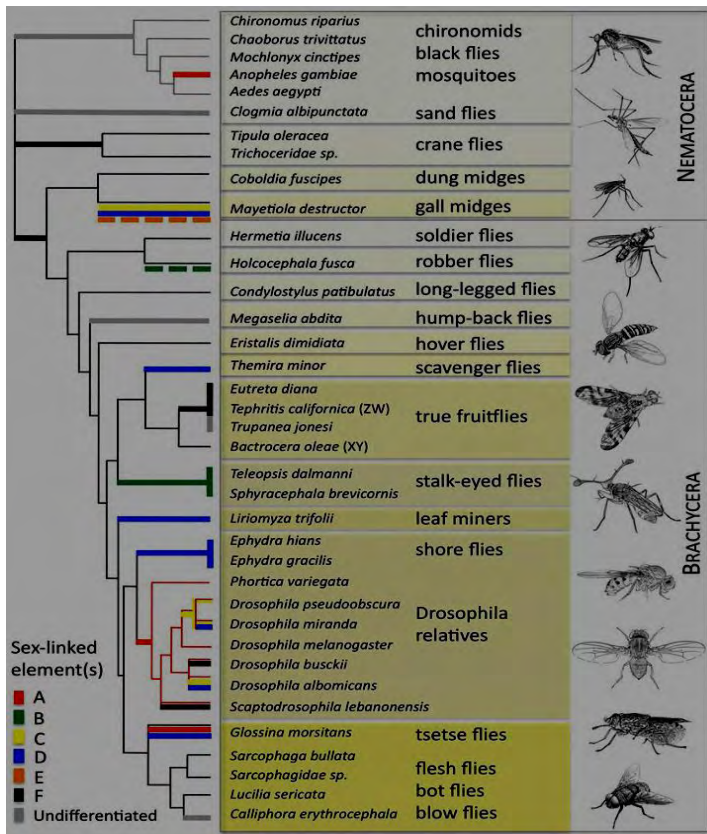
Όσον αφορά τα να ανώτερα Diptera, η τελεία μεταβιβάζεται ως το φυλετικό χρωμόσωμα στις γενεαλογικές γραμμές των Brachycera οι οποίες απέκλιναν νωρίς, όπως οι οικογένειες Stratiomyidae και Dolichopodidae, ενισχύοντας την υπόθεση πως η τελεία αποτελεί το προγονικό φυλετικό χρωμόσωμα όλων των ανώτερων Diptera. Η τελεία είναι το φυλετικό χρωμόσωμα σε πολλές οικογένειες διπτέρων και διατηρεί αυτόν τον ρόλο σε κάποιες γενεαλογίες, συμπεριλαμβανομένων των Tephritidae, των Calliphoridae και των Sarcophagidae (Εικόνα 1). Έτσι το στοιχείο F έχει παραμείνει συνδεδεμένο με το φύλο για πάνω από 200 εκατομμύρια χρόνια σε κάποιες οικογένειες διπτέρων. Επίσης, το γονιδιακό περιεχόμενο του μικρού χρωμοσώματος είναι συντηρημένο καθ' όλη την εξέλιξη των δίπτερων. Ακόμη και στην υποοικογένεια Tephritinae, η οποία έχει υιοθετήσει ένα σύστημα φυλοκαθορισμού ZW, το ετερογαμετικό φύλο, δηλαδή τα θηλυκά χρησιμοποιούν την τελεία ως φυλετικό χρωμόσωμα.

Σε κάποιες οικογένειες ανώτερων δίπτερων, έχουν προστεθεί επιπρόσθετα χρωμοσώματα στο προγονικό φυλετικό χρωμόσωμα, όπως για παράδειγμα συνέβη στο χρωμόσωμα X της μύγας τσετσε, το οποίο προέκυψε από την ενσωμάτωση των χρωμοσωμικών στοιχείων A και D στο αρχέγονο χρωμόσωμα X (στοιχείο F).

Σε άλλες οικογένειες, ένα διαφορετικό χρωμοσωμικό στοιχείο έχει αντικαταστήσει την τελεία ως φυλετικό χρωμόσωμα, όπως για παράδειγμα συνέβη με το χρωμοσωμικό στοιχείο A ανεξάρτητα στα Drosophilidae και στα κουνούπια *A. gambie* (Εικόνα 1).

Τέλος, άλλα είδη Brachycera, όπως η μύγα *Megaselia abdita* (Phoridae), έχουν απολέσει τα διαφοροποιημένα φυλετικά τους χρωμοσώματα. Το στενά συγγενικό είδος *Megaselia scalaris* έχει τρία χρωμοσωμικά ζεύγη, από τα οποία τα δύο είναι μετακεντρικά, το ένα ακροκεντρικό, ενώ δεν υπάρχει ελεύθερο μικρό χρωμόσωμα. Ένα από τα μετακεντρικά χρωμοσώματα περιέχει το γονίδιο αρρενοποίησης, αλλά δεν παρουσιάζει σημάδια μορφολογικής διαφοροποίησης, ενώ σε κάποιους πληθυσμούς ο γενετικός τύπος του γονιδίου αρρενοποίησης μπορεί να βρίσκεται σε οποιοδήποτε από τα δυο αυτοσώματα. Αυτό υποδεικνύει πως το ζεύγος των χρωμοσωμάτων X και Y είναι ακόμα σε αρχικά στάδια εξέλιξης σε αυτό το είδος, και πως μόνο ένας μικρός γενετικός τύπος διαφέρει ανάμεσα στα δυο φυλετικά χρωμοσώματα (young sex chromosome) (Traut, 2010).

Όλες αυτές οι διαφορετικές διαμορφώσεις των φυλετικών χρωμοσωμάτων που περιγράφηκαν απεικονίζονται στην Εικόνα 1, όπου γίνεται και ιδιαίτερη αναφορά στην οικογένεια Tephritidae .



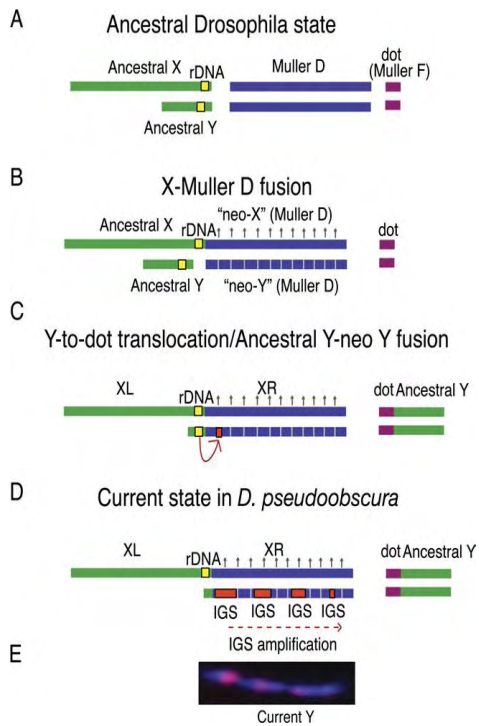
Εικόνα 1. Φυλογενετικό δέντρο της τάξης των διπτέρων το οποίο αναπαριστά τις φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ των ειδών όσον αφορά την εξέλιξη του Y χρωμοσώματος. Η σύγκριση των γονιδιωμάτων διαφορετικών ειδών *Drosophila* έχει υποδείξει πως 6 διαφορετικά χρωμοσώματα, ή αλλιώς στοιχεία Muller (Muller elements A-F), αποτελούν τους δομικούς λίθους του γονιδιώματος σε όλα αυτά τα είδη. Αυτή η συντήρηση των στοιχείων Muller επεκτείνεται και εκτός των ειδών *Drosophila*, στις μύγες της οικογένειας Tephritidae, οι οποίες πιστεύεται πως απέκλιναν από την *Drosophila* πριν από περίπου 60-70 εκατομμύρια χρόνια. Πάνω από το 90% των γονιδίων βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα στις δυο οικογένειες, ωστόσο η σειρά με την οποία βρίσκονται πάνω στα χρωμοσώματα είναι διαφορετική. Τα δεδομένα υποστηρίζουν πως τα φυλετικά χρωμοσώματα των Tephritidae (στοιχείο Muller F) προέρχονται από τον πρόγονο του χρωμοσώματος 4 της *Drosophila* (dot chromosome 4). Εικόνα: Vicoso, B., & Bachtrog, D. (2015). Numerous Transitions of Sex Chromosomes in Diptera. *PLOS Biology*. doi:10.1371/journal.pbio.1002078.

Η εξέλιξη του Y χρωμοσώματος στην οικογένεια Drosophilidae

Όσον αφορά την οικογένεια Drosophilidae, το χρωμοσωμικό στοιχείο A είναι το προγονικό φυλετικό χρωμόσωμα, αλλά αρκετά είδη έχουν ενσωματώσει περαιτέρω χρωμοσωμικά στοιχεία στο προγονικό φυλετικό τους χρωμόσωμα σε διαφορετικά χρονικά σημεία κατά την εξέλιξή τους (neo-sex chromosomes).

Στη *Drosophila melanogaster*, το στοιχείο A μεταβιβάζεται ως το χρωμόσωμα X, ενώ το τωρινό μικρό χρωμόσωμα τελεία ήταν προγονικά ένα διαφοροποιημένο X χρωμόσωμα. Τα γονίδια που εντοπίζονται στο μικρό χρωμόσωμα της *Drosophila*, είναι X-συνδεδεμένα σε άλλα συγγενικά είδη (Tephritidae, Sarcophagidae, Stratiomyidae), ενώ τα X-συνδεδεμένα γονίδια της *Drosophila* είναι αυτοσωμικά σε αυτά τα είδη (Vicoso & Bachtrog, 2013).

Όμως, το γονιδιακό περιεχόμενο του χρωμοσώματος Y δεν είναι συντηρημένο ανάμεσα στα 12 είδη *Drosophila* των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί (Koerich *et al.*, 2008). Παρόλο που η προγονική αλληλουχία του Y πιθανώς περιείχε τουλάχιστον πέντε γονίδια (kl-3, kl-2, ORY, PRY, and PPr-Y; Koerich *et al.* 2008), το χρωμόσωμα Y δυο ειδών, των *Drosophila pseudoobscura* και *Drosophila persimilis*, έχει βρεθεί πως δεν περιέχει κανένα από αυτά τα Y-συνδεδεμένα γονίδια (Koerich *et al.* 2008). Αντιθέτως, το Y χρωμόσωμα τους, το οποίο είναι σημαντικό για την γονιμότητα των αρσενικών εντόμων (Morgan *et al.* 1930), μπορεί να έχει προκύψει από ένα γεγονός σύντηξης του X χρωμοσώματος με ένα αυτόσωμα (Carvalho and Clark 2005), το οποίο συνέβη στον πρόγονο αυτών των ειδών (White 1973). Με παρόμοιο μηχανισμό, όπως συμβαίνει και στην περίπτωση του Y χρωμοσώματος, στην περίπτωση της σύντηξης ενός X χρωμοσώματος με ένα αυτόσωμα, το χρωμόσωμα το οποίο είναι ομόλογο με το συντηγμένο αυτόσωμα θα διαχωρίζεται απέναντι από το συντηγμένο X-αυτόσωμα στα αρσενικά, κι έτσι αναφέρεται ως νέο-Y. Έχει προταθεί πως το Y χρωμόσωμα της *Drosophila pseudoobscura* έχει εξελιχθεί από ένα νέο-Y χρωμόσωμα το οποίο σχηματίστηκε κατά το γεγονός σύντηξης του X χρωμοσώματος με το αυτόσωμα στον πρόγονο (Carvalho & Clark, 2005)(Εικόνα 2). Παραδόξως, τα προγονικά Y-συνδεδεμένα γονίδια βρίσκονται σε ένα αυτόσωμα στην *D. pseudoobscura* (Carvalho & Clark, 2005; Koerich *et al.*, 2008). Αυτά τα γονίδια είναι επίσης πιθανό πως είναι αυτοσωμικά στα είδη *D. persimilis*, *D. miranda* (υποείδος *pseudoobscura*), *D. affinis* και *D. azteca* (υποείδος *affinis*), καθώς δεν είναι Y-συνδεδεμένα (Carvalho & Clark, 2005).



Εικόνα 2. Μοντέλο για την μετάθεση από το Y χρωμόσωμα προς το μικρό χρωμόσωμα στην *D. pseudoobscura*.

Το υπάρχον μοντέλο θεωρεί πως μετά την σύντηξη του Y χρωμοσώματος με το στοιχείο D (εικ. 3B), ο πρόγονος των *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. affinis* και *D. azteca* πέρασε από μια μεταβατική φάση στην οποία τόσο το προγονικό Y χρωμόσωμα, όσο και το πρώην αυτόσωμα D ζευγάρωναν με το συντηγμένο χρωμόσωμα (εικ. 3B). Ο συντηγμένος βραχίονας του χρωμοσώματος D, αναφέρεται ως το νέο-X χρωμόσωμα, ενώ το αρρενοειδικό ομόλογό του είναι το νέο-Y. Το νέο-Y μεταβιβάζεται όπως ένα κοινό Y χρωμόσωμα και γι' αυτό το λόγο εκφυλίστηκε (Charlesworth & Charlesworth, 2000). Το προγονικό Y χρωμόσωμα αντί να χαθεί, μετατέθηκε στο μικρό χρωμόσωμα. Το πιο πιθανό σενάριο είναι πως σχεδόν ολόκληρο το προγονικό Y χρωμόσωμα μετατέθηκε στο μικρό χρωμόσωμα, αλλά ένα μικρό κομμάτι του, το οποίο συμπεριλάμβανε και το rDNA, παρέμεινε ελεύθερο και αργότερα συντήχθηκε με το νέο-Y. Το νέο-Y χρωμόσωμα απέκτησε αντίγραφα των rDNA IGS είτε από το X χρωμόσωμα, μέσω εξωχρωμοσωμικών κυκλικών αντιγράφων των επαναλήψεων IGS (Pont *et al.*, 1987; Cohen *et al.*, 2003), ή εναλλακτικά τις απέκτησε από το προγονικό Y χρωμόσωμα αφού τα δυο χρωμοσώματα συντήχθηκαν. Οι αλληλουχίες IGS πολλαπλασιάστηκαν για να σχηματίσουν επαναλαμβανόμενες μονάδες και ο γενετικός τόπος rDNA του προγονικού Y χρωμοσώματος χάθηκε. Έτσι, αφού δεν μεταφέρθηκαν οι προγονικές αλληλουχίες IGS στο μικρό χρωμόσωμα, δεν υπήρχε περίπτωση να ζευγαρώσει το μικρό χρωμόσωμα εσφαλμένα με το X κατά την μείωση. Το μοντέλο αυτό λοιπόν προτείνει πως το τωρινό Y χρωμόσωμα είναι ένα εκφυλισμένο νέο-Y χρωμόσωμα το οποίο προέκυψε από την σύντηξη του X χρωμοσώματος με το στοιχείο D. Εικόνα: Larracuent, A. M., Noor, M. A. F., Clark, A. G. (2010). Translocation of Y-Linked Genes to the Dot Chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. *Mol. Biol. Evol.*, 27(7):1612–1620.

Όπως φαίνεται λοιπόν, η φύση και η δομή των φυλετικών χρωμοσωμάτων σε κάποια είδη είναι πολύ ρευστή, ενώ σε κάποια άλλα είδη είναι πιο συντηρημένη. Πάντως, στις περισσότερες περιπτώσεις τα Y χρωμοσώματα τείνουν να συγκεντρώνουν γονίδια που σχετίζονται με την εδραίωση του αρσενικού φύλου ή με την βελτίωση της αρμοστικότητας των αρσενικών, όπως θα γίνει ξεκάθαρο στις επόμενες ενότητες.

1.3. Δομή και οργάνωση του Y χρωμοσώματος

Η σύγκριση των γονιδιωμάτων διαφορετικών ειδών *Drosophila* έχει υποδείξει πως 6 διαφορετικά χρωμοσώματα, ή αλλιώς στοιχεία Muller (Muller elements A-F), αποτελούν τους δομικούς λίθους του γονιδιώματος σε όλα αυτά τα είδη. Αυτή η συντήρηση των στοιχείων Muller επεκτείνεται και εκτός των ειδών *Drosophila*, στις μύγες της οικογένειας Tephritidae, οι οποίες πιστεύεται πως απέκλιναν από την *Drosophila* πριν από περίπου 60-70 mYr ago. Πάνω από το 90% των γονιδίων βρίσκονται στο ίδιο χρωμόσωμα στις δυο οικογένειες, ωστόσο η σειρά με την οποία βρίσκονται πάνω στα χρωμοσώματα είναι διαφορετική. Τα δεδομένα υποστηρίζουν πως τα φυλετικά χρωμοσώματα των Tephritidae (Muller element F) προέρχονται από τον πρόγονο του χρωμοσώματος 4 της *Drosophila* (dot chromosome 4). Έτσι, δεν έχει

δημιουργηθεί κανένα νέο χρωμόσωμα στις δυο εξελικτικές γραμμές για πάνω από 10^9 γενιές. Αυτή η σταθερότητα στο χρωμοσωμικό επίπεδο χαρακτηρίζει όλα τα Diptera, συμπεριλαμβανομένων και των κουνουπιών και έρχεται σε αντίθεση με άλλες ζωϊκές ομάδες, στις οποίες ο αριθμός και η οργάνωση των χρωμοσωμάτων ποικίλλουν πάρα πολύ μεταξύ ειδών που έχουν αποκλίνει για πολύ λιγότερες γενιές σε σχέση με τα έντομα (Sved *et al.*, 2015).

Τα φυλετικά χρωμοσώματα της οικογένειας Drosophilae είναι το καλύτερα μελετημένο σύστημα ανάμεσα στα έντομα. Στην *D. melanogaster*, το Y χρωμόσωμα είναι μικρό, εντελώς ετεροχρωματινικό και αποτελείται κυρίως από επαναλαμβανόμενο DNA, καθώς και από DNA το οποίο προέρχεται από την ένθεση μεταθετών στοιχείων. Περιέχει μόνο 20 περίπου γονίδια, τα περισσότερα από τα οποία έχουν αρρενοειδικές λειτουργίες, όπως η συμμετοχή στην κινητικότητα του σπέρματος (Carvalho *et al.* 2000; Carvalho *et al.*, 2001; Vibranovski *et al.*, 2008). Η ηλικία αυτού του συστήματος υπολογίζεται πως είναι γύρω στα 60 εκατομμύρια χρόνια, με βάση την πληροφορία πως 5 Y-συνδεδεμένα γονίδια είναι κοινά ανάμεσα στα υπογένη *Drosophila* και *Sophophora* (Carvalho & Clark, 2005; Koerich *et al.*, 2008). Τα περισσότερα Y συνδεδεμένα γονίδια έχουν μέγεθος που ανέρχεται σε αρκετές Mb λόγω της ύπαρξης γιγαντιαίων ιντρονίων (Gatti & Pimpinell, 1983), τα οποία αποτελούνται από εκτεταμένες επαναλήψεις εκφυλισμένων μεταθετών στοιχείων και τμήματα δορυφορικού DNA. Τα αρσενικά έντομα *D. melanogaster* που στερούνται του Y χρωμοσώματος είναι βιώσιμα αλλά στείρα, γεγονός που συνηγορεί στο ότι τα Y-συνδεδεμένα γονίδια σχετίζονται με την γονιμότητα των αρσενικών εντόμων (Bridges, 1916; Brosseau, 1960).

Κανένα από τα Y-συνδεδεμένα γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί στην *D. melanogaster* δεν έχει προέλθει από κάποιο εκφυλισμένο ομόλογο στο X χρωμόσωμα, αλλά όλα έχουν αποκτηθεί από τα αυτοσώματα (Carvalho, 2002). Έτσι, συνάγεται πως σχεδόν όλα τα αρχικά γονίδια που εντοπίζονταν στο προγονικό Y χρωμόσωμα έχουν χαθεί από το Y, και πως τα γονίδια που εντοπίζονται τώρα στο Y έχουν προσαρτηθεί μεταγενέστερα εξαιτίας του αρρενοειδικού πλεονεκτήματος που προσφέρουν. Σε φυσικούς πληθυσμούς *D. melanogaster* καθώς και συγγενικών ειδών η αλληλουχία του Y χρωμοσώματος εμφανίζει μειωμένη ποικιλομορφία (Zuroncova & Eanes, 1999; Bachtrog *et al.*, 2006), η οποία πιθανώς αντανάκλα αυξημένη επιλογή σε επίπεδο ολόκληρου χρωμοσώματος, η οποία συνόδευσε την εγκαθίδρυση αυτών των γονιδίων. Η έλλειψη ομολογίας μεταξύ των X και Y χρωμοσωμάτων της *D. melanogaster* ενισχύει την άποψη πως το Y χρωμόσωμα στην *Drosophila* δεν είναι ένα εκφυλισμένο ομόλογο του X, αλλά αντίθετα, ίσως έχει προκύψει από ένα B χρωμόσωμα. Το υπεράριθμο αυτό χρωμόσωμα πιθανώς απέκτησε την ικανότητα να ζευγαρώνει με το X και να μεταβιβάζεται στα αρσενικά όπως ένα Y χρωμόσωμα (Hackstein *et al.*, 1996; Carvalho, 2002).

Ένα χαρακτηριστικό του Y χρωμοσώματος είναι η σπανιότητα των γονιδίων και η τάση να γίνεται ετεροχρωματινικό και να συσσωρεύει μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες ή μεταθετά στοιχεία (Pimpinelli *et al.*, 1995; Steinemann & Steinemann, 1998; Charlesworth & Charlesworth, 2000; Bergero & Charlesworth, 2009). Το Y χρωμόσωμα της *D. melanogaster* περιέχει περίπου 12 γονίδια και είναι εξ ολοκλήρου ετεροχρωματινικό. Ωστόσο, είναι δύσκολο να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τα αίτια του εκφυλισμού επειδή το σύστημα είναι πολύ παλιό και περιέχει πολύ λίγα υπολείμματα των διαδικασιών που οδήγησαν στον εκφυλισμό του.

Από την άλλη, συστήματα όπου έχουν εντοπιστεί πρόσφατα σχηματισμένα Y χρωμοσώματα που βρίσκονται ακόμη στην διαδικασία της διαφοροποίησης είναι πιο κατάλληλα για την μελέτη του φαινομένου. Πιο συγκεκριμένα, το νέο-Y χρωμόσωμα της *D. miranda*, το οποίο σχηματίστηκε πολύ πρόσφατα (~1,5 mya) (Bachtrog & Charlesworth, 2000; Bachtrog & Charlesworth, 2002) και περιέχει ακόμα πολλά από τα αρχικά του γονίδια (Steinemann & Steinemann, 1999; Bachtrog, 2003a), έχει αποδειχθεί χρήσιμο μοντέλο για την μελέτη του εκφυλισμού των Y χρωμοσωμάτων.

Ο εκφυλισμός του νέο-Y χρωμοσώματος της *D. miranda* χαρακτηρίζεται από 2 τύπους μοριακών αλλαγών. Αρχικά, τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες εκφυλίζονται, με αποτέλεσμα παραπάνω από τα μισά γονίδια του νέο-Y χρωμοσώματος να είναι μη λειτουργικά, να περιέχουν μεταλλάξεις που μετατοπίζουν το αναγνωστικό πλαίσιο ή να περιέχουν κωδικόνια λήξης (Bachtrog *et al.*, 2008). Τα εναπομείναντα γονίδια επιδεικνύουν ποικίλα σημάδια σταδιακού εκφυλισμού, όπως αυξημένο ρυθμό αμινοξικών υποκαταστάσεων (Bachtrog, 2003a) και μικρότερο περιορισμό στις ρυθμιστικές περιοχές (Bachtrog, 2005). Ο δεύτερος τύπος αλλαγής που αφορά τα εξελισσόμενα Y χρωμοσώματα είναι οι δομικές αλλαγές μεγάλης κλίμακας. Ένα μεγάλο ποσοστό της αλληλουχίας του Y χρωμοσώματος της *D. miranda* (~20%) αποτελείται από επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και μεταθετά στοιχεία, ενώ η σύσταση του νέο-X σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες στο ίδιο είδος είναι πολύ μικρή (~1%) (Bachtrog, 2003b; Bachtrog, 2005). Τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να επιδράσουν άμεσα στη λειτουργία των γονιδίων μέσω της ένθεσής τους σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες ή μέσω των ρυθμιστικών τους στοιχείων. Εναλλακτικά, τα μεταθετά στοιχεία μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές μεγάλης κλίμακας στην δομή της χρωματίνης επάγοντας την μετατροπή ολόκληρων χρωμοσωμικών περιοχών σε ετεροχρωματίνη, και με αυτών τον τρόπο απενεργοποιώντας πολλά γονίδια ταυτόχρονα (Gatti & Pimpinelli, 1992; Dorer & Henikoff, 1994; Lippman *et al.*, 2004). Στο νέο-Y χρωμόσωμα της *D. miranda* ήδη μεγάλα χρωμοσωμικά τμήματα έχουν αποκτήσει ετεροχρωματινική εμφάνιση, ενώ υπάρχει μία τεράστια συσσώρευση μεταθετών στοιχείων. Η πλήρωση με μη κωδικοποιητικές αλληλουχίες είναι ένα από τα πρώτα βήματα που συμβαίνουν σε νεοσχηματισμένα Y χρωμοσώματα.

Η αλληλεπίδραση ανάμεσα σε επιλεγμένους τόπους μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της απόδοσης της επιλογής, όταν ο ανασυνδυασμός είναι περιορισμένος ή ανύπαρκτος (Hill & Robertson, 1966). Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε συσσώρευση επιβλαβών μεταλλάξεων και μακροπρόθεσμα στον εκφυλισμό αυτών των περιοχών (Charlesworth & Charlesworth, 2000). Ανάλογα με τον τύπο και την ένταση της επιλογής υπάρχουν διάφορα εξελικτικά μοντέλα που μπορούν να εξηγήσουν αυτό το φαινόμενο και η συνεισφορά του κάθε μηχανισμού στον εκφυλισμό των Y χρωμοσωμάτων είναι υπό συζήτηση (Charlesworth & Charlesworth, 2000). Το κοινό στοιχείο όλων των μοντέλων είναι πως η επιλογή μεταξύ μεταλλάξεων που αλληλεπιδρούν μεταξύ τους μειώνει το μέγεθος του αποτελεσματικού πληθυσμού (N_e) μιας μη ανασυνδυαζόμενης περιοχής του γονιδιώματος κι ως εκ τούτου, η δύναμη της επιλογής (η οποία δίνεται από τον Nes , όπου s είναι ο συντελεστής επιλογής μιας μετάλλαξης) επίσης μειώνεται. Αυτό οδηγεί σε χαμηλότερα επίπεδα προσαρμογής σε περιοχές του γονιδιώματος

που ανασυνδυάζονται σε μικρό βαθμό, κι έτσι η πιθανότητα να διατηρηθεί μια ωφέλιμη μετάλλαξη είναι πολύ πιο μικρή από την πιθανότητα να εδραιωθεί μια βλαβερή μετάλλαξη (Charlesworth *et al.*, 2009).

Όταν εδραιωθεί μια ωφέλιμη μετάλλαξη σε έναν πληθυσμό, εδραιώνονται ταυτόχρονα πολύ γρήγορα μαζί της κι άλλες μεταλλάξεις που ήταν αρχικά συνδεδεμένες με αυτήν (Steinemann & Steinemann, 1998; Johnson & Barton, 2002; Bachtrog & Gordo, 2004). Με αυτόν τον τρόπο, μπορούν να εδραιωθούν βλαβερές μεταλλάξεις, υπό την προϋπόθεση ότι το όφελος που προσδίδει το αλληλόμορφο που επιλέγεται υπερσκελίζει τις επιδράσεις των επιβλαβών μεταλλάξεων (Johnson & Barton, 2002; Bachtrog & Gordo, 2004). Επειδή μακροπρόθεσμα επιβιώνουν μόνο τα Y χρωμοσώματα που είναι απαλλαγμένα από εξαιρετικά επιβλαβείς μεταλλάξεις, λόγω της μείωσης της απόδοσης της φυσικής επιλογής συσσωρεύονται ελαφρώς επιβλαβείς μεταλλάξεις σε μη ανασυνδυαζόμενες περιοχές του Y χρωμοσώματος (Charlesworth, 1996). Ακόμη, μπορεί να χαθούν αλληλόμορφα τα οποία φέρουν ελαφρώς ωφέλιμες μεταλλαγές κατά τύχη (Charlesworth, 1978). Χωρίς τον ανασυνδυασμό, η απώλεια των χρωμοσωμάτων αυτών δεν μπορεί να αποκατασταθεί στον πληθυσμό. Σε κάθε γύρο φυσικής επιλογής, μπορεί να ξαναχαθούν ωφέλιμα αλληλόμορφα κι έτσι συσσωρεύονται διαρκώς επιβλαβείς μεταλλάξεις και χάνεται η λειτουργία των Y-συνδεδεμένων γονιδίων.

Στα αρχικά στάδια του εκφυλισμού, μια επιβλαβής μετάλλαξη μπορεί να έχει πολύ μεγαλύτερο αντίκτυπο για ένα νέο-χρωμόσωμα Y το οποίο περιέχει πολλά λειτουργικά γονίδια, ενώ σε ενδιάμεσα στάδια εκφυλισμού, όπου υπάρχουν λιγότερα λειτουργικά γονίδια, το χρωμόσωμα μπορεί να μην συνεχίσει να χάνει γονίδια (Bachtrog, 2008).

Εκτός από τον εκφυλισμό, το Y χρωμόσωμα σταδιακά αποκτά μη τυχαία γονιδιακό περιεχόμενο και συσσωρεύει γονίδια τα οποία είναι ωφέλιμα για τα αρσενικά άτομα, καθώς το Y χρωμόσωμα δεν επιλέγεται ποτέ στα θηλυκά άτομα. Πράγματι, το Y χρωμόσωμα της *Drosophila* περιέχει κυρίως γονίδια με αρρενοειδική λειτουργία (Carvalho *et al.*, 2000).

1.4. Γονίδια που εντοπίζονται στο Y χρωμόσωμα

Μόνο το 1/4 των Y-συνδεδεμένων γονιδίων της *D. melanogaster* (δηλαδή τα 3 από τα 12 γονίδια) εντοπίζονται στο Y χρωμόσωμα και στα υπόλοιπα 11 είδη *Drosophila* των οποίων το γονιδίωμα έχει αλληλουχηθεί, ενώ τα περισσότερα από αυτά (7 από τα 12) αποκτήθηκαν λιγότερο από 63 εκατομμύρια χρόνια πριν (Koerich *et al.*, 2008). Ωστόσο, ενώ η οργάνωση των υπόλοιπων χρωμοσωμάτων της *Drosophila* έχει παραμείνει ίδια από την εποχή που έζησε ο κοινός πρόγονος με τα κουνούπια, το γονιδιακό περιεχόμενο του Y χρωμοσώματος της *Drosophila* είναι πολύ νεώτερο (Koerich *et al.*, 2008). Υπάρχουν δυο τουλάχιστον καταγεγραμμένες περιπτώσεις απώλειας γονιδίων, ωστόσο παρατηρείται μια ξεκάθαρη τάση του Y χρωμοσώματος να αυξάνεται σε γονιδιακό περιεχόμενο (Koerich *et al.*, 2008).

Το Y χρωμόσωμα της *D. melanogaster* αντιπροσωπεύει περίπου το 12% του συνολικού

γονιδιώματος της . Το γονιδιακό περιεχόμενο του Y χρωμοσώματος είναι σχετικά ευμετάβλητο και ο ρυθμός με τον οποίο αποκτώνται νέα γονίδια είναι σχετικά μεγαλύτερος από τον ρυθμό με τον οποίο χάνονται (Charlesworth, 2000). Έχουν ταυτοποιηθεί γονίδια γονιμότητας και στον μεγάλο και στον μικρό βραχίονα του Y χρωμοσώματος (YL και YS αντίστοιχα) (Kennison, 1981). Έχουν εντοπιστεί δυο γενετικοί τόποι στον μικρό βραχίονα, οι *ks-1*, *ks-2* και τέσσερις στον μεγάλο βραχίονα, οι *kl-1*, *kl-2*, *kl-3* και *kl-5*. Οι γενετικοί τόποι *kl-2*, *kl-3* και *kl-5* είναι απαραίτητοι για την παραγωγή πρωτεϊνών υψηλού μοριακού βάρους που είναι πιθανώς βαριές αλυσίδες δυνεΐνης που απαιτούνται για την κινητικότητα του σπέρματος (Goldstein *et al.*, 1982). Μοριακές αναλύσεις επιβεβαίωσαν πως ο γενετικός τόπος *kl-5* εκφράζεται ειδικά στους όρχεις και κωδικοποιεί μια μεγάλη βαριά αλυσίδα β-δυνεΐνης μήκους περίπου 4500 αμινοξέων (Gerper & Hays, 1993).

Εκτός από αυτά τα αρρενοειδικά γονίδια γονιμότητας , μια συστοιχία ριβοσωμικών γονιδίων (Ritossa & Spiegelman, 1965), καθώς και τον γενετικό τόπο Suppressor-of-Stellate (Livak, 1990), το Y χρωμόσωμα της *Drosophila* αποτελείται μόνο από μη κωδικοποιητικές ή επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, είναι δηλαδή ετεροχρωματινικό. Κάποια από τα γονίδια γονιμότητας έχουν μέγεθος που ανέρχεται σε επίπεδο Mb και περιέχουν τεράστια ιντρόνια. Οι γονιδιακοί τόποι *kl-5*, *kl-3* και *ks-1* είναι υπεύθυνοι για τον σχηματισμό τριών μεγάλων αναδιπλώσεων (lampbrush-like loops) στους πυρήνες των πρωτογενών σπερματοκυττάρων. Αυτές οι αναδιπλώσεις είναι ανάλογες με αυτές που έχουν περιγραφεί στην *Drosophila hydei* και περιέχουν μεγάλες ποσότητες επαναλαμβανόμενου και δορυφορικού DNA , ωστόσο δεν έχει καθοριστεί εάν αυτή η μορφολογία σχετίζεται με την μεταγραφική δραστηριότητα αυτών των τόπων (Bonaccorsi *et al.*, 1988).

Η ταυτοποίηση νέων Y-συνδεδεμένων γονιδίων παρουσιάζει μεγάλες δυσκολίες. Η αστάθεια του επαναλαμβανόμενου DNA στους φορείς κλωνοποίησης επιτρέπει την αλληλουχία μόνο ενός μικρού κλάσματος των αλληλουχιών αυτών. Ακόμη και η ποσότητα της ετεροχρωματίνης που αλληλουχίστηκε, είναι δύσκολο να συναρμολογηθεί σε μεγαλύτερα κομμάτια και να αντιστοιχηθεί σε κάποιο χρωμοσωμικό βραχίονα.

Κάποια από τα γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί είναι πιθανό να έχουν μετατεθεί στο Y χρωμόσωμα από κάποιο αυτόσωμα κάποια στιγμή στο παρελθόν, επειδή παρέχουν αυξημένη αρμοστικότητα στα αρσενικά και είναι ανταγωνιστικά προς κάποια γονίδια που ευνοούν τα θηλυκά εις βάρος των αρσενικών (Carvalho *et al.*, 2000). Το γεγονός πως το γονίδιο *kl-5* εντοπίζεται στο Y χρωμόσωμα και στο συγγενικό είδος *D. hydei* υποδηλώνει πως κάποια τουλάχιστον από αυτά τα γονίδια είναι Y-συνδεδεμένα για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα.

Ωστόσο σε κάποια είδη *Drosophila*, όπως στην *D. affinis* (Miller & Stone, 1962), τα γόνιμα αρσενικά έχουν γονότυπο X0, κάτι που συνεπάγεται πως στερούνται Y-ειδικών γονιδίων γονιμότητας. Εάν τα γονίδια *kl* ήταν Y-συνδεδεμένα στο παρελθόν, τότε στην περίπτωση της *D. affinis* , θα απαιτούνταν δευτερεύουσες μεταθέσεις των γονιδίων γονιμότητας σε αυτοσώματα, ή την εξέλιξη κάποιων νέων γονιδίων που θα καθιστούσαν τα ήδη υπάρχοντα πλεονάζοντα.

Το γονίδιο *FDY* (flagrante delicto Y, FDY) έχει προκύψει από έναν πρόσφατο διπλασιασμό

του αυτοσωμικού γονιδίου *vig2* στο Y χρωμόσωμα της *D. melanogaster*. Μία αλληλουχία μήκους 11 kb που προέρχονταν από τον χρωμοσωμικό βραχίονα 3R και περιείχε πέντε συνεχόμενα γονίδια (*vig2*, *Mocs2*, *CG42503*, *Cibn* και *Bili*) διπλασιάστηκε αλλά όλα τα γονίδια πλην του *vig2* μετατράπηκαν σε ψευδογονίδια μέσω της συσσώρευσης μεταθετών στοιχείων και ελλειμμάτων. Το *FDY* παρόλα αυτά παρέμεινε λειτουργικό και απέκτησε εξειδικευμένη έκφραση στους όρχεις. Το συγκεκριμένο γονίδιο απουσιάζει στα συγγενικά είδη *Drosophila* και η απόκλιση της αλληλουχίας DNA πως ο διπλασιασμός συνέβη περίπου 2 εκατομμύρια χρόνια πριν (Carvalho et al., 2015).

Το γονίδιο *vig2*, και κατά συνέπεια ίσως και το *FDY* εμπλέκονται στον σχηματισμό και την λειτουργία της ετεροχρωματίνης (Gracheva et al., 2009). Το γονίδιο *vig2* εκφράζεται και στα θηλυκά, ωστόσο μετά τον γονιδιακό διπλασιασμό το παράλογο που εδράζεται στο Y χρωμόσωμα απέκτησε μια νέα λειτουργία, ειδική για την αρσενική γονιμότητα.

Τα υπόλοιπα γονίδια που έχουν ταυτοποιηθεί (*ARY*, *WDY*, *PRY*, *Pp1-Y1*, *Pp1-Y2*, *Ppr-Y*, *ORY* και *CCY*) προέρχονται επίσης από αρχαίους διπλασιασμούς και τα περισσότερα από αυτά έχουν ιντρόνια διατηρημένα σε συντηρημένες θέσεις σε σχέση με τα αυτοσωμικά τους παράλογα γονίδια (Carvalho et al., 2015).

Το Y χρωμόσωμα της *D. melanogaster* περιέχει επίσης μία σειρά επαναλήψεων του γενετικού τόπου *Su(Ste)* (Suppressor of Stellate), από τον οποίο μεταγράφονται μόρια piRNA, τα οποία μαζί με την πρωτεΐνη Aubergine (Aub) συμμετέχουν στην μετα-μεταγραφική αποικοδόμηση μορίων mRNA που μεταγράφονται από τις ομόλογες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες γονιδίων *Stellate* στο X χρωμόσωμα. Ο piRNA-εξαρτώμενος μηχανισμός στοχεύει στην αποικοδόμηση συγκεκριμένων μεταγράφων, τα οποία δεν φέρουν καλύπτρα, και είναι διαθέσιμα για μετάφραση. Η αυξημένη μεταγραφή του γονιδιακού τόπου *Stellate* οδηγεί στην συσσώρευση της πρωτεΐνης *Stellate* σε κρυστάλλους, με αποτέλεσμα την διατάραξη της σπερματογένεσης και την αρσενική στειρότητα (Kotelnikov et al., 2009).

Γενικά, ο συντηρημένος ρόλος των piRNA είναι η ρύθμιση μεταθετών στοιχείων και γονιδιωματικών επαναλήψεων στην αναπαραγωγική κυτταρική σειρά. Τα piRNA στρατολογούν PIWI πρωτεΐνες οι οποίες έχουν δράση ενδονουκλεάσης και είναι ικανές να αποικοδομήσουν τα mRNAs των μεταθετών στοιχείων (Kotelnikov et al., 2009).

1.5. Πρακτικές εφαρμογές: έλεγχος του φύλου

Είναι φανερό πως η αποσαφήνιση της αλληλουχίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων, πέρα από εξελικτικό ενδιαφέρον παρουσιάζει και ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μοριακών τεχνικών που εκμεταλλεύονται κάποιον φυλοκαθοριστικό παράγοντα ή κάποιο γονίδιο γονιμότητας που εδράζεται στα φυλετικά χρωμοσώματα. Απώτερος σκοπός είναι η βελτίωση των προγραμμάτων SIT και η υποβοήθηση της καταστολής των πληθυσμών των εντόμων. Η γνώση των παραμέτρων των φυλετικών χρωμοσωμάτων, και ειδικά του Y χρωμοσώματος, θα διευκολύνει την πρόβλεψη του φύλου των εντόμων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια, την

επιλογή μόνο του επιθυμητού φύλου, την αντιστροφή του ισοζυγίου των δυο φύλων κατά προτίμηση και την απελευθέρωση εντόμων μόνο του επιθυμητού φύλου.

Η σύλληψη της SIT

Η πιο καίρια καινοτομία στο να επιτευχθεί αποτελεσματικός και φιλικός προς το περιβάλλον έλεγχος του πληθυσμού του δάκου της ελιάς ήταν η εισαγωγή της Τεχνικής Στείρου Εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT) (Knipling, 1955). Στα τέλη της δεκαετίας του '30, ο Knipling συνέλαβε την ιδέα πως αν βρεθεί ένας τρόπος να στείρωνονται χημικά τα αρσενικά έντομα, χωρίς να επηρεάζεται η ικανότητά τους να ζευγαρώνουν, τότε μετά την απελευθέρωσή τους και τη σύζευξή τους με θηλυκά αγρίου τύπου, το συνολικό αναπαραγωγικό δυναμικό του φυσικού πληθυσμού θα μειωνόταν. Η SIT λοιπόν είναι μια ειδο-ειδική μέθοδος καταστολής του πληθυσμού των εντόμων (Hendrichs *et al.*, 1995; Krafsur, 1998) στην οποία τα έντομα εκτρέφονται μαζί σε εργαστηριακές συνθήκες, καθίστανται στείρα με ακτινοβόληση και έπειτα απελευθερώνονται. Αφού απελευθερωθούν, τα στείρα αρσενικά έντομα ζευγαρώνουν με θηλυκά έντομα αγρίου τύπου και οι συζεύξεις αυτές οδηγούν σε μείωση του πληθυσμού του εντόμου. Η μέθοδος SIT ουσιαστικά βασίζεται στη μεταφορά σπέρματος, το οποίο φέρει επικρατείς θνησιγόνες μεταλλάξεις, από τα απελευθερωμένα αρσενικά στα θηλυκά αγρίου τύπου.

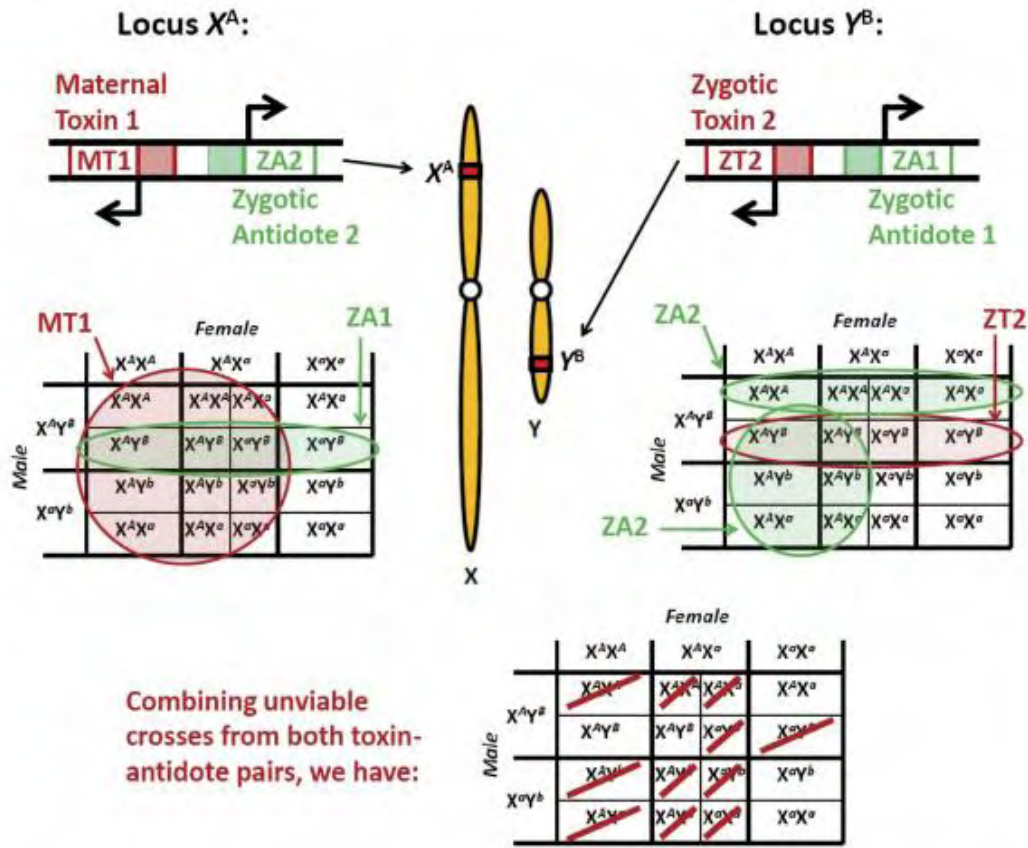
Η SIT είναι γενικά πιο αποτελεσματική όταν απελευθερώνονται μόνο αρσενικά έντομα (Rendon *et al.*, 2004). Η πρακτική αυτή αποτρέπει την ενσωμάτωση στον πληθυσμό θηλυκών εντόμων, τα οποία μπορούν να καταστρέψουν τους καρπούς και επίσης ελαχιστοποιεί την μείωση της απόδοσης η οποία μπορεί να προκύψει από τα ζευγαρώματα μεταξύ των απελευθερωμένων αρσενικών και θηλυκών, τα οποία έχουν μηδενική αξία για τον έλεγχο του πληθυσμού. Ωστόσο, η απελευθέρωση μόνο αρσενικών εντόμων προϋποθέτει την ύπαρξη ενός αξιόπιστου συστήματος φυλοκαθορισμού.

Τα αρσενικά έντομα θα πρέπει να είναι ικανά να αναζητούν τα άγρια θηλυκά και να ζευγαρώνουν μαζί τους. Ωστόσο, τα συγκεκριμένα αρσενικά τυπικά είναι λιγότερο ανταγωνιστικά σε σχέση με τα άγρια αρσενικά λόγω της μακράς ιστορίας προσαρμογής τους στις εργαστηριακές συνθήκες και επειδή η ακτινοβόληση μειώνει σημαντικά την αρμοστικότητά τους (Brice & Eberhard, 1998; Brice *et al.*, 2002; Lux *et al.*, 2002; Parker & Mehta, 2007). Ο αποδοτικός φυλοδιαχωρισμός μπορεί να μειώσει σημαντικά μειονεκτήματα της SIT, όπως η εξέλιξη διακριτικής ικανότητας από τα άγρια θηλυκά των ακτινοβολημένων αρσενικών (McInnis *et al.*, 1996) καθώς και την υιοθέτηση αλλαγών στην ώρα έναρξης του ζευγαρώματος, κάτι το οποίο μειώνει την πιθανότητα να ζευγαρώσουν μεταξύ τους οι απελευθερωμένες και οι άγριες μύγες (Economopoulos *et al.*, 1971; Economopoulos, 1972; Economopoulos *et al.*, 1977; Zervas & Economopoulos, 1981; Miyatake & Shimizu, 1999; Economopoulos, 2001). Επίσης, η αυξημένη συχνότητα επανασύζευξης των άγριων θηλυκών τα οποία έχουν ήδη συζευχθεί με στείρα αρσενικά μειώνει επιπρόσθετα την αποδοτικότητα της μεθόδου (Kraaijeveld & Chapman, 2004). Εάν συνυπολογιστούν όλοι αυτοί οι παράγοντες

μπορεί να εξηγηθεί η μικρή απόδοση που είχε η εφαρμογή της SIT σε κάποιους πληθυσμούς εντόμων στο παρελθόν.

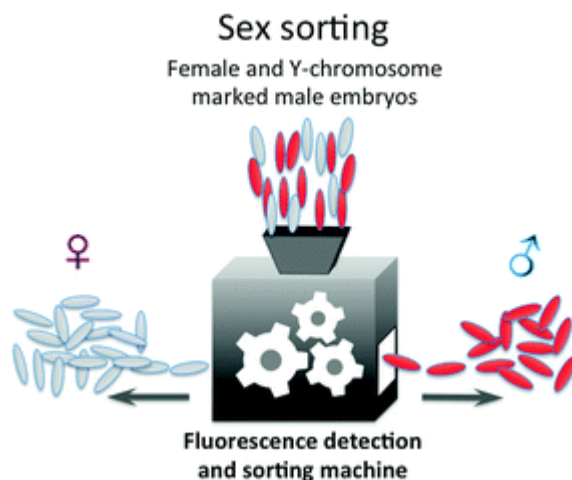
Η βασική σύλληψη της SIT εμπλουτίστηκε επιπλέον τις επόμενες δεκαετίες. Σκοπός των νέων τεχνικών που αποτελούν μετεξέλιξη της SIT είναι να εκμεταλλευτούν φυσικά χαρακτηριστικά του αναπαραγωγικού συστήματος του εντόμου προκειμένου να εισάγουν στους πληθυσμούς γενετικά στοιχεία που θα οδηγήσουν στον περιορισμό τους. Τα νέα γενετικά στοιχεία που επιστρατεύτηκαν μεταβιβάζονται ή κληρονομούνται με βάση το φύλο των εντόμων και προκαλούν στειρώση, θάνατο ή αλλαγές στην αναπαραγωγική συμπεριφορά του αντίθετου φύλου (Bax & Thresher, 2009).

Ένα σύστημα το οποίο είναι πολύ πρόσφατο και έχει προταθεί για την καταπολέμηση του κουνουπιού, είναι το σύστημα Medusa (Marshall & Hay, 2014). Το σύστημα αυτό μπορεί να επάγει τοπική και αντιστρεπτή καταστολή ενός φυσικού πληθυσμού εντόμων. Το σύστημα Medusa αποτελείται από 4 στοιχεία, δυο στο Χ χρωμόσωμα και δυο στο Υ. Περιλαμβάνει μια μητρικής προέλευσης, Χ-συνδεδεμένη τοξίνη και ένα Υ-συνδεδεμένο αντίδοτο το οποίο εκφράζεται στο ζυγωτό. Χωρίς το Υ-συνδεδεμένο αντίδοτο προκαλείται καταστολή του θηλυκού πληθυσμού και επιβιώνουν μόνο τα ζυγωτά τα οποία φέρουν το Υ-συνδεδεμένο αντίδοτο. Ταυτόχρονα, ενυπάρχουν και μια ζυγωτικά εκφραζόμενη Υ-συνδεδεμένη τοξίνη και ένα ζυγωτικά εκφραζόμενο Υ-συνδεδεμένο αντίδοτο, με αποτέλεσμα η Υ-συνδεδεμένη τοξίνη να καταστέλλεται στα θηλυκά ζυγωτά που κληρονομούν το Χ-συνδεδεμένο αντίδοτο. Συνολικά, αυτά τα χρωμοσώματα δημιουργούν ένα ισορροπημένο σύστημα καταστολής το οποίο εξαπλώνεται ενώ ταυτόχρονα ασκεί αρνητική επιλογή εναντίον των θηλυκών εντόμων όταν είναι παρόν πάνω από μια συγκεκριμένη συχνότητα κατώφλι στον πληθυσμό. Η συχνότητα αυτή μπορεί να επιτευχθεί με τακτική απελευθέρωση εντόμων που φέρουν τα γονίδια, καθώς και να αναστραφεί αν εισαχθούν στον πληθυσμό έντομα αγρίου τύπου (Marshall & Hay, 2014). Στην *Εικόνα 3* αναπαρίσταται ο τρόπος δράσης του συστήματος *Medusa*.



Εικόνα 3. Αναπαράσταση του μηχανισμού δράσης του συστήματος Medusa, προκειμένου να τροποποιηθεί η αναλογία των 2 φύλων στους διαγονιδιακούς απογόνους.
 Εικόνα: Marshall, J. M., & Hay, B. A. (2014). Medusa: A Novel Gene Drive System for Confined Suppression of Insect Populations. *PLOS ONE*, 9(7):e102694. doi:10.1371/journal.pone.0102694.

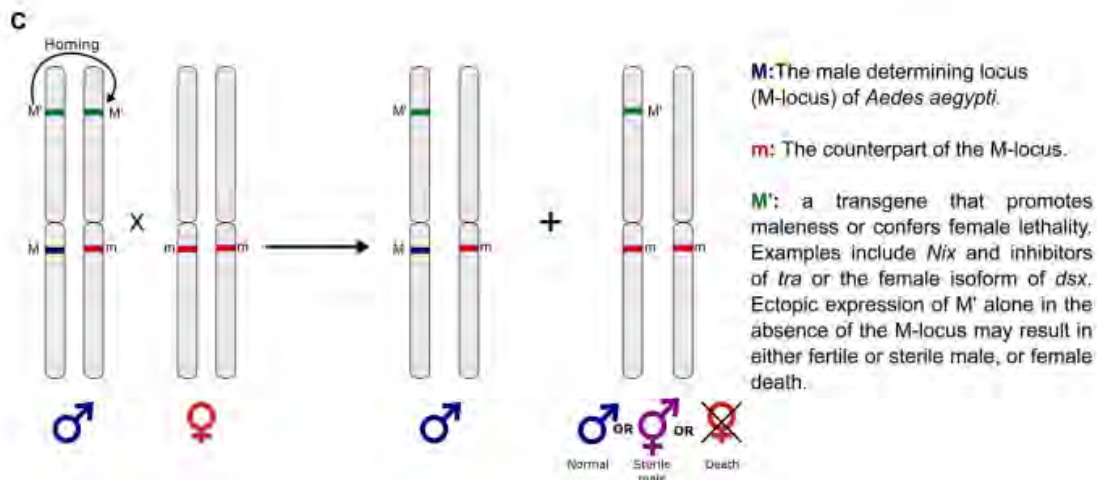
Μία ακόμη εφαρμογή που έχει αναπτυχθεί για την εξάλειψη των θηλυκών ατόμων σε πρώιμα αναπτυξιακά στάδια κατά την μαζική εκτροφή, βασίζεται στη δημιουργία διαγονιδιακών σειρών εντόμων που σημαίνονται με φθορίζουσες πρωτεΐνες με φυλοειδικό τρόπο. Η τεχνική έχει εφαρμοστεί στην μύγα *Anastrepha suspensa*, όπου ενσωματώθηκαν στο Y χρωμόσωμα γονίδια δείκτες υπό τον έλεγχο του υποκινητή του γονιδίου της πολυουβικτινής της *Drosophila melanogaster*. Δημιουργήθηκαν 4 διαγονιδιακά στελέχη με ενθέσεις στο Y-χρωμόσωμα και ένα από αυτά παρουσίαζε έκφραση της DsRed φθορίζουσας πρωτεΐνης σε αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης. Μπορεί πλέον να γίνεται ο διαχωρισμός των 2 φύλων στην διαδικασία της μαζικής εκτροφής με αυτοματοποιημένα μέσα (Schetelig & Handler, 2013), όπως παρουσιάζεται και στην *Εικόνα 4*.



Εικόνα 4: Αυτοματοποιημένος διαχωρισμός αρσενικών και θηλυκών εντόμων *Anastrepha suspensa* σε πρώιμο αναπτυξιακό στάδιο με τη βοήθεια φθορίζουσών δεικτών που έχουν ενσωματωθεί στο Y χρωμόσωμα.
Εικόνα από: Schetelig, M. F., & Handler, A. M. (2013). Y-linked markers for improved population control of the tephritid fruit fly pest, *Anastrepha suspensa*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 136, 123-33. doi: 10.1007/10_2013_209.

Οι δυο προαναφερθείσες εφαρμογές στηρίζονται στη χρήση του Y χρωμοσώματος λόγω της κληρονόμησής του μόνο στους αρσενικούς απογόνους, και όχι σε κάποιο γονίδιο που εδράζεται στο Y χρωμόσωμα, οπότε αναφέρονται ενδεικτικά. Αντίθετα, η μέθοδος που αναπτύσσεται στη συνέχεια, αξιοποιεί άμεσα τη γνώση που έχει αποκτηθεί από την μελέτη του Y χρωμοσώματος.

Βρίσκεται υπό εξέταση η χρήση του συστήματος CRISPR-Cas9 σε είδη κουνουπιών, όπως το *Aedes aegypti*. Στο συγκεκριμένο είδος ο παράγοντας αρρενοποίησης είναι το γονίδιο *Nix*, το οποίο εντοπίζεται στο Y χρωμόσωμα (Hall et al., 2015). Η ένθεσή του ως διαγονίδιο σε θηλυκά έντομα ίσως αποδειχθεί επαρκής προκειμένου να μετατραπούν τα θηλυκά σε γόνιμα αρσενικά, ή εναλλακτικά να μετατραπούν σε στείρα αρσενικά ή να πεθάνουν. Κάτι τέτοιο θα αποδεικνυόταν πολύ χρήσιμο για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό των φύλων, τη μείωση του πληθυσμού και θα βελτίωνε τα προγράμματα SIT για το συγκεκριμένο είδος. Ακόμη, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και ρυθμιστικά συστήματα τετρακυκλίνης ώστε να διατηρούνται εργαστηριακές ομόζυγες διαγονιδιακές σειρές, στις οποίες θα καταστέλλεται ή θα ενεργοποιείται κατά βούληση η έκφραση του *Nix* στα θηλυκά έντομα. Μια αναπαράσταση της λειτουργίας ενός τέτοιου συστήματος υπάρχει στην *Εικόνα 5*. Ο δρόμος θα μπορούσε να ανοίξει για την χρήση τέτοιων συστημάτων και σε άλλα έντομα στα οποία το φύλο καθορίζεται από κάποιον παράγοντα που εδράζεται στο Y χρωμόσωμα.



Εικόνα 5: Το διαγονίδιο που φέρει το *Nix* (ή εναλλακτικά κάποιο γονίδιο που προκαλεί θνησιμότητα στα θηλυκά) (πράσινο χρώμα πάνω στο σχήμα) μεταβιβάζεται μέσω των αρσενικών και στα θηλυκά, μετατρέποντάς τα είτε σε γόνιμα αρσενικά, είτε σε στείρα αρσενικά (είτε προκαλεί τον θάνατό τους, αν πρόκειται για θνησιγόνο γονίδιο). Με μπλε αναπαρίσταται ο γονιδιακός τόπος όπου βρίσκεται το *Nix* και με κόκκινο ο αντίστοιχος γονιδιακός τόπος στα θηλυκά. Με τον όρο Homing γίνεται αναφορά σε μία γενική διαδικασία με την οποία ένα γονίδιο διπλασιάζεται πάνω στο ομόλογο χρωμόσωμα, για παράδειγμα όπως γίνεται με τα συστήματα των HEGs (Homing Endonuclease Gene-based System) και CRISPR-Cas9.

Εικόνα τροποποιημένη από: Adelman, Z. N., & Tu, Z. (2016). Control of mosquito-borne infectious diseases: Sex and gene drive. *Trends Parasitol.*, 32(3), 219–229. doi:10.1016/j.pt.2015.12.003.

Με την ίδια λογική, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως διαγονίδιο και κάποιο γονίδιο γονιμότητας που εδράζεται στο Y χρωμόσωμα, εάν βρεθούν και σε άλλα είδη εκτός της *Drosophila* τέτοια γονίδια.

1.6. Ο δάκος της ελιάς και η σημασία του

Σύμφωνα με την ταξινόμηση κατά την βάση δεδομένων NCBI, ο δάκος της ελιάς κατατάσσεται στις ακόλουθες κατηγορίες:

Τάξη: Diptera

Υποτάξη: Brachycera

Ενδοτάξη: Muscomorpha

Κλάση: Schizophora

Υποκλάση: Acalyptratae

Υπεροικογένεια: Tephritoidea

Οικογένεια: Tephritidae

Υποοικογένεια: Dacinae

Φυλή: Dacini

Γένος: Bactrocera

Υπογόνος: Daculus

Είδος: oleae

Η οικογένεια Tephritidae αποτελείται από περίπου 4500 γνωστά είδη, κάποια από τα οποία

θεωρούνται παγκοσμίως ως τα πιο σημαντικά γεωργικά παράσιτα. Η γνώση για τις σχέσεις μεταξύ των υποοικογενειών και των φυλών ακόμη βελτιώνονται και εμπλουτίζονται (Drew, 1989; Aluja & Norrbon, 2001; White & Elson-Harris, 1992; White, 2006; Daane & Johnson, 2010). Μελέτες που βασίζονται είτε στην ενδελεχέστερη εξέταση της μορφολογίας των ειδών (Korneyev, 1999) είτε στη χρήση γενετικών προσεγγίσεων (Han & Ro, 2009) υποβοήθησαν την συστηματική κατάταξη των Tephritidae. Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Rossi, 1790), συγκαταλέγεται στην υποοικογένεια Dacinae και στη φυλή Dacini, η οποία περιλαμβάνει κυρίως αφροτροπικά, αυστραλιανά και ασιατικά είδη (Daane & Johnson, 2010). Ο δάκος της ελιάς, καθώς και τα συγγενικά αφροτροπικά είδη *Bactrocera* σχετίζονται στενά με το σύμπλεγμα *Bactrocera dorsalis* (White, 2006; Han & Ro, 2009), παρόλο που ο δάκος της ελιάς δεν ανήκει σε αυτό το σύμπλεγμα (Clarke *et al.*, 2005).

Η κατανομή του δάκου της ελιάς εμπίπτει στα όρια των περιοχών όπου ευρίσκονται άγρια ή καλλιεργούμενα ελαιόδεντρα (Daane & Johnson, 2010). Η παρουσία του δάκου έχει καταγραφεί σε όλη την έκταση της Μεσογειακής λεκάνης, στην Νότια και Κεντρική Αφρική, τις Κανάριες Νήσους, την Εγγύς και την Μέση Ανατολή, την Καλιφόρνια και τη Βόρεια Αμερική (Augustinos *et al.*, 2002; Nardi *et al.*, 2003; Rice *et al.*, 2003; Copeland *et al.*, 2004; Zygouridis *et al.*, 2009). Αναφορές για την συλλογή ειδών *Bactrocera* σε άγρια ελαιόδεντρα στην Κίνα εγείρουν το ερώτημα για την παρουσία του παράσιτου στην Ασία, ενώ δεν έχουν γίνει ακόμα αναφορές για την ύπαρξή του στην Νότια Αμερική και την Αυστραλία (Daane & Johnson, 2010). Ο καθορισμός της γεωγραφικής προέλευσης της εξάπλωσης του δάκου της ελιάς είναι ακόμα ασαφής, ωστόσο υπάρχουν γενετικά διακριτοί υποπληθυσμοί που εντοπίζονται στην υποσαχάρια Αφρική, τη Μεσόγειο και το Πακιστάν (προηγούμενη ονομασία *var. asiatica*) (Nardi *et al.*, 2005). Μοριακές αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στο έντομο υποδεικνύουν μια γεωγραφική εξάπλωση του από την Ανατολή προς τη Δύση (Augustinos *et al.*, 2002; Augustinos *et al.*, 2005). Τα στοιχεία υποδηλώνουν ξεκάθαρα πως οι πλησιέστεροι συγγενείς του εντόμου που παρασιτούν σε ελαιόδεντρα είναι αφρικανικής προέλευσης και όχι μεσογειακής (White, 2006), και πως η πρόσφατη εισβολή του εντόμου στη Βόρεια Αμερική προήλθε από την περιοχή της Μεσογείου (Nardi *et al.*, 2005; Zygouridis *et al.*, 2009).

Στη φύση, το ενήλικο έντομο εναποθέτει τα αυγά του μόνο στο μεσοκάρπιο των καρπών του γένους *Olea*, συμπεριλαμβανομένων των ειδών *O. europaea* (καλλιεργούμενα και άγρια ελαιόδεντρα), *O. verrucosa* (Link) και *O. chrysophylla* (Lam.). Ακόμη, οι εκκολαπτόμενες προνύμφες αναπτύσσονται αποκλειστικά στο μεσοκάρπιο των συγκεκριμένων ειδών (Tzanakakis, 2003). Το έντομο μπορεί να παρασιτήσει σε όλες τις γνωστές ποικιλίες καλλιεργούμενων ελαιόδεντρων των τριών αυτών ειδών (Neuenschwander *et al.*, 1986). Τα ενήλικα προκειμένου να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν τρέφονται τακτικά με διάφορες οργανικές ουσίες, όπως μέλι από διάφορα έντομα, νέκταρ από άνθη, γύρη, φυτικές εκκρίσεις και χυμώδεις εκκρίσεις ή ιστούς από αποσυντιθέμενα φρούτα (Martin, 1952; Tsiropoulos, 1977; Katsoyannos, 1983; Tzanakakis, 2003).

Τα διαθέσιμα δεδομένα συγκλίνουν στο γεγονός πως η προσέλκυση των ενήλικων εντόμων στα ελαιόδεντρα περιλαμβάνει οσφρητικά, καθώς και οπτικά ερεθίσματα. Δεν υπάρχουν όμως αποδείξεις πως ο δάκος προσελκύεται από χαρακτηριστικά του φυλλώματος των ελαιοδέντρων

(Fletcher, 1987). Τα φύλλα της ελιάς έχουν χαρακτηριστικό χρώμα στην κάτω επιφάνεια τους το οποίο αντανακλά σε μήκη κύματος μεταξύ 380 και 520 nm (ασημί απόχρωση). Σε πειράματα που έχουν πραγματοποιηθεί, ο δάκος δεν επιδεικνύει κάποια συγκεκριμένη απόκριση σε φύλλα ελιάς ή σε αντικείμενα με χρωματισμούς με παρόμοιο μήκος κύματος εκπομπής (Prokory & Haniotakis, 1975). Υπάρχουν, όμως, αποδείξεις πως οι πτητικές ενώσεις που προέρχονται από τον καρπό της ελιάς επιτρέπουν στα έντομα να εντοπίσουν τους καρπούς και να διακρίνουν μεταξύ ώριμων και λιγότερο ώριμων καρπών (Fowler, 1977; Fitt, 1981; Fitt, 1986; Fletcher, 1987). Τα θηλυκά έντομα μπορούν να αναγνωρίσουν τους καρπούς της ελιάς μέσω της αντίληψης με την όραση του σχήματος, του χρώματος και του μεγέθους (Haniotakis & Voyadjoglou, 1978). Έχουν απομονωθεί μάλιστα κάποιες χημικές ενώσεις που διεγείρουν την ωαπόθεση, συμπεριλαμβανομένων συγκεκριμένων παραγώγων της ολευροπαΐνης (Girolami *et al.*, 1983; Levinson & Levinson, 1984). Μόλις το θηλυκό εντοπίσει κάποιον κατάλληλο καρπό, τον εξερευνεί προτού εναποθέσει τα αυγά του (Cirio, 1971). Τα θηλυκά έντομα τείνουν να εναποθέτουν τα αυγά τους σε πράσινους καρπούς και πιο σπάνια σε σκουρόχρωμους (Cirio, 1971; Neuenschwander *et al.*, 1985). Μετά την ωτοκία χρησιμοποιούν την προβοσκίδα τους για να απλώσουν στην επιφάνεια του καρπού χυμώδεις εκκρίσεις που προέρχονται από την οπή ωτοκίας που ανοίγουν στον καρπό. Αυτές οι εκκρίσεις απωθούν άλλα θηλυκά έντομα από το να εναποθέσουν τα αυγά τους στον ίδιο καρπό (Cirio, 1971). Ενώσεις που περιέχονται σε αυτές τις χυμώδεις εκκρίσεις και έχουν απωθητικές ιδιότητες είναι η δι-ϋδροξυαιθυλοφαινόλη (Vita & Barbera, 1976), η πυροκατεχόλη, η βενζαλδεΐδη και η ακετοφαινόνη (Girolami *et al.*, 1981). Έτσι, κάθε καρπός περιέχει ένα αυγό (Fletcher, 1987). Έχει παρατηρηθεί πως ακόμα κι όταν δυο προνύμφες είναι παρούσες σε έναν καρπό, οι νύμφες που προκύπτουν έχουν μικρότερο μέγεθος και καθυστερούν να αναπτυχθούν και να εκδυθούν ως ενήλικα έντομα (Burrack *et al.*, 2009). Ακόμη, τα θηλυκά άτομα δεν εναποθέτουν αυγά σε καρπούς οι οποίοι περιέχουν προνύμφες δεύτερου ή τρίτου σταδίου, λόγω της δράσης λιποδιαλυτών πτητικών ενώσεων που απελευθερώνονται από τους φυτικούς ιστούς οι οποίοι καταστρέφονται από τις προνύμφες που τρέφονται από αυτούς (Girolami *et al.*, 1981; Fletcher, 1987).

Ο έλεγχος του δάκου της ελιάς περιλαμβάνει την ευρεία χρήση χημικών εντομοκτόνων. Οι δυο βασικές κατηγορίες χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται είναι τα πυρεθροειδή και τα οργανοφωσφορικά (Manousis & Moore, 1987). Από την πρώτη κατηγορία, τα δυο πιο αποτελεσματικά εντομοκτόνα θεωρούνται δυο συνθετικές ενώσεις, το NRDC156 [cyano (3-phenoxyphenyl) methyl (IR-cis)-3-(2,2-di-bromoethyl)-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate)] και το NRDC 161 [(s)-cyano (3-phenoxyphenyl)-methyl (IR-cis)-3-(2,2-dibromoethyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarboxylate)], ενώ από τη δεύτερη κατηγορία το fenthion και το dimethoate (Celik & Suzer, 1973; Cakici *et al.*, 1973; Awadallah & Nadim, 1970; Soultanopoulos & Broumas, 1977; Brunelli, 1978; Soultanopoulos & Broumas, 1979; Bruni & Caira, 1980; Louca, 1984).

Τα χημικά εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με δολώματα υδρολυμένων πρωτεϊνών, κάτι το οποίο διευκολύνει την προσέλκυση των εντόμων. Τα εντομοκτόνα fenthion, dimethoate, malathion, phosphamidon, dimetilan για παράδειγμα χρησιμοποιούνται μαζί με

Buminal ή Lysatex με τη μορφή σπρέι (Orlando *et al.*, 1974; Casilli *et al.*, 1976; Tucci, 1978; Orphanidis & Kalmoukos, 1979a,b). Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι πως χρησιμοποιούνται μικρότερες ποσότητες της τοξικής ουσίας. Λόγω του υψηλού κόστους των επαναλαμβανόμενων εφαρμογών των εντομοκτόνων ουσιών, και προκειμένου να μειωθούν οι αρνητικές τους επιπτώσεις στο περιβάλλον, δοκιμάζονται διάφορες εναλλακτικές. Εισήχθη στην κυκλοφορία ένα νέο εντομοκτόνο σε μορφή σπρέι, το spinosad, το οποίο έχει αυξημένη απόδοση και λιγότερο ενεργά συστατικά (Thomas & Mangan, 2005). Ωστόσο, ήδη από το 1970, εργαστηριακές μελέτες απέδειξαν πως ο δάκος μπορεί να αναπτύσσει ανθεκτικότητα στο dimethoate (Tsakas & Krimbas, 1970). Έκτοτε, πολλές εργασίες έχουν αφιερωθεί στην κατανόηση της γενετικής βάσης της ανθεκτικότητας του δάκου στα οργανοφωσφορικά (Hawkes *et al.*, 2005; Kakani & Mathiopoulos, 2008; Kakani *et al.*, 2008; Stasinakis *et al.*, 2001; Vontas *et al.*, 2001) και στα πυρεθροειδή (Margaritopoulos *et al.*, 2008).

1.7. Τα χρωμοσώματα του δάκου της ελιάς

Το Y χρωμόσωμα του δάκου της ελιάς είναι πολύ μικρό σε μέγεθος, υψηλά ετεροχρωματινικό και περιέχει μεγάλη ποσότητα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA, η πλειονότητα των οποίων απαντάται και στις περικεντρικές περιοχές των αυτοσωμάτων. Το χρωμόσωμα έχει συγκεντρώσει μικρούς και μεγάλους επαναλαμβανόμενους ενδοχρωμοσωμικούς διπλασιασμούς, στους οποίους συμπεριλαμβάνεται ένα τμήμα του γονιδίου *importin-4-like*. Εκτός από αυτές τις αλληλουχίες, οι υπόλοιπες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος δεν είναι κοινές με το X χρωμόσωμα, κάτι που υποδεικνύει πως τα δυο χρωμοσώματα είναι διαφοροποιημένα στο μοριακό επίπεδο. Ακόμη, οι αλληλουχίες αυτές δεν έχουν ταυτοποιηθεί στα Y χρωμοσώματα άλλων συγγενικών ειδών Terphritidae, επομένως μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα πως πρόκειται για ειδο-ειδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Gabrieli *et al.*, 2011).

Το Y χρωμόσωμα είναι διάσπαρτο και με μεταθετά στοιχεία, μικρούς διπλασιασμούς και μεγαλύτερα γονιδιακά τμήματα. Ανάμεσα στις αλληλουχίες που έχουν απομονωθεί από το Y χρωμόσωμα είναι ένα ανενεργό στοιχείο *marginer* και ένα ρетроμεταθετό στοιχείο *Oswaldo-like*. Η συσσώρευση μεταθετών στοιχείων στην ετεροχρωματίνη μη ανασυνδυαζόμενων χρωμοσωμάτων είναι μια αναμενόμενη κατάσταση, η οποία απορρέει από την αρνητική επιλογή έναντι σε επιβλαβείς αναδιατάξεις του ίδιου του Y χρωμοσώματος ή μεταξύ του Y χρωμοσώματος και των αυτοσωμάτων (Gabrieli *et al.*, 2011).

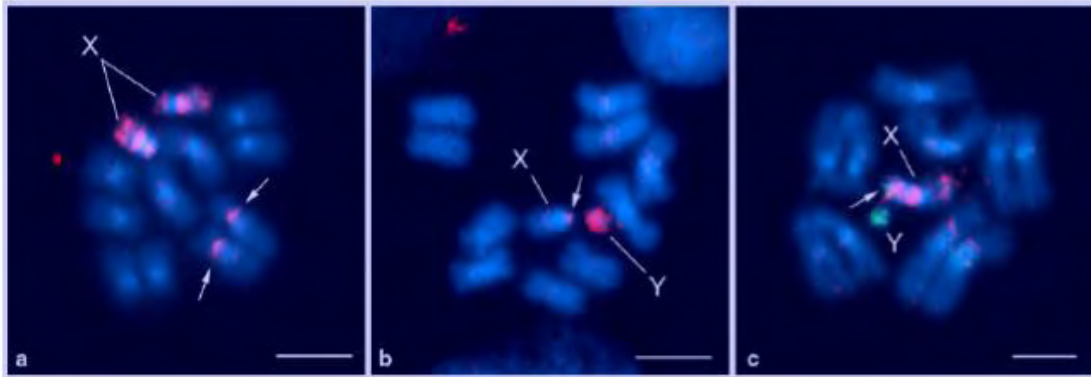
Όσον αφορά τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που εντοπίζονται τόσο στο Y χρωμόσωμα, όσο και στα αυτοσώματα, αυτές είναι τμήματα του γονιδίου *Ovo* και *importin-4-like*. Οι επαναλήψεις που μοιάζουν με ένα τμήμα του *Ovo* οργανώνονται σε συστοιχίες στο Y χρωμόσωμα και στις περικεντρομερικές περιοχές του αυτοσώματος 2, ενώ τα τμήματα του *importin-4-like* είναι μεγαλύτερα και βρίσκονται στο Y αλλά και στις περικεντρομερικές περιοχές όλων των αυτοσωμάτων. Οι επαναλήψεις του *Ovo* μπορεί να είναι αποτέλεσμα της συσσώρευσης μικρότερων επαναλήψεων, ενώ οι επαναλήψεις *importin-4-like* είναι συνέπεια της εξάπλωσης μεγάλων τμημάτων σε όλο το γονιδίωμα, και κυρίως σε περιοχές

ετεροχρωματινής (Gabrieli *et al.*, 2011).

Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε μία νέα οικογένεια ρετρομεταθετών στοιχείων, η οποία ονομάστηκε *Achilles* (Tsoumani *et al.*, 2015). Η αλληλουχία των στοιχείων αυτών έχει μήκος περίπου 7.5 kb και η *in situ* υβριδοποίηση σε πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου της ελιάς έδειξε πως κατανέμεται και στα πέντε αυτοσώματα, σε όλα τα κεντρομερή καθώς και στο κοκκιώδες ετεροχρωματινικό δίκτυο το οποίο αντιστοιχεί στα φυλετικά χρωμοσώματα κατά την μίτωση. Υπάρχει ένα τουλάχιστον μεταγραφικά ενεργό στοιχείο στο γονιδίωμα του δάκου και παρουσιάζει διαφορική έκφραση ανάμεσα στα δύο φύλα, αλλά και κατά την εμβρυονική εξέλιξη. Η υψηλότερη έκφραση παρατηρήθηκε στην αναπαραγωγική αρσενική σειρά (όρχεις).

Ο καρύοτυπος του *B. oleae* αποτελείται από πέντε ζεύγη αυτοσωμάτων και ένα ζεύγος ετερομορφικών XY χρωμοσωμάτων (Εικόνα 6). Στους πολυταινικούς πυρήνες είναι εμφανή τα αυτοσώματα, καθώς και μία ετεροχρωματινική μάζα, η οποία διαιρείται σε μικρές κοκκιώδεις ομάδες (Mavragani-Tsipidou, 2002). Οι ίδιες μάζες έχουν βρεθεί και σε όλες τις μελέτες που αφορούν είδη Terphritidae και έχει υποτεθεί πως σχηματίζονται από τα φυλετικά χρωμοσώματα. Στις μιτωτικές μεταφάσεις των αρσενικών εντόμων *B. oleae*, τα X και Y χρωμοσώματα αναγνωρίζονται ως ετερομορφικό ζεύγος και το Y είναι ένα πολύ μικρό, σε σχήμα τελείας χρωμόσωμα (Mavragani-Tsipidou, 2002). Το X και το Y χρωμόσωμα δεν δημιουργούν πολυταινικά χρωμοσώματα, σχηματίζουν όμως ετεροχρωματινικές δομές (Mavragani-Tsipidou, 2002).

Στο Y χρωμόσωμα του δάκου επίσης εντοπίζεται ο παράγοντας αρρενοποίησης (*Maleness Factor*). Μελέτες στην *Ceratitis capitata* αλλά και στον δάκο *Bactrocera oleae*, έχουν εντοπίσει τα ορθόλογα γονίδια των γονιδίων *tra/tra 2* και του *dsx*, που συμμετέχουν στο μοριακό μονοπάτι φυλοκαθορισμού της *D. melanogaster* (Willhoeft & Franz, 1996; Lagos *et al.*, 2007; Augustinos *et al.*, 2008; Tsoumani *et al.*, 2011; Drosopoulou *et al.*, 2014; Salvemini *et al.*, 2014). Το μονοπάτι καθορισμού του φύλου των *C. capitata* και *B. oleae* διαφέρει από αυτό της *D. melanogaster* στα γονίδια ανοδικά του *tra*. Όπως προαναφέρθηκε, στη *D. melanogaster*, η πρωτεΐνη SXL στα θηλυκά παράγεται με θηλεο-ειδικό τρόπο επειδή υπάρχει διπλή δόση κάποιων γονιδίων που εντοπίζονται στο X χρωμόσωμα και επάγει θηλεο-ειδικό μάτισμα του γονιδίου *tra*. Αντίθετα, στην *C. capitata*, υπάρχει ένας Y-συνδεδεμένος παράγοντας αρρενοποίησης ο οποίος απενεργοποιεί την θετική ανατροφοδότηση της θηλεο-ειδικής έκφρασης του γονιδίου *tra*, η οποία είναι η προκαθορισμένη κατάσταση (Salvemini *et al.*, 2014). Ωστόσο, ανοδικά του γονιδίου *tra*, ο μοριακός διακόπτης παραμένει ανεξιχνίαστος. Ο μηχανισμός φυλοκαθορισμού στον δάκο εικάζεται πως ομοιάζει με αυτόν στην *C. capitata*.



Εικόνα 6. Καρυότυπος του δάκου της ελιάς. (α) Παρουσιάζονται τα χρωμοσώματα στη φάση της θηλυκής μετάφασης. Οι ειδικοί X-probes έχει υβριδιστεί σε περιοχές του X χρωμοσώματος και σε μία περιοχή των αυτοσωμάτων (πιο ασθενές σήμα). (β) Αρσενική μετάφαση όπου ειδικοί Y-probes υβριδίζονται στο Y χρωμόσωμα. (γ) Με πράσινο απεικονίζεται το Y χρωμόσωμα, πάνω στο οποίο έχουν υβριδιστεί Y-ειδικοί probes και με κόκκινο το X χρωμόσωμα πάνω στο οποίο υβριδίζονται ειδικοί X-probes.

Εικόνα τροποποιημένη από: Drosoroulou, E., Nakou, I., Sichova, J., Kubickova, S., Marec, F., Mavragani-Tsipidou, P. (2012). Sex chromosomes and associated rDNA form a heterochromatic network in the polytene nuclei of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 140, 169–180. doi: 10.1007/s10709-012-9668-3.

1.8. Αλληλούχηση του γονιδιώματος του δάκου της ελιάς

Η αλληλούχηση του γονιδιώματος του Y χρωμοσώματος του δάκου της ελιάς παρουσιάζει πολλές δυσκολίες λόγω της φύσης του χρωμοσώματος, το οποίο περιέχει ετεροχρωματικές περιοχές οι οποίες βρίθουν σε επαναλήψεις και μεταθετά στοιχεία. Γι' αυτό το λόγο έπρεπε να χρησιμοποιηθούν πιο έμμεσες και ευρηματικές μέθοδοι. Το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής έχει εμπλακεί σε αυτήν την μεγάλη προσπάθεια η οποία παρουσιάζει μεγάλες προκλήσεις.

Το πρόγραμμα αλληλούχησης επιστράτευσε έναν συνδυασμό τεχνολογιών αλληλούχησης (Illumina short reads, Illumina mate pairs and PacBio long reads) καθώς και de novo συναρμολόγηση του πλήρους μεταγραφώματος με την τεχνολογία Illumina RNA sequencing. Η ποιότητα της συναρμολόγησης βελτιώθηκε πολύ με την χρήση της προσέγγισης 10X Genomics, καθώς και με την αντιστοίχιση των συναρμολογημάτων με περιοχές των πολυταινικών χρωμοσωμάτων που περιείχαν ήδη χαρτογραφημένους μοριακούς δείκτες. Αυτή τη στιγμή, τα χαρτογραφημένα scaffolds καλύπτουν πάνω από το 50% των χρωμοσωμάτων του δάκου της ελιάς.

Μία από τις εναλλακτικές μεθόδους που έχουν επιστρατευτεί για τον εντοπισμό των Y-ειδικών αλληλουχιών είναι η αλληλούχηση ξεχωριστά του γονιδιώματος αρσενικών και θηλυκών εντόμων *Bactrocera oleae* και στη συνέχεια ο καθορισμός του λόγου των στοιχίσεων θηλυκών προς αρσενικά σε ένα γονιδίωμα αναφοράς. Η μέθοδος αυτή, που ονομάζεται χρωμοσωμικό κλάσμα (Chromosome Quotient, CQ) έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στο κουνούπι *Anopheles gambiae* (Hall et al., 2013) και οδήγησε στην ανακάλυψη έξι νέων Y-συνδεδεμένων

γονιδίων. Η μέθοδος CQ εκμεταλλεύεται δεδομένα από αλληλούχηση υψηλής απόδοσης του γονιδιώματος και του μεταγραφώματος και δεν προϋποθέτει την ύπαρξη ενός γονιδιώματος αναφοράς όπου είναι γνωστή η ακριβής τοποθέτηση των αλληλουχιών στα χρωμοσώματα. Οι αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος είναι δυνατόν να ταυτοποιηθούν επειδή υπάρχουν μόνο στο γονιδίωμα των αρσενικών εντόμων. Ωστόσο, κάποιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που εντοπίζονται στο Y χρωμόσωμα εντοπίζονται και στο X ή στα αυτοσώματα. Εάν όμως το γονιδίωμα αναφοράς τεμαχιστεί σε πολλά μικρότερα κομμάτια μέσω της αφαίρεσης αυτών των αλληλουχιών, τότε οι περισσότερες αλληλουχίες που θα είναι μοναδικές θα αντιστοιχούν σε αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος. Ακόμη κάποιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος μοιάζουν αρκετά με επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του X ή των αυτοσωμάτων, ή έχουν προκύψει από γονιδιακούς διπλασιασμούς, με αποτέλεσμα να είναι παρούσες τόσο στο αρσενικό όσο και στο θηλυκό γονιδίωμα. Η λύση είναι να εφαρμόζονται πολύ αυστηρά κριτήρια στην στοιχίση των αλληλουχιών, δηλαδή απαιτείται πλήρης(100%) αντιστοιχίση των αρσενικών και των θηλυκών αναγνώσεων (*reads*) με τις αναγνώσεις του γονιδιώματος αναφοράς. Στη συνέχεια, για κάθε αλληλουχία αναφοράς συγκρίνεται ο αριθμός των στοιχίσεων από τα δεδομένα των αρσενικών και των θηλυκών(Hall et al., 2013).

Πιο συγκεκριμένα, προκειμένου να γίνει η σύγκριση χρησιμοποιείται το κλάσμα των θηλυκών προς τις αρσενικές στοιχίσεις, το χρωμοσωμικό κλάσμα (chromosome quotient, CQ). Για μία δεδομένη αλληλουχία S_i , το CQ ορίζεται ως $CQ_{(S_i)} = F_{(S_i)} / M_{(S_i)}$, όπου $F_{(S_i)}$ είναι ο αριθμός των στοιχίσεων που προκύπτουν από τα δεδομένα του θηλυκού γονιδιώματος για την S_i , ενώ $M_{(S_i)}$ είναι ο αντίστοιχος αριθμός των στοιχίσεων στο αρσενικό γονιδίωμα.

Επειδή τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα είναι κοινά στα δυο γονιδιώματα, οι αλληλουχίες τους αντιπροσωπεύονται στον ίδιο βαθμό στα δεδομένα της αλληλούχησης για κάθε φύλο. Γι' αυτό το λόγο, οι αυτοσωμικές αλληλουχίες έχουν τιμές CQ που κατανέμονται κοντά στην τιμή 1. Τα θηλυκά διαθέτουν 2 X χρωμοσώματα και γι' αυτό οι αλληλουχίες του X αντιπροσωπεύονται περίπου σε διπλάσιο βαθμό στα δεδομένα της αλληλούχησης για τα θηλυκά σε σχέση με τα αρσενικά. Έτσι, οι τιμές CQ των αλληλουχιών που βρίσκονται στο X χρωμόσωμα κυμαίνονται κοντά στην τιμή 2. Οι αλληλουχίες που είναι μοναδικές για το Y χρωμόσωμα υπάρχουν μόνο στα δεδομένα από την αλληλούχηση των αρσενικών κι έτσι έχουν τιμές CQ κοντά στην τιμή μηδέν. Οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του Y που όμως απαντώνται και στα δυο φύλα έχουν τιμές CQ μεγαλύτερες από μηδέν αλλά μικρότερες από τις τιμές CQ των αυτοσωμικών αλληλουχιών (Hall et al., 2013).

Τελικά, μια αλληλουχία ταυτοποιείται ως Y-συνδεδεμένη εάν ο αριθμός των στοιχίσεων από τα δεδομένα αλληλούχησης των αρσενικών είναι τουλάχιστον 3,33 φορές μεγαλύτερος από τον αριθμό των στοιχίσεων που προκύπτει από τα δεδομένα αλληλούχησης των θηλυκών. Σε αυτήν την περίπτωση, η τιμή CQ είναι μικρότερη από 0,33. Εάν η κάλυψη του γονιδιώματος διαφέρει για τα δύο φύλα, τότε οι τιμές CQ θα πρέπει να κανονικοποιηθούν ως προς την μέση τιμή των τιμών CQ γνωστών αυτοσωμικών αλληλουχιών (Hall et al., 2013).

2. Σκοπός

Ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό της αλληλουχίας των χρωμοσωμάτων του δάκου της ελιάς έχει αποκρυπτογραφηθεί, οπότε αυτή τη στιγμή εξερευνώνται οι λειτουργίες των γνωστών περιοχών. Τα φυλετικά χρωμοσώματα παρουσιάζουν μεγάλο εξελικτικό, αλλά κυρίως πρακτικό ενδιαφέρον διότι σχετίζονται με τον καθορισμό του φύλου και σε κάποιες περιπτώσεις φέρουν και κάποιους παράγοντες γονιμότητας.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάλυση της έκφρασης περιοχών που βρίσκονται σε *scaffolds* τα οποία έχουν προκύψει από την αλληλούχηση του γονιδιώματος και χαρτογραφούνται στο Υ χρωμόσωμα. Αυτό που τα καθιστά ενδιαφέροντα είναι πως οι αλληλουχίες τους είναι Υ-ειδικές και είναι πιθανόν πως περιέχουν κάποιο/-α γονίδιο/-α τα οποία παίζουν καθοριστικό ρόλο στον φυλοκαθορισμό ή στην γονιμότητα των αρσενικών εντόμων. Θα μπορούσαν να υπάρχουν και άλλα γονίδια με διαφορετικές λειτουργίες, ωστόσο κάτι τέτοιο κρίνεται αμφίβολο διότι το Υ χρωμόσωμα του δάκου της ελιάς είναι πολύ μικρό, πλήρως ετεροχρωματινικό και διάσπαρτο με επαναλήψεις και μεταθετά στοιχεία.

Όποτε, το πρώτο βήμα ήταν να γίνει το προφίλ έκφρασης κάποιων επιλεγμένων μεταγραφικά ενεργών περιοχών από συγκεκριμένα Υ-ειδικά *scaffolds* σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια καθώς και στους ενήλικους αναπαραγωγικούς ιστούς και αδένες, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν υπάρχει κάποιο γονίδιο με ενδιαφέρον προφίλ έκφρασης.

Το επόμενο βήμα ήταν η *in silico* ανάλυση των *scaffolds* προκειμένου να διαλευκανθεί ο πιθανός ρόλος των μεταγραφικά ενεργών περιοχών.

Η συσχέτιση μεταξύ του προφίλ έκφρασης και του πιθανού ρόλου των γονιδίων θα υποδείξει αν κάποιο από αυτά τα γονίδια θα μπορούσε να διαδραματίζει κάποιον ρόλο στην γονιμότητα των αρσενικών εντόμων, οπότε σε επόμενο στάδιο θα μπορούσε να γίνει παροδική σίγηση του γονιδίου και να παρατηρηθεί ο φαινότυπος που θα προέκυπτε.

3. Μέθοδοι-Υλικά

3.1. Βιολογικό υλικό: εργαστηριακός πληθυσμός *Bactrocera oleae*

Χρησιμοποιήθηκε ο εργαστηριακός πληθυσμός του δάκου που διατηρείται στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής και προέρχεται από τον αρχικό πληθυσμό 'Demokritos'. Ο πληθυσμός εκτρέφεται στους 25°C, σε συνθήκες υγρασίας 60-65% και σε φωτοπερίοδο 12h φως:12h σκοτάδι σε κλουβιά διαστάσεων 30x30x30cm³.

3.2. Συλλογή ιστών

Για την διεξαγωγή του πειράματος απαιτήθηκε η συλλογή ιστών από έντομα που βρίσκονταν σε διαφορετικά χρονικά σημεία του βιολογικού τους κύκλου. Πιο συγκεκριμένα, απαιτήθηκε η συλλογή των ιστών που αναφέρονται στον ακόλουθο πίνακα:

Αναπτυξιακά στάδια		Στάδια ενήλικης ανάπτυξης	
Είδος ιστού	Χρονικό σημείο	Είδος ιστού	Χρονικό σημείο
Αυγά	1h	Όρχεις & Βοηθητικοί Αδένες	ημέρα μηδέν
Αυγά	15h	Όρχεις & Βοηθητικοί Αδένες	3 ^η ημέρα
Αυγά	48h	Όρχεις & Βοηθητικοί Αδένες	7 ^η ημέρα (πριν την σύζευξη)
Προνύμφες	1 ^{ου} σταδίου	Όρχεις & Βοηθητικοί Αδένες	7 ^η ημέρα(μετά την σύζευξη)
Προνύμφες	3 ^{ου} σταδίου	Όρχεις & Βοηθητικοί Αδένες	9 ^η ημέρα(48h μετά την σύζευξη)
Νύμφες	1 ^{ης} ημέρας		
Νύμφες	3 ^{ης} ημέρας		

3.2.1. Συλλογή αυγών

Η συλλογή αυγών πραγματοποιήθηκε ως εξής:

1. Στα κλουβιά των εντόμων τοποθετήθηκαν κώνοι μικρών διαστάσεων επιστρωμένοι με κερί. Το κερί αποτελούσε το υπόστρωμα για ωαπόθεση.
2. Ανά 15 λεπτά αφαιρούνταν οι κώνοι, ξεπλένονταν με απιονισμένο νερό και συλλέγονταν τα αυγά.

3. Μετά από κάθε ξέπλυμα, τα αυγά τοποθετούνταν σε μικρά τρυβλία στον πάτο των οποίων υπήρχε διηθητικό χαρτί εμβαπτισμένο σε προπιονικό οξύ 0.3%
4. Ανάλογα με το χρονικό σημείο (1, 15, 48 ώρες) που θα γινόταν η συλλογή, τα αυγά αφαιρούνταν με πιπέτα από τα τρυβλία και προσμετρούταν.

Το κάθε αυγό αποτελούσε ένα ξεχωριστό βιολογικό δείγμα γι' αυτό και τοποθετούταν σε ξεχωριστό tube χωρητικότητας 0,1 ml το οποίο περιείχε 20μl TRI Reagent.

3.2.2. Συλλογή προνυμφών

Για τη συλλογή των προνυμφών συλλέχθηκαν αυγά και αφέθηκαν να αναπτυχθούν σε θρεπτικό μέσο κατάλληλο για την ανάπτυξη προνυμφών. Ανάλογα με το χρονικό σημείο (1^ο και 3^ο) που θα γινόταν η συλλογή, οι προνύμφες συλλέγονταν και μεταφέρονταν σε ξεχωριστά tubes, το καθένα από τα οποία περιείχε 50μl TRI Reagent.

Οι προνύμφες 1^{ου} σταδίου και 3^{ου} σταδίου διέφεραν σε μήκος και πάχος. Οι προνύμφες 1^{ου} σταδίου είναι πολύ μικρές και λεπτές ενώ οι προνύμφες 3^{ου} σταδίου είναι ένα στάδιο πριν βομβυκιωθούν. Στην *Εικόνα 7* παρουσιάζονται μία προνύμφη 1^{ου} και μία 3^{ου} σταδίου όπου είναι εμφανείς οι διαφορές στη μορφολογία τους.



Εικόνα 7: Στην αριστερή εικόνα απεικονίζεται μία προνύμφη 1^{ου} σταδίου, η οποία είναι μικρή σε μέγεθος και συγκριτικά πιο λεπτή από την προνύμφη 3ου σταδίου (δεξιά εικόνα), η οποία είναι βραδυκίνητη και έτοιμη να βομβυκιωθεί.

3.2.3. Συλλογή νυμφών

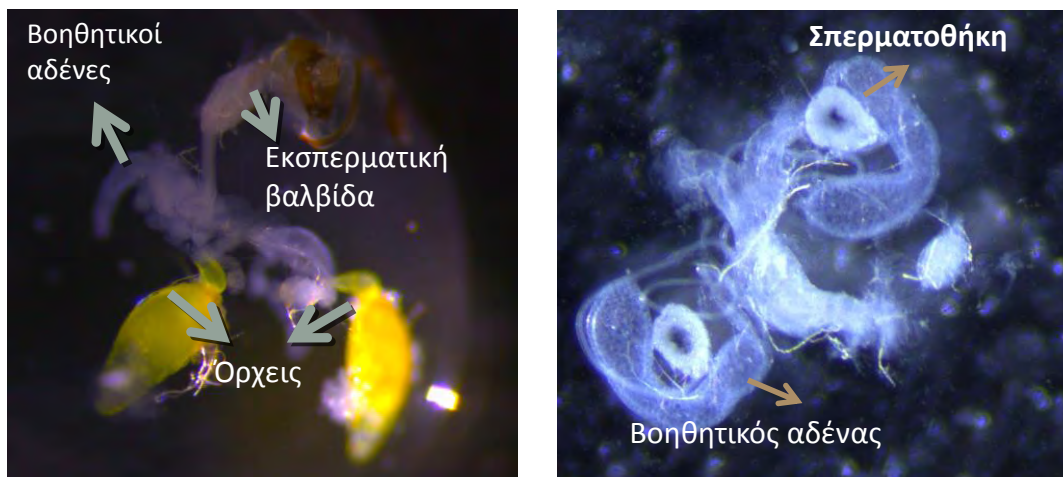
Για τη συλλογή των νυμφών, επιλέχθηκαν προνύμφες 3^{ου} σταδίου και παρατηρούνταν καθημερινώς η ανάπτυξή τους. Ανάλογα με το χρονικό σημείο (1ης ημέρας και 48 ώρες μετά) που θα γινόταν η συλλογή, οι νύμφες συλλέγονταν και μεταφέρονταν σε ξεχωριστά tubes, το καθένα από τα οποία περιείχε 50μl TRI Reagent.

3.2.4. Συλλογή ιστών από ενήλικα έντομα

Για τη συλλογή ιστών από ενήλικα έντομα η διαδικασία έγινε ως εξής:

1. Πραγματοποιήθηκε διαχωρισμός των ενήλικων εντόμων ανάλογα με το φύλο (αρσενικά ή θηλυκά) από την ημέρα 0 (1η μέρα ενήλικου εντόμου).
2. Ανάλογα με το χρονικό σημείο που θα γινόταν η συλλογή, τα έντομα τοποθετούνταν σε μικρά φυαλίδια μέσα στον πάγο για να ακινητοποιηθούν.
3. Τα έντομα τοποθετούνταν πάνω σε γυάλινα πλακάκια και εμβαπτίζονταν μέσα σε μια σταγόνα αποστειρωμένου ddH₂O. Με ειδική λαβίδα αφαιρούνταν τα γεννητικά τους όργανα κάτω από το στερεοσκόπιο. Τα γεννητικά όργανα, δηλαδή οι όρχεις και οι βοηθητικοί αδένες (MAGs) ήταν διακριτά λόγω της χαρακτηριστικής μορφολογίας τους (Εικόνα 8).

Αμέσως μετά την εκτομή, οι όρχεις και οι βοηθητικοί αδένες τοποθετούνταν ξεχωριστά σε tubes που περιείχαν 50 μl TRI Reagent.



Εικόνα 8: Στην αριστερή φωτογραφία απεικονίζονται τα αρσενικά γεννητικά όργανα ενήλικων εντόμων (βοηθητικοί αδένες, όρχεις και εκσπερματική βαλβίδα). Στη δεξιά φωτογραφία απεικονίζονται τα θηλυκά γεννητικά όργανα (σπερματοθήκη και βοηθητικός αδένας).

Για τους ιστούς μετά τη σύζευξη, παρθένα έντομα 7 ημερών από τα δυο φύλα τοποθετώνταν σε κοινό κλουβί. Γινόταν παρατήρηση των εντόμων και απομόνωση των ζευγαριών που συζευγνύονταν σε ειδικά φυαλίδια. Μετά την ολοκλήρωση της σύζευξης το αρσενικό διατηρούνταν στο φυαλίδιο ώστε να ακολουθήσει η εκτομή των αναπαραγωγικών οργάνων. Για να θεωρηθεί μια σύζευξη επιτυχημένη έπρεπε να διαρκέσει το λιγότερο μια ώρα.

3.3. Απομόνωση ολικού RNA από τους επιλεγμένους ιστούς

Η απομόνωση του RNA έγινε με το TRI Reagent[®] (TR 118) σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Molecular Research Center, Inc. (@mrcgene).

Ομογενοποίηση των ιστών

1. Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για να ξεπαγώσουν

2. Ομογενοποίηση των δειγμάτων με αποστειρωμένο pestle.
3. Πλύση των pestle με επιπρόσθετη ποσότητα TRI Reagent στο eppendorf για την ανάκτηση υπολειμμάτων του ιστού στο pestle. Κατόπιν vortex και quick spin.

Διαχωρισμός των φάσεων

4. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
5. Ελαφρύ vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
6. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 12.000rpm για 10 λεπτά, για την απομάκρυνση όλων των κυτταρικών υπολειμμάτων και κατόπιν μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube (1,5 ml).
7. Πρόσθεση 0,1X BCP και ανάδευση για 15 δευτερόλεπτα.
8. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
9. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 12.000g για 15 λεπτά.

Κατακρήμνιση του RNA

10. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο tube (1,5 ml). Η υπόλοιπη ποσότητα που έμεινε σε κάθε tube φυλάχθηκε για να χρησιμοποιηθούν στη συνέχεια για την απομόνωση του DNA.
11. Προσθήκη 0,5X όγκου (ανά 1 ml TRI Reagent[®] που χρησιμοποιήθηκε στην αρχική ομογενοποίηση) παγωμένης ισοπροπανόλης και 0,5 ml γλυκογόνο.
12. Vortex και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
13. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 12.000 g για 8 λεπτά.

Πλύση του RNA.

14. Αφαίρεση υπερκειμένου και πλύση με 200 μl 75% παγωμένη αιθανόλη(1 ml αιθανόλη ανά 1 ml TRI Reagent[®] που χρησιμοποιήθηκε στην αρχική ομογενοποίηση)
15. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 12.000g για 5 λεπτά.
16. Επανάληψη των βημάτων 15 και 16 ακόμη δυο φορές.

Διαλυτοποίηση του RNA.

Αφαιρέθηκε όλη η ποσότητα της αιθανόλης προσεκτικά με πιπέτα και στη συνέχεια τα δείγματα τοποθετήθηκαν πλαγίως με ανοιχτά τα καπάκια στον απαγωγό προκειμένου να στεγνώσουν τελείως. Μόλις στέγνωσαν από τα υπολείμματα αιθανόλης, τα ιζήματα επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε 10 μl H₂O, το οποίο είχε προηγουμένως θερμανθεί στους 55°C και ακολούθησε ήπιο πιπετάρισμα. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -20 °C.

3.4. Απομόνωση ολικού DNA από τους επιλεγμένους ιστούς

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο της εταιρείας Molecular Research Center, Inc. (@mrcgene)

Τα δείγματα που φυλάχθηκαν κατά την απομόνωση του RNA (βήμα 10) κατά το στάδιο της κατακρήμνισης χρησιμοποιήθηκαν για την απομόνωση του DNA.

Κατακρήμνιση του DNA.

1. Τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για να ξεπαγώσουν.

2. Κατακρήμνιση με 60 μl αιθανόλη 100% (0,3 ml αιθανόλη ανά 1 ml TRI Reagent[®] που χρησιμοποιήθηκε στην αρχική ομογενοποίηση του ιστού) και ελαφριά ανακίνηση των tubes.
3. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά.
4. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 2.000 g για 5 λεπτά.

Πλύση του DNA

5. Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 200 μl trisodium citrate 0,1M σε αιθανόλη 10% (1 ml του διαλύματος ανά 1ml TRI Reagent[®] που χρησιμοποιήθηκε στην αρχική ομογενοποίηση του ιστού).
6. Ελαφρύ Vortex για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 2.000 g για 5 λεπτά.
8. Αφαίρεση υπερκείμενου.
9. Επανάληψη των βημάτων 5-7 ακόμη μία φορά.

Διαλυτοποίηση του DNA.

10. Αφαίρεση υπερκείμενου και προσθήκη 30 μl αιθανόλη 75% (1,5 ml αιθανόλη ανά 1ml TRI Reagent[®] που χρησιμοποιήθηκε στην αρχική ομογενοποίηση του ιστού).
11. Επώαση σε θερμοκρασία και ήπια ανάδευση για 10 λεπτά.
12. Φυγοκέντρηση στους 4°C, 12.000 g για 5 λεπτά.
13. Αφαίρεση υπερκείμενου και στέγνωμα στον απαγωγό για μερικά λεπτά.
14. Επαναδιαλυτοποίηση των ιζημάτων σε 20 μl mM NaOH. Τα δείγματα φυλάχθηκαν στους -4°C προσωρινά.

Το πρωτόκολλο, τις επόμενες φορές που χρησιμοποιήθηκε, τροποποιήθηκε ελαφρώς ώστε να είναι πιο αποδοτικό για την απομόνωση DNA από μικρή ποσότητα δείγματος.

-Συγκεκριμένα, στο βήμα 2, μαζί με την αιθανόλη 100% προσθέταμε και 2 μl γλυκογόνο, στην συνέχεια γινόταν η επώαση και έπειτα η φυγοκέντρηση.

-Τα βήματα 5-9 παραλείφθηκαν τελείως.

-Στο βήμα 10, αφού αφαιρέθηκε το υπερκείμενο, έγιναν 2 πλύσεις με αιθανόλη 75%(αντί για μία) οι οποίες διήρκησαν 10 λεπτά η καθεμία. Τα δείγματα αναδιαλύθηκαν σε 20 μl H₂O και ακολούθως φυγοκεντρήθηκαν στα 9,661 rpm για 10 λεπτά.

3.5. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

3.5.1. Απλή Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης

Αρχή της μεθόδου

Η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) είναι μία τεχνική η οποία έχει μεταμορφώσει την βιολογική επιστήμη από την στιγμή που πρωτοσυλλήφθηκε (Mullis, 1990). Στον τομέα της έρευνας, η PCR μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό μοναδικών γονιδίων μέσα από πολύπλοκες γονιδωματικές αλληλουχίες, τη γονιδιακή κλωνοποίηση, την *in vitro* κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση, την ανίχνευση γονιδιακών μεταλλάξεων και για πλήθος ακόμα εφαρμογών.

Πρόκειται για μία απλή, ωστόσο κομψή, ενζυμική μέθοδο που επιτρέπει την ειδική ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί DNA από οποιοδήποτε πηγή, ακόμη και σε μικρή ποσότητα, προκειμένου να παραχθεί ένας μεγάλος αριθμός αντιγράφων. Τα δυο βασικά χαρακτηριστικά της PCR που την καθιστούν τόσο σημαντική είναι η εξειδίκευση και η ευαισθησία. Η εξειδίκευση έγκειται στην δυνατότητα να ενισχύεται ειδικά μόνο η επιθυμητή αλληλουχία DNA, χωρίς να παράγονται παραπροϊόντα. Η ευαισθησία από την άλλη, έγκειται στην ικανότητα να ενισχύονται ακόμα και αλληλουχίες DNA οι οποίες βρίσκονται σε πολύ μικρή ποσότητα στο δείγμα. Η εξειδίκευση και η ευαισθησία είναι δυο παράμετροι οι οποίες μπορεί να κυμαίνονται ανάλογα με τον σχεδιασμό του πειράματος και τις συνιστώσες που επιλέγονται από τον εκάστοτε ερευνητή.

Η αντίδραση PCR βασίζεται στην Taq πολυμεράση, μία θερμοανθεκτική πολυμεράση του DNA που έχει απομονωθεί από το βακτήριο *Thermus aquaticus* (Saiki et al., 1988). Ακόμη, σημαντική είναι και η εξάρτηση της μεθόδου από ένα ζεύγος συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων, τους εκκινητές (*primers*). Οι εκκινητές καθορίζουν τα όρια του τμήματος το οποίο θα ενισχυθεί και πρέπει να είναι αντιπαράλληλου προσανατολισμού. Κάθε εκκινητής πρέπει να είναι συμπληρωματικός προς τη μία αλυσίδα του υπό μελέτη DNA και να σχεδιάζεται με τέτοιο τρόπο ώστε να αποφεύγεται η υβριδοποίηση των εκκινητών μεταξύ τους. Στην αντίδραση προστίθενται επίσης ελεύθερα 5' τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια. Τέλος, η αντίδραση περιλαμβάνει επίσης κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα (*buffer*) της Taq πολυμεράσης, ώστε να διατηρούνται σταθερά το pH και η ιονική ισχύς του περιβάλλοντος της αντίδρασης. Συνήθως, το διάλυμα αυτό περιέχει και $MgCl_2$, το οποίο παρέχει τα ιόντα Mg^{2+} τα οποία συνδέονται με τα δεοξυριβονουκλεοτίδια ώστε να δημιουργήσουν το πραγματικό υπόστρωμα που αναγνωρίζει η πολυμεράση (Lorenz, 2012).

Μία τυπική αντίδραση PCR αποτελείται από 30 κύκλους πολυμερισμού και σε κάθε κύκλο επαναλαμβάνονται διαδοχικά τα εξής βήματα:

1. Το στάδιο της αποδιάταξης.

Πραγματοποιείται ολική αποδιάταξη του DNA στόχου σε θερμοκρασία 94°C για 30 δευτερόλεπτα. Εάν η αποδιάταξη διαρκέσει περισσότερο του αναγκαίου χρόνου ελαττώνεται η ενεργότητα του ενζύμου.

2. Το στάδιο της υβριδοποίησης.

Οι ειδικοί εκκινητές υβριδοποιούνται με το αποδιαταγμένο DNA στόχο. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζονται για την υβριδοποίηση εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση (*T_a*) ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το υπολογιζόμενο σημείο τήξης του ζεύγους των εκκινητών (*T_m*). Οι δυο εκκινητές πρέπει να έχουν παρόμοια θερμοκρασία *T_m* ώστε να αποφεύγεται η δημιουργία ανεπιθύμητων παραπροϊόντων, καθώς και ενδομοριακών δευτεροταγών δομών.

3. Το στάδιο της επιμήκυνσης.

Η πολυμεράση χρησιμοποιεί ως εκμαγείο τις μονόκλωνες αλυσίδες DNA και επεκτείνει τους εκκινητές προσθέτοντας δεοξυριβονουκλεοτίδια στο ελεύθερο 3' άκρο τους. Έτσι, από κάθε εκκινητή που έχει υβριδοποιηθεί συντίθεται μια συμπληρωματική αλυσίδα. Συνήθως το στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα στους 72°C.

Πειραματική διαδικασία

Η κατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Αντίδραση PCR	C _{αρχ.} (stock)	C _{τελ.}	Ποσότητα
Γενωμικό DNA	-		1 μl
Buffer	10x	1x	1,5 μl
dNTPs	40 mM	0.8 mM	0,4 μl
Primer Forward	10 pmol/μl	0,7 pmol/μl	0,7 μl
Primer Reverse	10 pmol/μl	0,7 pmol/μl	0,7 μl
Maximo Taq Polymerase	10 units/μl	1 unit/μl	0,2 μl
H ₂ O			10,5 μl
V _{τελ.}			15 μl

Στη συνέχεια, τα δείγματα, καθώς και ένα αρνητικό δείγμα *control* τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή και ξεκίνησε η αντίδραση της PCR, τα βήματα της οποίας παρατίθενται αποκάτω:

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αρχική αποδιάταξη	95° C	3 min	1
Αποδιάταξη	95° C	30 sec	30
Υβριδοποίηση	52° C	30 sec (1 kb/min)	
Επιμήκυνση	72° C	32 sec	
Τελική επιμήκυνση	72° C	5 min	1
Διατήρηση	12° C	∞	

3.5.2. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (quantitative real-time PCR, qRT-PCR)

Βασικές αρχές της ποσοτικής real-time PCR

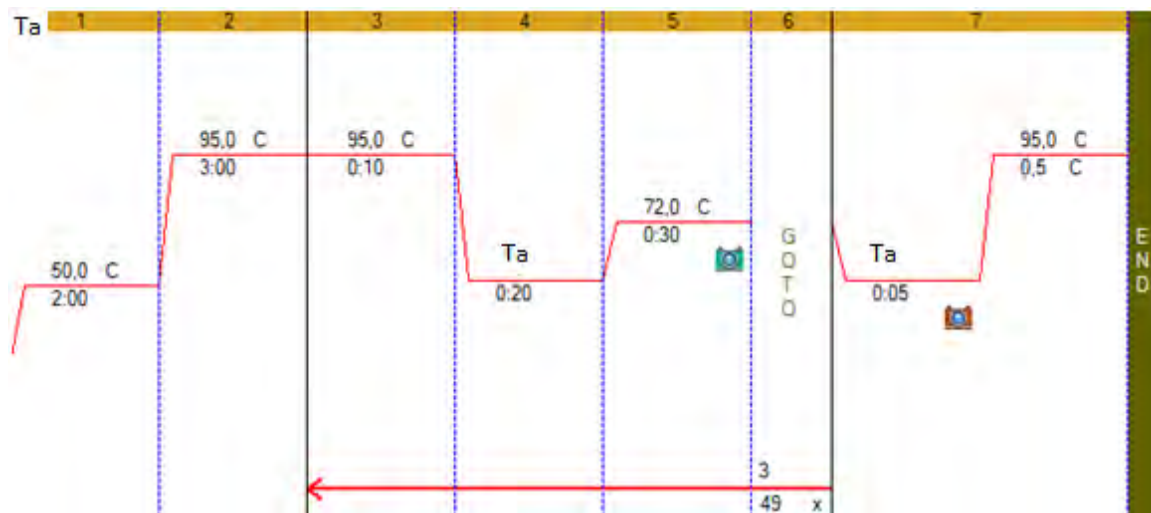
Η ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου είναι μία παραλλαγή της απλής PCR, η οποία επιτρέπει την παρακολούθηση της συσσώρευσης του προϊόντος ενίσχυσης καθώς η αντίδραση εξελίσσεται. Συνεπώς, τα αποτελέσματα της qRT-PCR μπορούν να αξιολογηθούν χωρίς να χρειάζεται ηλεκτροφόρηση των ενισχυμένων προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης.

Η ανίχνευση των προϊόντων καθίσταται δυνατή μέσω της ενσωμάτωσης στην αντίδραση ενός φθορίζοντος μορίου το οποίο παρέχει πληροφορίες για την ποσότητα του DNA μέσω της μέτρησης της αναλογικής αύξησης του φθορίζοντος σήματος. Η μέτρηση του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης αντανακλά την ποσότητα του ενισχυμένου προϊόντος. Η πιο κοινώς χρησιμοποιούμενη φθορίζουσα χρωστική που προσδένεται στο DNA είναι η *SYBR Green I*, η οποία προσδένεται μη ειδικά σε δίκλινα μόρια DNA .

Αρχικά, ο φθορισμός παραμένει σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα, ακόμη κι αν το προϊόν συσσωρεύεται εκθετικά (κύκλος 1-18). Τελικά, συσσωρεύεται αρκετή ποσότητα του προϊόντος

ώστε να ξεπεραστεί μία τιμή-κατώφλι και να μετρηθεί φθορίζον σήμα. Ο κύκλος κατά τον οποίο συμβαίνει αυτό ονομάζεται CT (*Threshold Cycle*). Καθώς η τιμή CT προσμετράται κατά την εκθετική φάση αύξησης του αριθμού αντιγράφων, πριν επικρατήσει το *plateau* κατά το οποίο τα αντιδραστήρια είναι περιορισμένα, η qPCR μπορεί να μετρήσει με αξιοπιστία την αρχική ποσότητα του υποστρώματος που υπήρχε στην αντίδραση. Η τιμή CT καθορίζεται κυρίως από την ποσότητα του υποστρώματος που υπήρχε στην αρχή της αντίδρασης. Εάν υπήρχε μεγάλη ποσότητα του υποστρώματος στην αρχή της αντίδρασης, θα χρειαστούν λιγότεροι κύκλοι για να συσσωρευτεί αρκετό προϊόν ώστε να μετρηθεί φθορίζον σήμα. Έτσι, η αντίδραση αυτή θα έχει χαμηλή τιμή CT. Αντίστοιχα, εάν το αρχικό υπόστρωμα υπήρχε σε μικρή ποσότητα, η αντίδραση θα έχει μεγάλο CT.

Η καμπύλη *Melt-curve* μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση των διαφορετικών προϊόντων της αντίδρασης, συμπεριλαμβανομένων των παραπροϊόντων. Μετά το πέρας της αντίδρασης ενίσχυσης, σχεδιάζεται μια καμπύλη μέσω της σταδιακής αύξησης της θερμοκρασίας και μετράται το φθορίζον σήμα σε κάθε βήμα. Καθώς το δίκλωνο DNA αποδιατάσσεται, ο φθορισμός μειώνεται. Η πρώτη αρνητική παράγωγος της μεταβολής της θερμοκρασίας σχεδιάζεται ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Μία χαρακτηριστική κορυφή της θερμοκρασίας τήξης του προϊόντος ενίσχυσης το διακρίνει από άλλα παραπροϊόντα, όπως διμερή εκκινητών, τα οποία τήκονται σε άλλη θερμοκρασία. Τα βήματα μίας qRT-PCR φαίνονται στην *Εικόνα 9*.



Εικόνα 9: Τα στάδια μίας τυπικής αντίδρασης qRT-PCR. Στο στάδιο 1 πραγματοποιείται επώαση για 2 λεπτά στους 50°C. Στο στάδιο 2 λαμβάνει χώρα η αρχική αποδιάταξη του cDNA στους 95°C για 3 λεπτά. Στο στάδιο 3 γίνεται η αποδιάταξη στους 95°C για 10 δευτερόλεπτα. Στο στάδιο 4 υβριδοποιούνται οι ειδικοί εκκινητές στα μονόκλιωνα τμήματα cDNA σε θερμοκρασία Ta (Tm-5°C) για 20 δευτερόλεπτα. Η επιμήκυνση από την πολυμεράση γίνεται στο στάδιο 5 σε θερμοκρασία 72°C για 30 δευτερόλεπτα. Τα βήματα 3,4,5 επαναλαμβάνονται 49 φορές. Στο τελευταίο στάδιο, η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά από την θερμοκρασία Ta μέχρι τους 95°C προκειμένου να σχεδιαστεί η καμπύλη τήξης (*melt curve*).

Για τους σκοπούς του πειράματος δεν απαιτούνταν η ακριβής γνώση της ποσότητας των γονιδίων στόχων στα δείγματα, αλλά τα επίπεδα της έκφρασής τους σε διάφορους ιστούς. Επομένως, η ποσοτικοποίηση που έγινε για τους σκοπούς του πειράματος ήταν σχετική, δηλαδή η τιμή CT των δειγμάτων cDNA κανονικοποιούνταν ως προς την τιμή CT του αντίστοιχου γονιδίου αναφοράς (*housekeeping gene*). Η ανάλυση αποδίδει μία αναλογία, δηλαδή την σχετική αναλογία του cDNA-στόχου ως προς το cDNA του γονιδίου αναφοράς. Το γονίδιο αναφοράς είναι ένα γονίδιο το οποίο έχει σταθερή έκφραση σε όλα τα δείγματα και δεν επηρεάζεται από τις συνθήκες του πειράματος. Σε περιπτώσεις που υπάρχει διαθέσιμη μικρή ποσότητα αρχικού υποστρώματος, η χρήση του γονιδίου αναφοράς καθίσταται πολύτιμη.

Υλικά για αντίδραση όγκου 15 μl

<i>Αντίδραση RT-PCR</i>	<i>Ποσότητες</i>
<i>Ολικό cDNA</i>	<i>2 μl</i>
<i>Primer Forward(10 μM)</i>	<i>1,4 μl (300 nM)</i>
<i>Primer Reverse(10 μM)</i>	<i>1,4 μl (300 nM)</i>
<i>Master Mix (2X)</i>	<i>23,6 μl</i>
<i>H2O</i>	<i>5 μl</i>
<i>Υτελ.</i>	<i>15 μl</i>

Το Master Mix περιέχει την Ταq πολυμεράση, dNTPs, MgCl₂ και SYBR Green I.

3.6. Ηλεκτροφόρηση του DNA

Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων είναι δυνατόν να αναλυθούν μέσω ηλεκτροφόρησης. Λόγω διαφορών ως προς το σχήμα, το μέγεθος ή το φορτίο τους κινούνται με διαφορετικές ταχύτητες μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο κι έτσι είναι δυνατόν να διαχωριστούν σε κατάλληλες συνθήκες, διατηρώντας μάλιστα τις βιολογικές τους ιδιότητες. Οι Arne Tiselius και Theodor Svedberg ανέπτυξαν το 1926 τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης κινούμενου μετώπου (moving boundary electrophoresis). Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν ανθεκτικά υλικά, συνήθως χάρτινα φίλτρα και πηκτώματα που αποτελούνταν από πολυμερή όπως η αγαρόζη και η πολυακρυλαμίδα.

Η ταχύτητα με την οποία κινούνται τα τμήματα του DNA μέσα σε ένα πήκτωμα αγαρόζης είναι συνάρτηση του μήκους τους, του φορτίου τους και του σχήματός τους. Μέσα στο ηλεκτρικό πεδίο που δημιουργείται, τα μόρια DNA, τα οποία είναι αρνητικά φορτισμένα κινούνται από τον αρνητικό προς τον θετικό πόλο. Τα μικρά τμήματα γενικά κινούνται γρηγορότερα μέσα από του πόρους του πηκτώματος σε σχέση με τα μεγάλα τμήματα. Υπάρχει μία γραμμική σχέση μεταξύ του λογαρίθμου της ελεύθερης ηλεκτροφορητικής ικανότητας του DNA (μ) και της συγκέντρωσης του πηκτώματος αγαρόζης (τ), η οποία δίνεται από τον τύπο:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_R \tau$$

όπου μ_0 η ελεύθερη ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και K_R ο συντελεστής καθυστέρησης, μια σταθερά που σχετίζεται με τις ιδιότητες του πηκτώματος, το μέγεθος και το σχήμα των προς ανάλυση μορίων (Helling *et al.*, 1974).

Τα τμήματα DNA με μέγεθος από 100 βάσεων έως και αρκετές χιλιάδες ζεύγη βάσεων είναι δυνατόν να διαχωριστούν ικανοποιητικά σε ένα πήκτωμα αγαρόζης με συγκέντρωση 1%, εφόσον το μέγεθος των τμημάτων αυτών διαφέρει κατά λίγες εκατοντάδες ζεύγη βάσεων. Κατά την παρασκευή του πηκτώματος προστίθεται μικρή ποσότητα βρωμιούχου αιθιδίου, ενός μορίου το οποίο παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA. Εκθέτοντας το πήκτωμα σε ακτινοβολία UV, τα τμήματα του DNA εμφανίζονται σαν μία σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους. Τα μόρια του DNA που μετακινούνται μέσα στο πήκτωμα είναι δυνατόν να ανακτηθούν (εκλουστούν) και κατόπιν να χρησιμοποιηθούν σε επόμενα πειράματα.

Μετά από μία απλή PCR συνήθως ακολουθεί ηλεκτροφόρηση προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη ή όχι του επιθυμητού προϊόντος και να γίνει προσεγγιστικά ποσοτικοποίηση καθώς και προσδιορισμός του μεγέθους του ενισχυμένου τμήματος. Στα δείγματα DNA προστίθενται δυο χρωστικές (συνήθως μπλε της βρωμοφαινόλης και κυανό της ξυλόλης) κι έτσι αφενός καθίστανται ορατά, γεγονός που διευκολύνει την τοποθέτησή τους στο πήκτωμα, και αφετέρου γίνονται βαρύτερα, ώστε να καθιζάνουν στα πηγαδάκια. Ακόμη, η παρακολούθηση του μετώπου της ηλεκτροφόρησης είναι πιο εύκολο να παρατηρείται με αυτόν τον τρόπο.

3.7. Επεξεργασία με DNAση

Τα δείγματα RNA κατεργάστηκαν με DNAση προκειμένου να αποικοδομηθεί το DNA που πιθανώς περιείχαν, ώστε να πραγματοποιηθεί στη συνέχεια η αντίστροφη μεταγραφή.

Η κατεργασία έγινε σύμφωνα με πρωτόκολλο που παρέχεται από την εταιρεία ambion[®] (lifer technologies[™]) και συνοδεύει το MEGAscript[®] Kit.

Πιο αναλυτικά παρουσιάζονται τα βήματα τα οποία ακολουθήθηκαν:

DNase Reaction	
RNA	10 μ l
TURBO DNase Buffer 10X	1.5 μ l
TURBO DNase (2u/ μ l)	0.5 μ l
H ₂ O	3 μ l
Τελικός όγκος αντίδρασης	15 μl

1. Τα δείγματα υποβλήθηκαν σε spin down και μεταφέρθηκαν σε pcr tubes ώστε να είναι πιο εύκολοι οι χειρισμοί. Αρχικά μοιράστηκε το Master Mix που φτιάξαμε στα pcr tubes που

περιείχαν το RNA και ανακινήσαμε απαλά τα δείγματα.

2. Ακολούθησε επώαση στο φουρνάκι (37°C) για 30 λεπτά και έπειτα προστέθηκε σε κάθε PCR tube 1.5 µl DNase Inactivation Buffer (0.1X του συνολικού όγκου της αντίδρασης) και τα tubes ανακινήθηκαν καλά. Έγινε άλλη μια επώαση, αυτή τη φορά σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, με σποραδική ανάδευση των δειγμάτων.

3. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στα 11.000 g για 2 λεπτά. Μετά το πέρας των πέντε λεπτών η άνω φάση που σχηματίστηκε στα δείγματα (και περιείχε το RNA) μεταφέρθηκε προσεκτικά σε νέα tubes. Ιδιαίτερα σημαντικό ήταν να μη μεταφερθεί μαζί με το RNA και DNase Inactivation Buffer γιατί γενικώς μπορεί να δεσμεύει δισθενή ιόντα και να αλλάζει τις συνθήκες σε ενζυμικές αντιδράσεις που θα χρησιμοποιηθεί το RNA στη συνέχεια.

3.8. Αντίστροφη μεταγραφή και δημιουργία cDNA

Η αντίστροφη μεταγραφή του RNA σε cDNA πραγματοποιήθηκε με το PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) της TAKARA BIO INC., όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο που συνοδεύει το kit.

Reverse Transcription reaction	
5× PrimeScript™ Buffer (for Real Time)	2 µl (1X)
PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5 µl
Oligo dT Primer (50 µM)	0.5 µl (25 pmol)
Random 6 mers (100 µM)	0.5 µl (50 pmol)
total RNA	
RNase Free dH ₂ O	-
Τελικός όγκος αντίδρασης	10 µl

Αρχικά, προετοιμάστηκε το mix για την αντίδραση στον πάγο, σύμφωνα με τον παραπάνω πίνακα. Στη συνέχεια, μοιράστηκε το mix στα tubes με τα δείγματα RNA (3.5 µl ανά tube) και ακολούθησε μία σειρά από επώσεις.

Η πρώτη επώαση πραγματοποιήθηκε στους 37°C για 15 λεπτά, ώστε να πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή. Η δεύτερη επώαση έγινε στους 85°C για 5 δευτερόλεπτα, ώστε να απενεργοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφάση. Η τελευταία επώαση έγινε στους 4°C και στη συνέχεια τα δείγματα φυλάχθηκαν στην κατάψυξη.

3.9. Βιοπληροφορική ανάλυση των γονιδίων

Οι περιοχές που ενισχύονται από τους αρρενοειδικούς εκκινητές εντοπίζονται σε *ικριώματα (scaffolds)* τα οποία έχουν προκύψει από την προσπάθεια ανασύστασης της αλληλουχίας του Y χρωμοσώματος. Η αλληλουχία αυτών των *scaffolds* επεξεργάστηκε στη συνέχεια με διάφορα προγράμματα βιοπληροφορικής προκειμένου να διαλευκανθεί η πιθανή λειτουργία των αρρενοειδικών γονιδίων που εντοπίζονται πάνω σε αυτά τα *scaffolds*. Τα προγράμματα βιοπληροφορικής που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το Omega, το BLAST (NCBI) και σε κάποιες περιπτώσεις όπου απαιτήθηκε χρησιμοποιήθηκε και η βάση δεδομένων Interpro.

Το πρόγραμμα Omega χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να εντοπιστούν τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια(ORFs) των *scaffolds*, καθώς και για να βρεθούν ενδιαφέροντα μοτίβα επάνω στις αλληλουχίες.

Ο αλγόριθμος BLAST χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να βρεθούν ομόλογες αλληλουχίες με τις αλληλουχίες ενδιαφέροντος στις διάφορες βάσεις δεδομένων.

Τέλος, η βάση δεδομένων Interpro χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να βρεθούν συντηρημένα μοτίβα των αλληλουχιών ενδιαφέροντος.

4. Αποτελέσματα

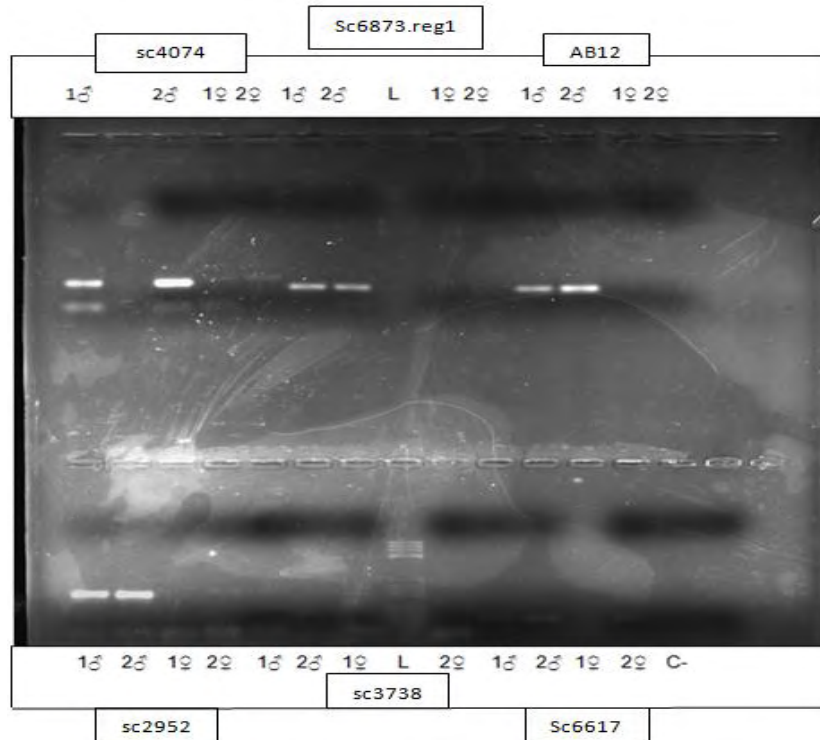
4.1 Επίλογή των γονιδίων

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μία PCR με ειδικά ζεύγη εκκινητών για τις αρρενοειδικές αλληλουχίες που ήταν διαθέσιμες προς εξέταση. Η αντίδραση της PCR προετοιμάστηκε σύμφωνα με τον πίνακα που υπάρχει στην ενότητα 3.4.2. και το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ίδιο με την διαφορά πως χρησιμοποιήθηκε μία διαβάθμιση θερμοκρασίας(T_a) που κυμαινόταν από 55°C (1^η σειρά στον θερμοκυκλοποιητή) έως 45°C (τελευταία σειρά στον θερμοκυκλοποιητή).

Ελέγχθηκαν 6 διαθέσιμα ζεύγη εκκινητών που ήταν σχεδιασμένοι ώστε να ενισχύουν ειδικές αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος.

Για τον έλεγχο χρησιμοποιήθηκε ολικό γενωμικό DNA από δύο θηλυκά έντομα και δύο αρσενικά έντομα. Οι συγκεντρώσεις όλων των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι ίδιες(40 ng/μl). Ο σκοπός ήταν να πιστοποιηθεί η ύπαρξη των προϊόντων ενίσχυσης των ζευγών εκκινητών στα αρσενικά, και ιδανικά η μη ύπαρξή τους στα θηλυκά έντομα. Μετά την PCR, στα δείγματα προστέθηκε χρωστική και φορτώθηκαν σε gel αγαρόζης 2%, όπου έτρεξαν για μία ώρα.

Στην *Εικόνα 10* παρατίθεται η φωτογραφία του ηλεκτώματος αγαρόζης όπου φαίνονται οι χαρακτηριστικές ζώνες.



Εικόνα 10: Παρουσιάζεται η εικόνα ύστερα από την έκθεση του gel σε ακτινοβολία UV. Είναι ξεκάθαρη η ενίσχυση των αρρενοειδικών αλληλουχιών από τα ζεύγη εκκινητών 4074, AB12, 6873.reg1 και 2952 στα αρσενικά έντομα σε σχέση με τα θηλυκά έντομα.

Με βάση τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης, τα γονίδια τα οποία επιλέχθηκαν να αναλυθούν ήταν το 4074, το AB12, το 6873.reg1, το 2952 και εν συνεχεία το 3738.

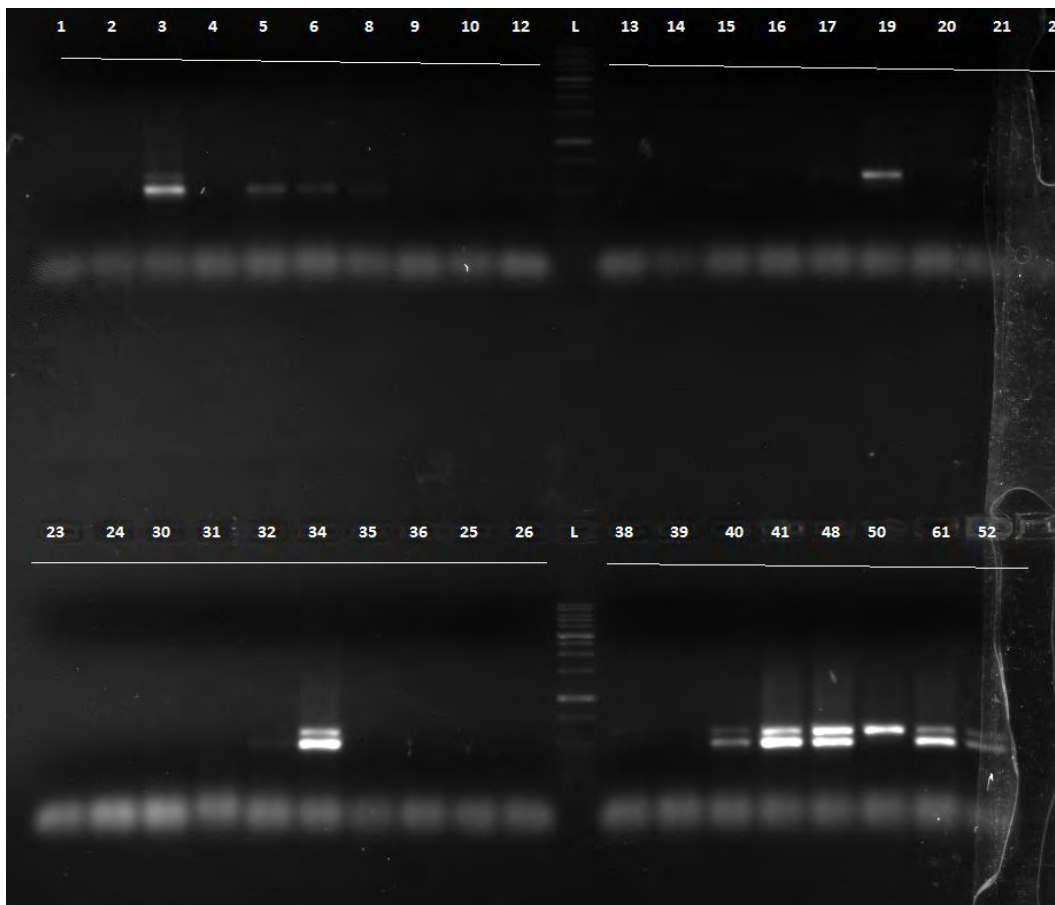
4.2. Κατεργασίες του ολικού DNA των δειγμάτων

Το ολικό DNA που απομονώθηκε από τα βιολογικά δείγματα που συλλέχθηκαν αρχικά ενισχύθηκε με απλή PCR και στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκε. Το ζεύγος των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση (sc6626) ενισχύει μία περιοχή του γονιδιώματος που υπάρχει τόσο στο Y χρωμόσωμα όσο και σε ένα αυτόσωμα. Το δεδομένο αυτό χρησιμοποιήθηκε για να καθοριστεί το φύλο των αυγών, των προνυμφών και των νυμφών που είχαν συλλεγεί.

Χρησιμοποιήθηκαν 5μl DNA από κάθε δείγμα, προστέθηκε χρωστική και τα δείγματα ηλεκτροφορήθηκαν σε gel αгарόζης 1%, σε τάση 150 V για 30 λεπτά.

Τα δείγματα στα οποία εμφανίστηκε μία ζώνη χαρακτηρίστηκαν ως θηλυκά, ενώ αυτά στα οποία εμφανίστηκαν δυο ζώνες χαρακτηρίστηκαν ως αρσενικά.

Παρατίθεται ενδεικτικά μία εικόνα από μία ηλεκτροφόρηση προκειμένου να φανεί παραστατικά ο τρόπος με τον οποίο καθορίζεται το φύλο (Εικόνα 11).



Εικόνα 11: Ενδεικτική φωτογραφία από την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων. Τα δείγματα τα οποία εμφανίζουν 2 ζώνες, όπως για παράδειγμα το 34, ταυτοποιούνται ως αρσενικά έντομα, ενώ αυτά που εμφανίζουν μία, όπως για παράδειγμα το 50, είναι θηλυκά έντομα. Η κάτω ζώνη αντιστοιχεί στο γονίδιο του Y χρωμοσώματος, ενώ η πάνω στο γονίδιο του αυτοσώματος.

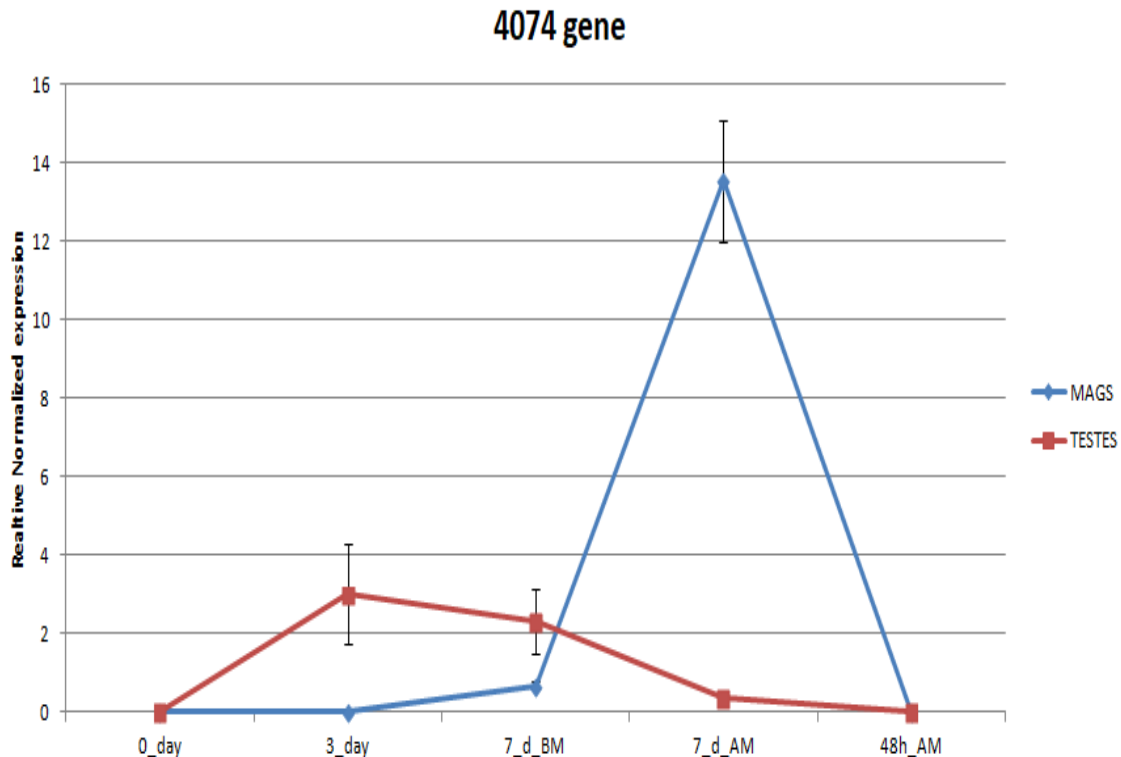
4.3. Ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR

Το πρώτο βήμα, ήταν η ανάλυση των αποτελεσμάτων της Real-time PCR. Λήφθηκαν οι τιμές *CT* για όλα τα βιολογικά δείγματα κάθε κατηγορίας και ελέγχθηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες *melt curve* ώστε να αποκλειστεί η πιθανότητα παραγωγής παραπροϊόντων. Στην συνέχεια έγινε κανονικοποίηση με τις αντίστοιχες τιμές *CT* για όλα τα γονίδια αναφοράς κάθε βιολογικού δείγματος και έγιναν τα Gene studies με τη βοήθεια του προγράμματος *CFX Manager* της *Biorad*. Οι κανονικοποιημένες τιμές κατόπιν εισάχθηκαν στο *Excel* και υπολογίστηκε ανά κατηγορία αναπτυξιακών σταδίων και ιστών η μέση τιμή, η τυπική απόκλιση και το τυπικό σφάλμα για κάθε τριάδα βιολογικών δειγμάτων. Τα συγκεντρωτικά αποτελέσματα για κάθε κατηγορία ιστών παρατίθενται στα διαγράμματα που θα ακολουθήσουν στις επόμενες ενότητες.

4.3.1. Το γονίδιο 4074

4.3.1.1. Προφίλ έκφρασης γονιδίου 4074

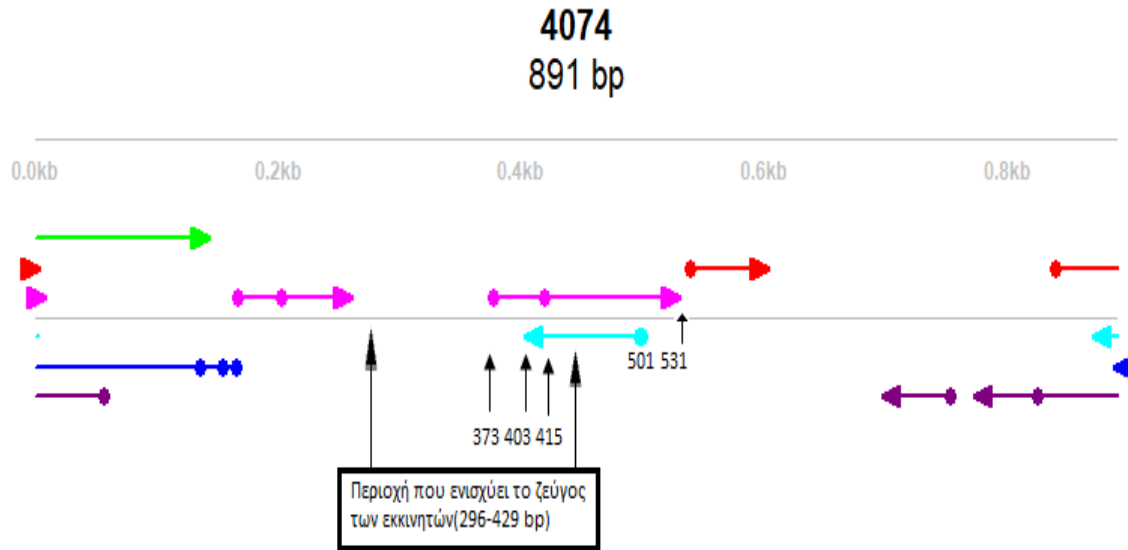
Σύμφωνα με το προφίλ έκφρασης, το γονίδιο 4074 δεν εκφράζεται καθόλου (μηδενική έκφραση) σε κανένα από τα αναπτυξιακά στάδια του αυγού, της προνύμφης και της νύμφης. ενώ στα ενήλικα γεννητικά όργανα, η έκφραση του είναι αυξημένη (διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου 4074 συγκριτικά στους όρχεις και στους βοηθητικούς αδένες. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει την σχετική κανονικοποιημένη έκφραση, ενώ ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τα χρονικά στάδια που ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν τη διακύμανση μεταξύ των διαφορετικών βιολογικών δειγμάτων. Τα γονίδια αναφοράς με τα οποία έγινε η κανονικοποίηση των βιολογικών δειγμάτων είναι το *Rpl19* για τους βοηθητικούς αδένες και η *α-tubulin* για τους όρχεις (Sagri *et al.*, 2017). BM: πριν την σύζευξη, AM: μετά την σύζευξη, MAGs: Βοηθητικοί Αδένες.

4.3.1.2. Βιοπληροφορική ανάλυση

Με τη βοήθεια του προγράμματος *Omi* αναγνωρίστηκαν όλα τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια της περιοχής (scaffold) μέσα στην οποία συμπεριλαμβάνεται η περιοχή που ενισχύουν οι εκκινητές 4074 (Εικόνα 12).



Εικόνα 12: Χάρτης του *scaffold* 4074 όπου φαίνονται όλα τα αναγνωστικά πλαίσια(ροζ βέλη→αναγνωστικό πλαίσιο +1, γαλάζια→-1, κόκκινα→+2, μπλε→ -2,πράσινα→ +3, μωβ→-3). Εικόνα τροποποιημένη από το πρόγραμμα *Omi*.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση της αλληλουχίας στο πρόγραμμα Blast χρησιμοποιώντας αρχικά μόνο τη περιοχή που ενισχύει το ζεύγος των εκκινητών και σταδιακά τις γειτονικές αλληλουχίες, προκειμένου να ελεγχθεί η ομολογία όλων των πιθανών ORFs. Στον πίνακα 1 παρουσιάζονται οι ομολογίες που εντοπίστηκαν.

Subject Query	Blastn hit	Blastp hit	Blastx hit	Tblastx hit	Tblastn hit
373-531 bp	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:2e-38	No significant hit	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:3e-05	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:9e-12	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:3e-04
403-501 bp	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:1e-14	No significant hit E-value>10 ⁻⁵	No significant hit E-value>10 ⁻⁵	No significant hit E-value>10 ⁻⁵	No significant hit E-value>10 ⁻⁵
891 bp	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:3e-46	No significant hit	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:1e-08	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:1e-20	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:1e-20
296-429 bp	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:2e-18	-	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:2e-04	PREDICTED: Bactrocera oleae Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (LOC106619531), transcript variant X1, mRNA E-value:4e-05	-

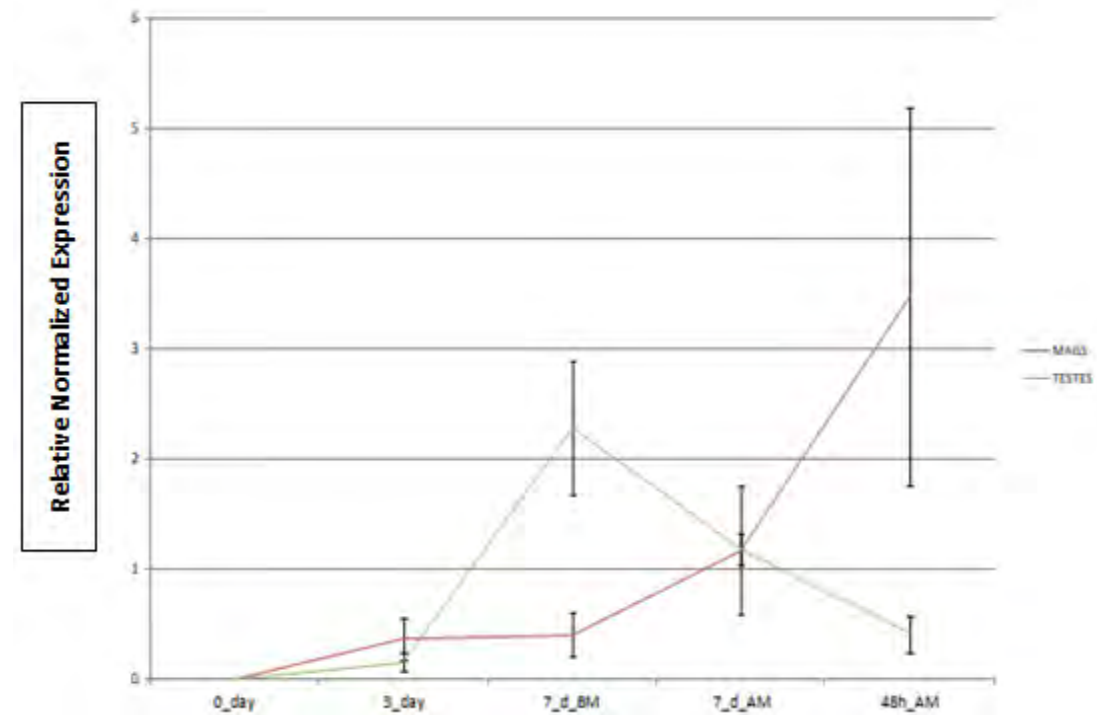
Πίνακας 1. Ενδεικτικά αποτελέσματα Blast με διαφορετικές αλληλουχίες επερώτησης. Η αλληλουχία Subject Query αναφέρεται στο τμήμα της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας της παραπάνω εικόνας που χρησιμοποιήθηκε ως αλληλουχία επερώτησης στο κάθε Blast που έγινε. Η ομολογία αναζητήθηκε στην τάξη Diptera και στην οικογένεια Terphritidae. Σε κάποιες περιπτώσεις χρειάστηκε να τροποποιηθεί ο οργανισμός. Όπου χρειάστηκε η νουκλεοτιδική αλληλουχία να μετατραπεί σε αμινοξική, η μετατροπή έγινε με τα εργαλεία του Omiga.

4.3.2. Το γονίδιο **AB12**

4.3.2.1. Προφίλ έκφρασης γονιδίου **AB12**

Το γονίδιο AB12 δεν εκφράζεται καθόλου (μηδενική έκφραση) σε κανένα από τα αναπτυξιακά στάδια του αυγού, της προνύμφης και της νύμφης.

Αντίθετα, στα ενήλικα αναπαραγωγικά όργανα, η έκφραση του γονιδίου είναι ελαφρώς αυξημένη και αντικατοπτρίζεται στο διάγραμμα που ακολουθεί (διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου AB12 συγκριτικά στους όρχεις και στους βοηθητικούς αδένες. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει την σχετική κανονικοποιημένη έκφραση, ενώ ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τα χρονικά στάδια που ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα. Τα γονίδια αναφοράς με τα οποία έγινε η κανονικοποίηση των βιολογικών δειγμάτων είναι το *Rpl19* για τους βοηθητικούς αδένες και η *α-tubulin* για τους όρχεις (Sagri *et al.*, 2017).

BM: πριν την σύζευξη, AM: μετά την σύζευξη, MAGs: Βοηθητικοί Αδένες

4.3.2.2. Βιοπληροφορική ανάλυση

Με τη βοήθεια του προγράμματος *Omiga* αναγνωρίστηκαν όλα τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια της περιοχής (scaffold) μέσα στην οποία συμπεριλαμβάνεται η περιοχή που ενισχύουν οι εκκινητές AB12 (Εικόνα 13).



Εικόνα 13: Χάρτης του scaffold *NW_013591070.1.reg133* όπου φαίνονται όλα τα αναγνωστικά πλαίσια(ροζ βέλη→αναγνωστικό πλαίσιο +1, γαλάζια→-1, κόκκινα→+2, μπλε→ -2,πράσινα→ +3, μωβ→-3). Εικόνα τροποποιημένη από το πρόγραμμα *Omiga*.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση της αλληλουχίας στο πρόγραμμα Blast χρησιμοποιώντας αρχικά μόνο τη περιοχή που ενισχύει το ζεύγος των εκκινητών και σταδιακά τις γειτονικές αλληλουχίες, προκειμένου να ελεγχθεί η ομολογία όλων των πιθανών ORFs. Στον πίνακα 2 παρουσιάζονται οι ομολογίες που εντοπίστηκαν.

Αποτελέσματα Blast

Subject Query	Blastn hit	Blastp hit	Blastx hit	Tblastx hit	Tblastn hit
298 bp	Bactrocera oleae importin-4 E-value:3e-22	Bactrocera oleae importin-4 E-value:2e-07	Bactrocera oleae importin-4 E-value:3e-22	Bactrocera oleae importin-4 E-value:3e-22	Bactrocera oleae importin-4 E-value:2e-06
57-210 bp	No significant hit E-value>10 ⁻⁵	Bactrocera oleae importin-4 E-value:4e-05	No significant hit	No significant hit E-value>10 ⁻⁵	Bactrocera oleae importin-4 E-value:7e-04

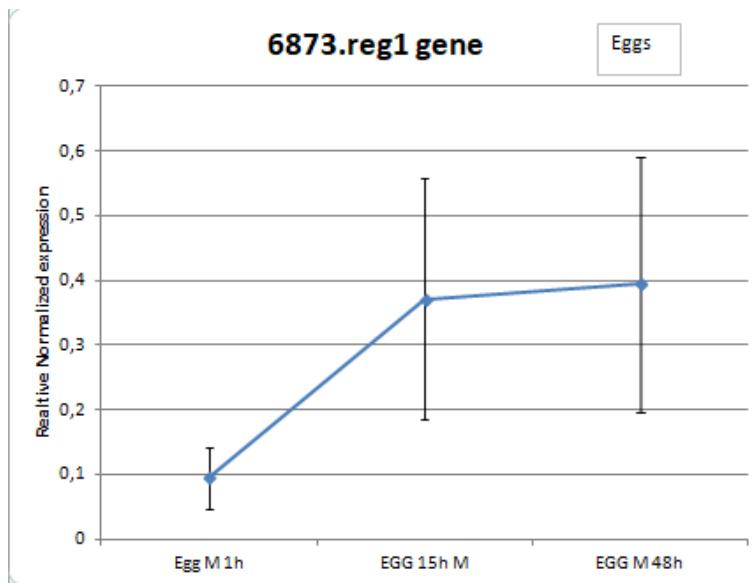
Πίνακας 2. Ενδεικτικά αποτελέσματα Blast με διαφορετικές αλληλουχίες επερώτησης.

4.3.3. Το γονίδιο 6873.reg1

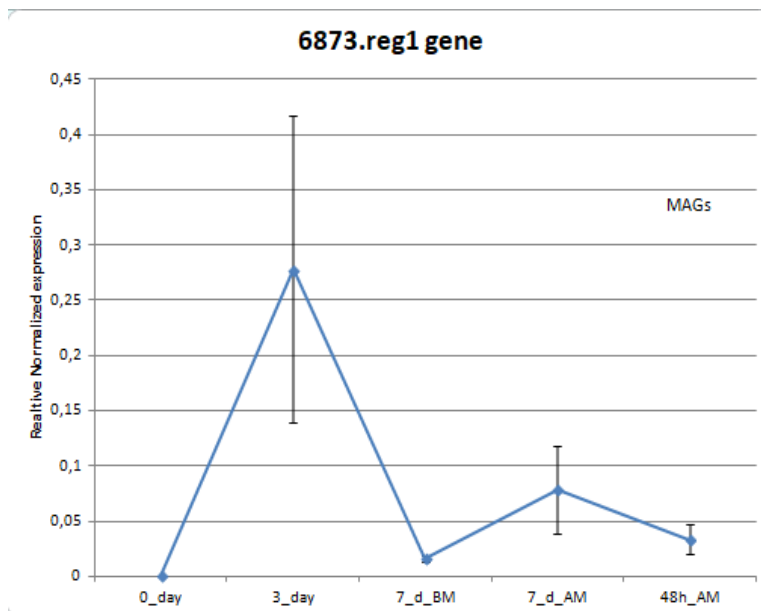
4.3.3.1. Προφίλ έκφρασης γονιδίου **6873.reg1**

Το γονίδιο 6873.reg1 έχει μία πολύ μικρή έκφραση στα αυγά αρσενικού φύλου (διάγραμμα 3). Δεν εκφράζεται καθόλου (μηδενική έκφραση) στα αναπτυξιακά στάδια της προνύμφης και της νύμφης.

Παρουσιάζει μόνο μία μικρή έκφραση στους βοηθητικούς αδένες, ενώ η έκφρασή του στους όρχεις είναι μηδενική (διάγραμμα 4).



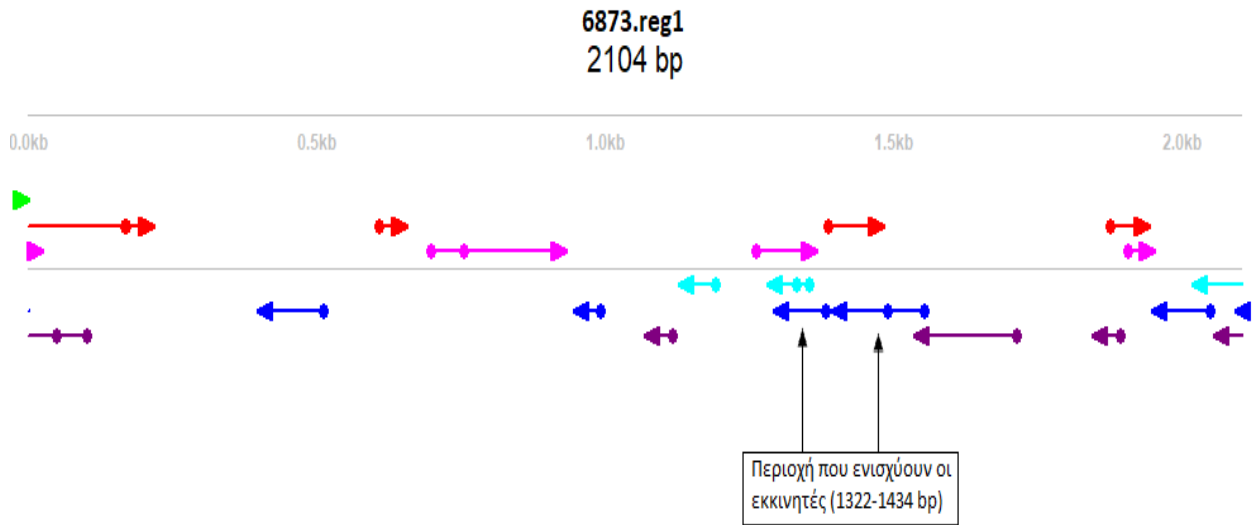
Διάγραμμα 3. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου 6873.reg1 στα αρσενικά αυγά. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει την σχετική κανονικοποιημένη έκφραση, ενώ ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τα χρονικά στάδια που ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα. Η κανονικοποίηση των δειγμάτων αυγών έγινε με το γονίδιο αναφοράς *Rpl19* (Sagri *et al.*, 2017)



Διάγραμμα 4. Προφίλ έκφρασης του γονιδίου 6873.reg1 στους βοηθητικούς αδένες. Ο κάθετος άξονας αντιπροσωπεύει την σχετική κανονικοποιημένη έκφραση, ενώ ο οριζόντιος άξονας παρουσιάζει τα χρονικά στάδια που ελέγχθηκε η έκφραση του γονιδίου. Οι μπάρες αντιπροσωπεύουν το τυπικό σφάλμα. Η κανονικοποίηση έγινε με το γονίδιο αναφοράς *Rpl19* (Sagri *et al.*, 2017). BM: πριν την σύζευξη, AM: μετά την σύζευξη.

4.3.3.2. Βιοπληροφορική ανάλυση

Με τη βοήθεια του προγράμματος Omiga αναγνωρίστηκαν όλα τα ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια της περιοχής (scaffold) μέσα στην οποία συμπεριλαμβάνεται η περιοχή που ενισχύουν οι εκκινητές 6873.reg1 (εικόνα 14).



Εικόνα 14: Χάρτης του scaffold NW_013585880.1 όπου φαίνονται όλα τα αναγνωστικά πλαίσια (ροζ βέλη → αναγνωστικό πλαίσιο +1, γαλάζια → -1, κόκκινα → +2, μπλε → -2, πράσινα → +3, μωβ → -3). Εικόνα τροποποιημένη από το πρόγραμμα Omiga.

Έπειτα πραγματοποιήθηκε ομοπαράθεση της αλληλουχίας στο πρόγραμμα Blast χρησιμοποιώντας αρχικά μόνο τη περιοχή που ενισχύει το ζεύγος των εκκινητών και σταδιακά τις γειτονικές αλληλουχίες, προκειμένου να ελεγχθεί η ομολογία όλων των πιθανών ORFs. Στον πίνακα 3 παρουσιάζονται οι ομολογίες που εντοπίστηκαν.

Subject Query	Blastn hit	Blastp hit	Blastx hit	Tblastx hit	Tblastn hit
1322-1434 bp	PREDICTED: Ceratitis capitata ATP-dependent DNA helicase pif1-like (LOC105665113), mRNA E-value:1e-08	No significant hit E-value>10 ⁻⁵	No significant hit E-value>10 ⁻⁵	PREDICTED: Ceratitis capitata ATP-dependent DNA helicase pif1-like (LOC105665113), mRNA E-value:3e-05	No significant hit
2104 bp	PREDICTED: Ceratitis capitata ATP-dependent DNA helicase pif1-like (LOC105665113), mRNA E-value:3e-13	-	PREDICTED: ATP-dependent DNA helicase PIF1-like [Rhagoletis zephyria] E-value:2e-05	PREDICTED: Ceratitis capitata ATP-dependent DNA helicase pif1-like (LOC105665113), mRNA E-value:4e-11	-

Πίνακας 3. Ενδεικτικά αποτελέσματα Blast με διαφορετικές αλληλουχίες επερώτησης.

*Για την περιοχή των 2104 bp, επιλέχθηκαν τα blast hits που η περιοχή ομολογίας τους συνέπιπτε με την περιοχή από 1300-1500 bp περίπου.

4.4. Τα γονίδια **2952** και **3738**

Το γονίδιο 2952 είχε επιλεγεί προκειμένου να μελετηθεί το προφίλ της έκφρασής του, διότι είναι Υ-συνδεδεμένο. Ωστόσο, δεν παρουσίασε έκφραση σε κανένα αναπτυξιακό στάδιο, ούτε και στα ενήλικα αναπαραγωγικά όργανα(σε καμία κατηγορία/ σε κανένα biological).

Το γονίδιο 3738, παρόλο που ελέγχθηκε σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια και σε όλους τους ενήλικους ιστούς, είχε μηδενική έκφραση.

5. Συζήτηση

Το Y χρωμόσωμα στον δάκο της ελιάς είναι υψηλά ετεροχρωματινικό και περιέχει πολλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και μεταθετά στοιχεία. Περιέχει ακόμη έναν παράγοντα αρρενοποίησης, η φύση του οποίου παραμένει άγνωστη. Ακόμη, η εξέλιξη του Y χρωμοσώματος στα Terphritidae ακολούθησε διαφορετική πορεία από ότι αυτή στα Drosophilidae. Οι δομικοί λίθοι που συνθέτουν τα χρωμοσώματα είναι οι ίδιοι στις δυο οικογένειες, ωστόσο τα γονίδια που εντοπίζονται σε κάθε χρωμόσωμα δεν εμφανίζουν συνταινικότητα. Το Y χρωμόσωμα της *Drosophila* είναι γνωστό πως περιέχει περίπου 16 γονίδια, τα περισσότερα από τα οποία παίζουν ρόλο στην γονιμότητα του αρσενικού εντόμου.

Καθώς ο δάκος της ελιάς αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα παράσιτα της ελιάς σε όλες σχεδόν τις ηπείρους, είναι επιτακτική η ανάγκη αντιμετώπισής του. Επειδή οι συμβατικές μέθοδοι αντιμετώπισης του εντόμου (παγίδες με φερομόνες, εντομοκτόνα κτλ.) είναι ανεπαρκείς, τις τελευταίες δεκαετίες γίνεται μία μεγάλη προσπάθεια κατανόησης πτυχών της βιολογίας του εντόμου που θα μπορούσαν να βοηθήσουν προς αυτή την κατεύθυνση. Η καλή γνώση της βιολογίας του εντόμου, και ιδιαιτέρως, η γνώση των μηχανισμών φυλοκαθορισμού και των γονιδίων που συμμετέχουν στην γονιμότητα των εντόμων, μπορούν να συνεισφέρουν αποφασιστικά στην ανάπτυξη μοριακών τεχνικών για την εφαρμογή παραλλαγών της μεθόδου SIT. Για παράδειγμα, ο χαρακτηρισμός του μοριακού διακόπτη του φυλοκαθορισμού ανοδικά του *tra* θα επιτρέψει τον αποτελεσματικότερο φυλοδιαχωρισμό των εντόμων σε πρώιμα στάδια καθώς και την εκτροφή μόνο αρσενικών εντόμων ή την μετατροπή θηλυκών εντόμων σε στείρα αρσενικά. Ακόμη, εάν βρεθεί κάποια σημαντικό Y-ειδικό γονίδιο που επηρεάζει τη γονιμότητα των αρσενικών εντόμων, αυτό θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για τη δημιουργία διαγονιδιακών σειρών με μειωμένη αρμοστικότητα.

Εφόσον η αλληλούχηση του Y χρωμοσώματος σε πλήρη κλίμακα είναι αδύνατη με τις υπάρχουσες τεχνικές, έχουν επιστρατευθεί μία σειρά από ευρηματικές μεθόδους που εμμέσως επιδιώκουν να ανακαλύψουν τα γονίδια που πιθανώς εδράζονται στο Y χρωμόσωμα. Εφόσον το Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής έχει εμπλακεί σε αυτήν την μεγάλη προσπάθεια, υπάρχουν δεδομένα για *scaffolds* και *contigs* που αντιστοιχούν σε αλληλουχίες αποκλειστικά του Y χρωμοσώματος. Το επόμενο βήμα ήταν λοιπόν να μελετηθούν αυτά τα συναρμολογήματα προκειμένου να διαπιστωθεί αν υπάρχει κάποιο τμήμα με μεταγραφική δραστηριότητα.

Με τη βοήθεια ειδικά σχεδιασμένων αρρενοειδικών ζευγών εκκινητών μελετήθηκαν τα προφίλ έκφρασης τριών Y-ειδικών γονιδίων με qRT-PCR τα οποία εμφανίζουν έκφραση κυρίως στα ενήλικα όργανα, κάτι που τα καθιστά ενδιαφέροντα για περαιτέρω μελέτη.

Το πρώτο από τα γονίδια αυτά, το γονίδιο *4074*, παρουσιάζει μικρή έκφραση στους όρχεις την 3^η και 7^η ημέρα πριν την σύζευξη και ταυτόχρονα πολύ μεγάλη έκφραση στους βοηθητικούς αδένες την 7^η ημέρα αμέσως μετά την σύζευξη. Συνεπώς, υπάρχει η πιθανότητα να διαδραματίζει κάποιο ρόλο στην αναπαραγωγή ή την αρμοστικότητα των αρσενικών εντόμων. Τα αποτελέσματα της βιοπληροφορικής ανάλυσης υποδεικνύουν ομολογία του γονιδίου αυτού με το γονίδιο DSCAM (Down syndrome cell adhesion molecule isoform 1/2). Το γονίδιο αυτό απομονώθηκε για πρώτη φορά από τη χρωμοσωμική περιοχή 21q22.2–22.3

του ανθρώπινου γονιδιώματος, η οποία είναι μία περιοχή με καθοριστική σημασία για πολλούς νευρολογικούς φαινότυπους του συνδρόμου Down. Η *Drosophila* έχει 4 παράλογα γονίδια DSCAM, εκ των οποίων είναι γνωστό για το γονίδιο DSCAM1 πως έχει λειτουργίες που εμπλέκονται τόσο στο νευρικό, όσο και στο ανοσοποιητικό σύστημα (Cheng et al., 2015). Η πρωτεΐνη Dscam1 είναι μία διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη τύπου I, που αποτελείται από δέκα επικράτειες ανοσοσφαιρίνης, 6 επαναλήψεις μοτίβων φμπρονεκτίνης τύπου III, μία διαμεμβρανική και μία ενδοκυτταρική επικράτεια. Η Dscam1 μπορεί να παραγάγει πάνω από 38000 ισομορφές μέσω εναλλακτικού ματίσματος και μπορεί να ασκήσει τη ρυθμιστική της δράση μέσω της δημιουργίας ομοδιμερών μεταξύ των διαφόρων μεταβλητών επικρατειών ανοσοσφαιρίνης που διαθέτει. Οι επικράτειες της προβλεπόμενης πρωτεΐνης Dscam2 για τον δάκο της ελιάς σύμφωνα με την Interpro, υπάρχουν στο *Παράρτημα (Εικόνα 15)*. Ακόμη, είναι γνωστό πως το γονίδιο αποτελείται από μικρά εξόνια, τα οποία διακόπτονται από τεράστια ιντρόνια, και είναι πιθανό η αλληλουχία που ενισχύθηκε από το ζεύγος των εκκινητών να περιέχει κάποιο εξόνιο και γύρω από την αλληλουχία που ενισχύουν οι εκκινητές να βρίσκονται μεγάλα ιντρόνια.

Με βάση το προφίλ έκφρασης και με δεδομένο πως το γονίδιο 4074 δεν εκφράζεται καθόλου σε κανένα αναπτυξιακό στάδιο, παρά μόνο στα ενήλικα αναπαραγωγικά όργανα κοντά στην ημέρα της σύζευξης, συνάγεται το συμπέρασμα πως πρόκειται πιθανώς για κάποια ισομορφή του γονιδίου που συμμετέχει στην εγγενή άμυνα των αρσενικών εντόμων έναντι παθογόνων από τα οποία μπορεί να μολυνθούν κατά τη διάρκεια της σύζευξης. Στη *D. melanogaster* έχουν ανιχνευθεί εκκρινόμενες ισομορφές της πρωτεΐνης DSCAM στην αιμολέμφο, ενώ η απώλεια του *Dscam* από τα κύτταρα της αιμολέμφου προκαλεί μείωση της αποτελεσματικότητας της φαγοκύττασης βακτηρίων, πιθανώς λόγω μειωμένης πρόσδεσης με τα βακτήρια (Watson et al., 2005).

Το δεύτερο γονίδιο (AB12), με βάση την βιοπληροφορική ανάλυση και με πολύ καλό E-value ταυτοποιείται ως ιμπορτίνη-4. Η έκφραση του γονιδίου στους όρχεις αρχίζει να αυξάνεται από την ημέρα μηδέν της ζωής του ενήλικου και σταδιακά φτάνει στην μέγιστη έκφραση 2 ημέρες μετά την σύζευξη. Όσον αφορά την έκφραση του γονιδίου στους βοηθητικούς αδένες, είναι μέγιστη την 7^η ημέρα ζωής του ενήλικου αρσενικού εντόμου ακριβώς πριν την σύζευξη και μετά το επίπεδο της έκφρασης φθίνει.

Όσον αφορά το γονίδιο της ιμπορτίνης, είναι γνωστό πως στο Y χρωμόσωμα υπάρχουν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες ενός τμήματος του γονιδίου importin-4-like, οι οποίες μάλλον είναι συνέπεια της εξάπλωσης μεγάλων τμημάτων από τα αυτοσώματα σε όλο το γονιδίωμα, και κυρίως σε περιοχές ετεροχρωματίνης (Gabrieli et al., 2011). Οι επαναλήψεις αυτές των τμημάτων του γονιδίου importin-4 αποτελούν τις μόνες ομόλογες περιοχές μεταξύ του Y και του X χρωμοσώματος στον δάκο της ελιάς, ενώ δεν υπάρχουν στην *Drosophila*. Ωστόσο, από τα αποτελέσματα της ηλεκτροφόρησης στην Ενότητα 3.7 φαίνεται πως το γονίδιο πάνω στο συγκεκριμένο *scaffold* είναι αρρενοειδικό, άρα μάλλον πρόκειται για κάποιο λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου της ιμπορτίνης το οποίο βρίσκεται μόνο στο Y χρωμόσωμα και διαφέρει πιθανώς από τις άλλες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες του γονιδίου που εντοπίζονται σε διάφορα σημεία του γονιδιώματος.

Το γονίδιο αυτό μπορεί ενδεχομένως να διαδραματίζει κάποιον ρόλο στην γονιμότητα του αρσενικού εντόμου, πιθανώς μέσω της συμμετοχής στην μεταφορά κάποιου σημαντικού

μορίου. Μια πιθανή θεωρία προτείνει πως η ύπαρξη διπλασιασμένων αλληλουχιών του γονιδίου *importin-4* στο Υ χρωμόσωμα εξυπηρετεί ως γονιδιακό απόθεμα για την διατήρηση της ακεραιότητας τους (Gabrieli *et al.*, 2011). Καθώς το Υ είναι ένα χρωμόσωμα που δεν ανασυνδυάζεται, προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα των επαναλαμβανόμενων αυτών αλληλουχιών θα πρέπει να μεταβιβάζονται από κάποιον γενετικό τόπο σε κάποιον άλλο ομόλογο γενετικό τόπο (όχι όμως με τον μηχανισμό της μετάθεσης). Ο μηχανισμός αυτός βέβαια προϋποθέτει πως οι αλληλουχίες αυτές είναι απαραίτητες για το Υ χρωμόσωμα, έχουν δηλαδή κάποια δομική ή μοριακή λειτουργία.

Γενικά, τα γονίδια της οικογένειας *importin* κωδικοποιούν πυρηνικούς υποδοχείς, οι οποίοι αναγνωρίζουν το σήμα NLS της μεταφερόμενης πρωτεΐνης ως ετεροδιμερή α/β (Nakielny & Dreyfuss, 1999). Είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός πως το γονίδιο *tra* του δάκου της ελιάς έχει ένα μοτίβο SR (arginine-serine rich) ως σήμα πυρηνικής τοποθέτησης. Ακόμη, έχει δειχθεί πως ένα μέλος της οικογένειας *importin-4* ευθύνεται για την μεταφορά του παράγοντα SRY στον πυρήνα των ανθρώπινων κυττάρων (Gontan *et al.*, 2009). Είναι βέβαια πιθανό το γονίδιο *importin-4* μετά την μετάθεση στο Υ χρωμόσωμα να έχει χάσει την αρχική του λειτουργία και να έχει αποκτήσει μία νέα, πιθανώς ρυθμιστική λειτουργία (Gabrieli *et al.*, 2011).

Το τελευταίο γονίδιο, το 6873.reg1 ταυτοποιείται ως μία πιθανή Pif-1 ελικάση. Το γονίδιο παρουσιάζει μικρή έκφραση στα αρσενικά αυγά 1, 15 και 48 ωρών. Ακόμη, παρουσιάζει μικρή έκφραση και στους βοηθητικούς αδένες την 3^η ημέρα πριν την σύζευξη καθώς και την 7^η ημέρα μετά την σύζευξη, με μία αισθητή μείωση ακριβώς πριν την σύζευξη. Με βάση τα όσα είναι γνωστά στην *Drosophila*, η ελικάση Pif-1 έχει μία επικράτεια πρόσδεσης του ATP και μία επικράτεια πρόσδεσης του DNA. Συμμετέχει στην αντιγραφή, στο ξετύλιγμα, στην επιδιόρθωση καθώς και τον ανασυνδυασμό του DNA. Τα στοιχεία αυτά θα μπορούσαν να υποστηρίξουν έναν πιθανό ρόλο στην γονιμότητα του αρσενικού εντόμου. Ακόμη, η χαμηλή έκφραση στα αυγά σε τόσο πρώιμο στάδιο θα μπορούσε να σκιαγραφήσει έναν πιθανό ρόλο στον φυλοκαθορισμό.

Πιο συγκεκριμένα, η πρωτεΐνη hPif1 στον πυρήνα των ανθρώπινων κυττάρων πιθανώς εμπλέκεται στην διατήρηση της δομής των χρωμοσωμάτων, και ειδικά κατά την φάση S της αντιγραφής (Futami *et al.*, 2007). Οι Pif1 ελικάσες γενικά επηρεάζουν την αντιγραφή του DNA των τελομερών, καθώς και του ριβοσωμικού και μιτοχονδριακού DNA. Συμμετέχουν ακόμη στην ωρίμανση των τμημάτων Okazaki και σε κάποιες τουλάχιστον περιπτώσεις χρησιμοποιούν την ενεργότητα ελικάσης για να αποσταθεροποιήσουν σταθερά νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα. Ακόμη, στον σακχαρομύκητα έχει διαπιστωθεί ως η Pif1 είναι ικανή να δεσμεύει και να διασπά τετράκλωνες διαμορφώσεις DNA με μεγαλύτερη συγγένεια απ' ό,τι το B-DNA και μπορεί να τις αποδιατάξει (Ribeyre *et al.*, 2009). Οι τετράκλωνες διαμορφώσεις σχετίζονται με την δημιουργία των τελομερών καθώς και με τον ανασυνδυασμό ή την μεταγραφή περιοχών του γονιδιώματος. Απουσία της Pif1 προκαλείται γενετική αστάθεια σε αλληλόμορφα των πλούσιων GC επαναλήψεων των ανθρώπινων μινιδορυφορικών αλληλουχιών που είχαν εντεθεί στο γονιδίωμα του σακχαρομύκητα και σχηματίζονταν δευτεροταγείς δομές (τετράκλωνες διαμορφώσεις) (Ribeyre *et al.*, 2009).

Επομένως, εάν το γονίδιο 6873.reg1 κωδικοποιεί όντως μία Pif1 ελικάση, αυτή θα μπορούσε να συμμετέχει στον φυλοκαθορισμό μέσω ιδιότητάς της να χαλαρώνει τη δομή της ετεροχρωματίνης από την οποία αποτελείται κυρίως το Υ χρωμόσωμα. Μια πιο χαλαρή διαμόρφωση θα επέτρεπε την μεταγραφική ενεργοποίηση Υ-ειδικών γονιδίων (υπάρχουν ελάχιστα στο Υ χρωμόσωμα του δάκου), και πιθανώς την έκφραση του παράγοντα αρρενοποίησης. Η μηδενική έκφραση στα θηλυκά αυγά συνηγορεί προς αυτήν την κατεύθυνση. Ακόμη θα μπορούσε να προσδένεται σε δευτεροταγείς διαμορφώσεις του Υ χρωμοσώματος του δάκου (εάν υπάρχουν στον δάκο οι αντίστοιχες lampbrush-like δομές που παρατηρούνται στις *Drosophila melanogaster* και *Drosophila hydei*) και να επιτρέπει τον ανασυνδυασμό γενετικών τόπων ή την αλλαγή της στερεοδιαμόρφωσης. Με την ίδια λογική θα μπορούσε να επηρεάζει και την έκφραση γονιδίων που επηρεάζουν την γονιμότητα του αρσενικού εντόμου, υπό την προϋπόθεση πως υπάρχουν τέτοια γονίδια στο Υ χρωμόσωμα.

Όσον αφορά τα *scaffolds* 3738 και 2952, πιθανώς θα χρειαστεί να σχεδιαστούν νέοι εκκινητές με πιο αυστηρά κριτήρια.

Μελλοντικές κατευθύνσεις

Μελλοντικά, θα μπορούσε να γίνει παροδική σίγηση των γονιδίων αυτών και ειδικά στην περίπτωση του 4074 λίγο πριν την 7^η ημέρα, ώστε να διαπιστωθεί εάν η σίγηση του γονιδίου θα εμποδίσει με κάποιον τρόπο ή θα μειώσει την αναπαραγωγική ικανότητα των αρσενικών. Η παρατήρηση του φαινότυπου που θα προέκυπτε θα μπορούσε να υποδείξει τη λειτουργική σημασία του γονιδίου. Πρακτικά, αν γεννιόταν λιγότερα αυγά ή και καθόλου από τα θηλυκά με τα οποία θα είχαν συζευχθεί τα αρσενικά στα οποία θα γινόταν η σίγηση, αυτό θα αποτελούσε μία θετική ένδειξη.

Σε επόμενο βήμα, θα μπορούσε να δημιουργηθούν και διαγονιδιακά έντομα προκειμένου να αποσαφηνιστεί ο ρόλος των γονιδίων. Το ότι τα γονίδια είναι Υ-συνδεδεμένα δημιουργεί μία επιπρόσθετη δυσκολία, επομένως θα έπρεπε να επιστρατευθούν πρωτότυπες μέθοδοι για την δημιουργία knock-out εντόμων.

Όσον αφορά το γονίδιο 6873.reg1 πιθανώς θα μπορούσε να διερευνηθεί κάποιος πιθανός ρόλος του στον φυλοκαθορισμό, μέσω της σίγησης του (παροδικής ή και μόνιμης) και της παρατήρησης του φαινότυπου των εντόμων. Σε περίπτωση που παρατηρούνταν μια αυξημένη αναλογία θηλυκών προς αρσενικά, αυτό θα αποτελούσε μια καλή ένδειξη πως πρόκειται για γονίδιο που με κάποιο ή αλληλεπιδρά με τον παράγοντα αρρενοποίησης. Αντίστοιχα, αν παρατηρούνταν μειωμένη ωοτοκία των θηλυκών έπειτα από συζεύξεις με αρσενικά, θα συναγόταν το συμπέρασμα πως πρόκειται για γονίδιο που με κάποιον τρόπο επηρεάζει την γονιμότητα.

6. Παράρτημα

6.1. Οι αλληλουχίες των scaffolds και οι αλληλουχίες που ενισχύθηκαν σε μορφή fasta

>NW_013585880.1

```
CATAAGTTGCAAGTCGAAAGATTTGCCTGAATTACCGTTGCAACAGCCGCGATCATCTTTTGA  
TACTTCAAAAATTCGGCAACATATTTACCAACATCATAATGTCCCATTTACTCGGTGTGTGCTG  
CCTAAATCCCGTTTGAATTCCTTTTGGAACGAAATGATGGATATCAAGGCATGGTACCGCTGG  
TATGGTGATTACTCACACAAAAAAAAGTTATAACGGCTTGTAATAAAAAATAAACTGTTTA  
TTTACTGTTTTTTGTAGTTAAAAATATTTATTATATTTATTTATTTTAAAAATTTAAATTTTTAA  
CGAACTGTAACATAAAAAAGATTTGACACATTACTTATCTTATAGCAAGAAACGATGACCTAAA  
AATTGCTTTTACTTACCTTTGAAACTCTGTTAGGTATAAATTCAGGGTACGGCTTTTCACACCA  
CCGTAGATTAATTGGCTAACCGCATCAACTAAAATATTTAGTAGACCTACAAGTTTCGGTGCT  
GGTGTTCATAATCTAAAAACAGAAAGGAATTTTAGCAATCAAGCAAAAACCTATATTAATA  
CCAAAGTGATTCAACAAAAGTGAAGTAAGTATGTACCCTTACATTTATCCAAAAATTCACATT  
TTTTATTTCAAAAAGTCAAAAACGAATAACAATCTTTCTTGTAATAAATAAAAAGAAAATGCCGA  
ATACTTACTCCTTGTGCAAAAACAACCTGAAGGAGCAACTTACCAATGTTTTATGCTCCAATTTTC  
AAATCGTACTGAATTGGAAAAAGATGTGGCGGGCAACTCAGTTTGTTCATCGATAATATGTGA  
CTTACATTTTAAGGCGGAGGAAATAAAAGAATCTACCCCTAAAAGAAGACGACTAAGCCCCG  
ATGCAGTACCTTCATTAATAACTTCCCACTCCTAAAGAAAATATGTAAGACACGTCATCTT  
ATGATAAATAGAAATTTTATGTTTTTATCATTGACGTAAGTCAAGTACATATGTACTTATTTCA  
CTTTGTTGAATAGAGCAAACGT
```

```
TGTTTTGCCCTTGACGTCGTATTTAGGAACTATTTTAAAAAATAACTAACACTGAAAAAGGAA  
TTAAAATGAAATAAACATACATACATTAATAACAATTATTATTACATATATTAATAAAC  
AATTATTGATAGCTACCTTGAATCGAAAATTGTTTCATATTTCTACTACTAATTAATTTCAATTTA  
AAATAAACAGATATTAATCACTCATCGCGATGGAGTATGTAATATTTTTAGTCAGTACGTGTT  
TAGCGTATACCTACAAACGAACTGGAAGGTTTGCCCCGCGACAGCAATACATTTTCGACTCGGA  
ACTTGCCATTCAAATGGTAGTTCGATAATGTTTATCATTTATTTTAAAATTAATAATCTTGTGC  
AATTGCAAAGCCGAGGTGGCTTCAAATTAGTAAGCACAAATATCCGGAGATCTCCCTTTTAGTT  
GTAATAAATGCGATATCATGGCCAGCAAATCCAATAAAAAATCAATTGGATAATTCACAGAT  
CCTTGGAAATAGCAACAACATCGATAGATTGGTTTGGAAATCAAATACGCTGGCAACAACCTTCGA  
ATTTAATCCGTAGACGTCCACATTTTTTTCTGTCAAATAAATATTCTGCCAGCCAATCACATT  
GTTTGCGTGTACATCGTGAAGTATATTGTCGGTGATAGTATTTTGTGAGATCATGATTGTGCCA  
AAGTCGTAATGATTTTAAAGCAAGATGGGACTTCGTCAGCGTACGTTGAACGTGGAATAACGA  
GAAGTGTGTGTTCAAATTACCCACAAATATCCCTTACAATACTTCAAGCTAATGTTTGTGTGCC  
TTCAACCTAAATGAAAACGTTGCATCTTTCAGTATTGTGGCCATGGATGCATGTGTTTTATAC  
CCCGAGCAGGGTATATTAGTTTGTAGGAAGTTAGAGCATATAGCTGCCGTATAAACCGAACA  
ATCGGAATCAAGTTGCACACTTCATCTGGATTATTTTGAATTTTAAATGGTGCCCTTTTGTATC  
GTGTCATAGCGACCAATACGATACCATCTTTGATCGTATCTCAGCAATAGTAGTGA
```

>6873.reg1

```
CCCCGACAGCAATACATTTTCGACTCGGAACTTGCCATTCAAATGGTAGTTCGATAATGTTT  
ATCATTTATTTTAAAATTAATAATCTTGTGCAATTGCAAAGCCGAGGTGG
```

> NW_013586559.1.reg6

CATGTAAAATAGCGCGGTACTTTTCGAATAGAGCAGTATTTGTGCAAAGGCACCAAAAGCATC
CACACAATTACAAAATTCAAATATTCAGCACTGTTTCGTTTCGTGAAAAATACGCGTTGACC
GTTTTCGAGATGCATAGCTAAATAACTCAACATTAATATGAGCATTGAATGTTATACTCAGCT
TAAACTATCAATGTCTTCAGCACGTATTTTGTCCATGGGCAAATCAAATGTGAGTTTATTAA
AGACTTAAATTAACAAAAAACACGTGCTGTAATGTCAAAATGACGTATTGCATTTTGTGGT
AGCAATAGCAATGACGTAATTTTAGTGAATTGAACTACCTACGTACGATGAAGGTAGAATGA
CAGAGTTACCAATTTGGGCAGTATCAGTGTGTTTCGCAATGGTATCTCGCAGGGGAATATATT
CTTCTGCACGTTATGTCGCAAGTATCGTAGTCGTTCACTCTCTGTCTTCCATAAATGTCCATCA
TAAATTATTGACAAAGCTCATGACATCGTAAAATGATACGCTTAATAATCTGTAATAATAAAT
TTTCTAATTAATTTGACAGTTTCTTCTTAAATAAATAACTTAATTATGGCCCTAATAATGAATGAA
TTACCCGTTACCTGATTTGGTTGTTAATGTTTATGCAATAACCGGTGTGTCCCTTCCAGAAAA
TTAGCGGATATTGAAGATCGTCATATGAACGGTGGGTATCAGTAATAAAGTTAAGACTATCAT
CTCTTTTTTCGAATCACGATTTGTCTCCAATCACGACTTCAGCAACGTTATCAGCAACAGGGGTG
TTGAACATACGTATATGCTCTTCAGCTGGTGTGATTAGGATTGATTACAATAGCTCGGTTGT
CATTTT

>4074

ACGTATTGCATTTTGTGGTAGCAATAGCAATGACGTAATTTTAGTGAATTGAACTACCTACGT
ACGATGAAGGTAGAATGACAGAGTTACCAATTTGGGCAGTATCAGTGTGTTTCGCAATGGTAT
CTCGCAGG

>NW_013591070.1.reg133

AACATGGCCGCTATAGCCGAAGGATGCTCGGAGGCTACTTGCAACAAATATCTCGAAACCAT
GCGACGGAACATCTTTCAGTGCGAGCACCCACCTTCTCTAAATTCACTTCGTTTCTTCTAGCAA
GATGATATCGATAATGGTAACTCGGATGTGCAGGATAGTGATTTGGACAACATTGCAGAATAC
AGTGTTAAAAATTCATATTTAGATGAAAAGATGGAGTCCCGTTCATCCCTTACTTTGAGAAAT
ATTATCGTAAAGTGTCAATTGACATATTGAGCTCGTTTATTGAGGC

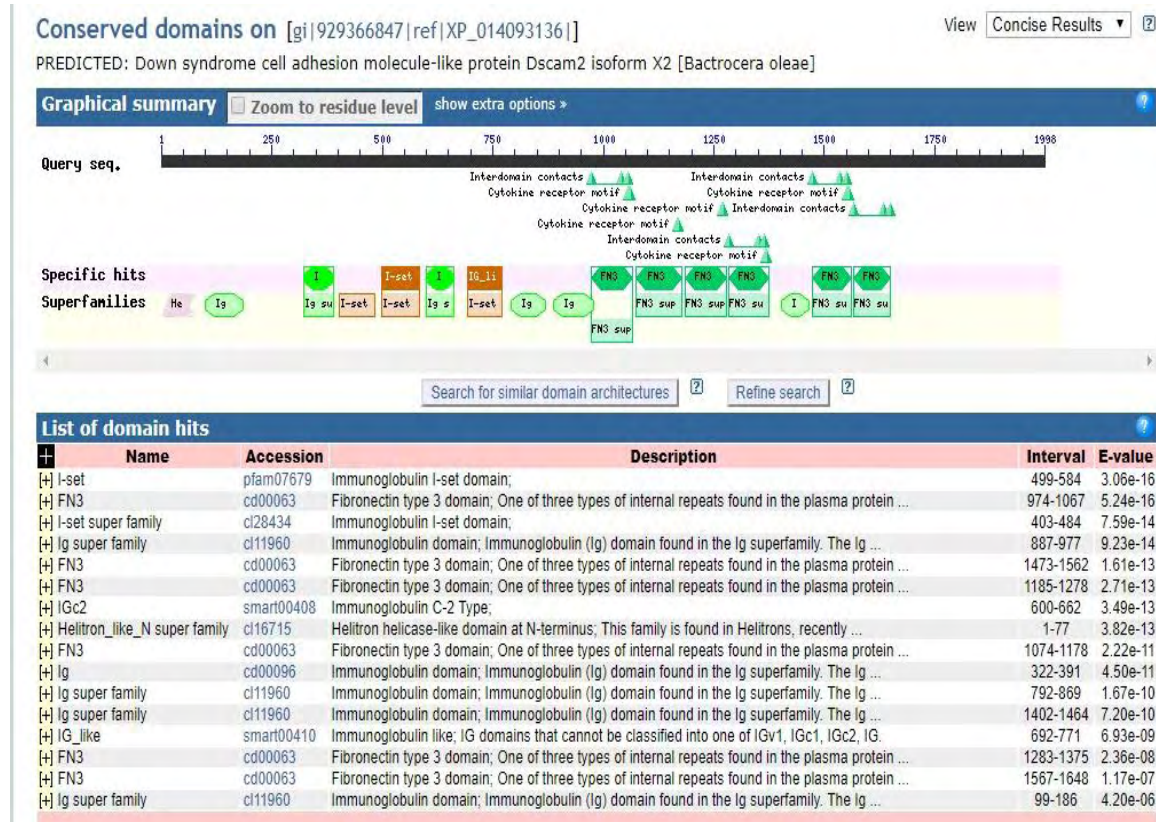
>AB12

AACATGGCCGCTATAGCCGAAGGATGCTCGGAGGCTACTTGCAACAAATATCTCGAAACCAT
GCGACGGAACATCTTTCAGTGCGAGCACCCACCTTCTCTAAATTCACTTCGTTTCTTCTAGCAA
GATGATATCGATAATGGTAACTCGGATGTGCAGG

6.2. Οι αλληλουχίες των εκκινητών και οι θερμοκρασίες T_{α}

<u>4074</u>	primer F	5'-ACGTATTGCATTTTGTGGTAGC-3'	$T_{\alpha}=52^{\circ}\text{C}$
	primer R	5'-CCTGCGAGATACCATTGCGA-3'	
<u>AB12</u>	primer F	5'-AACCATGCGACGGAACATCTT-3'	$T_{\alpha}=50^{\circ}\text{C}$
	primer R	5'-CCTGCACATCCGAGTTACCA-3'	
<u>6873.reg1</u>	primer F	5'-CCCGCGACAGCAATACATTT-3'	$T_{\alpha}=55^{\circ}\text{C}$
	primer R	5'-CCACCTCGGCTTTGCAATTG-3'	
<u>2952</u>	primer F	5'-AAACTCACTAGATTGCACAGT-3'	$T_{\alpha}=48^{\circ}\text{C}$
	primer R	5'-AAGTTCGTGCCAAACATAG-3'	
<u>3738</u>	primer F	5'-GTTGGCAACGAGTAGAAG-3'	$T_{\alpha}=45^{\circ}\text{C}$
	primer R	5'-TGTCATACCCTTTTCCAC-3'	

6.3. Το γονίδιο *dscam2*



Εικόνα 15: Προβλεπόμενη οργάνωση του γονιδίου *dscam2* του δάκου της ελιάς. Πηγή: Βάση Δεδομένων Interpro.

7. Βιβλιογραφικές Παραπομπές

- Adelman, Z. N., & Tu, Z. (2016). Control of mosquito-borne infectious diseases: Sex and gene drive. *Trends Parasitol.*, 32(3), 219–229. doi:10.1016/j.pt.2015.12.003.
- Aluja, M., & Norrbon, A. L. (2001). *Fruit Flies (Tephritidae): Phylogeny and Evolution Behavior*. Boca Raton, FL.: CRC Press, 963 pp.
- Arnold, A. P. (2004). Sex chromosomes and brain gender. *Nat. Rev. Neurosci.*, 5, 701–708.
- Arnold, A. P., Chen, X., Link, J., Itoh, Y. & Reue, K. (2013). Cell-autonomous sex determination outside of the gonad. *Dev. Dyn.*, 242, 371–379.

- Arnold, A. P., Chen, X., Link, J., Itoh, Y., Reue, K. (2013). Cell-autonomous sex determination outside of the gonad. *Dev. Dyn.*, 242, 371–379.
- Augustinos, A. A., Mamuris, Z., Stratikopoulos, E. E., D'Amelio, S., Zacharopoulou, A., Mathiopoulos, K. D. (2005). Microsatellite analysis of olive fruit fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*, 125, 231–41.
- Augustinos, A. A., Stratikopoulos, E. E., Zacharopoulou, A., Mathiopoulos, K. D. (2002). Polymorphic microsatellite markers in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *Mol. Ecol. Notes*, 2, 278–80.
- Augustinos, A. A., Stratikopoulos, E. E., Drosopoulou, E., Kakani, E. G., Mavragani-Tsipidou, P., Zacharopoulou, A., Mathiopoulos, K. D. (2008). Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics*, 9:618. doi:10.1186/1471-2164-9-618.
- Awadallah, A., & Nadim A. L. (1970). The chemical control of the olive fruit-fly, *Dacus oleae* Gmel. in Kom-Oshim district (Fayoum Governorate) during 1963 and 1964 seasons (Diptera: Trypanidae). *Bull. Ent. Soc. of Egypt, Economic Series 4*, 135-141.
- Bachtrog, D. (2003a). Protein evolution and codon usage bias on the neo-sex chromosomes of *Drosophila miranda*. *Genetics*, 165, 1221–32.
- Bachtrog, D. (2003b). Accumulation of spock and worf, two novel non-LTR retrotransposons on the neo-Y chromosome of *Drosophila miranda*. *Mol. Biol. Evol.*, 20, 173–81.
- Bachtrog, D. (2005). Sex chromosome evolution: molecular aspects of Y-chromosome degeneration in *Drosophila*. *Genome Res.* 15, 1393–401.
- Bachtrog, D. (2008). The temporal dynamics of processes underlying Y chromosome degeneration. *Genetics*, 179, 1513–25.
- Bachtrog, D. (2013). Y-chromosome evolution: emerging insights into processes of Y-chromosome degeneration. *Nat Rev Genet*, 14, 113–124. doi: 10.1038/nrg3366
- Bachtrog, D., & Charlesworth, B. (2002). Reduced adaptation of a nonrecombining neo-Y chromosome. *Nature* 416, 323–26.
- Bachtrog, D., & Gordo, I. (2004). Adaptive evolution of asexual populations under Muller's ratchet. *Evol. Int. J. Org. Evol.* ,58, 1403–13.
- Bachtrog, D., Hom, E., Wong, K. M., Maside, X., de Jong, P. (2008). Genomic degradation of a young Y chromosome in *Drosophila miranda*. *Genome Biol.* 9, R30.

- Bachtrog, D., Mank, J. E., Peichel, C. L., Kirkpatrick, M., Otto, S. P., et al. (2014). Sex determination: why so many ways of doing it? *PLoS Biol*, *12*: e1001899. doi: 10.1371/journal.pbio.1001899
- Bachtrog, D., Thornton, K., Clark, A., Andolfatto, P. (2006). Extensive introgression of mitochondrial DNA relative to nuclear gene flow in the *Drosophila yakuba* species group. *Evol. Int. J. Org. Evol.*, *60*, 292–302.
- Bachtrog, D., & Charlesworth, B. (2000). Reduced levels of microsatellite variability on the neo-Y chromosome of *Drosophila miranda*. *Curr. Biol.* *10*, 1025–31.
- Baker, R., Herbert, R., Howse, P. E., Jones, O. T. (1980). Identification and synthesis of the major sex pheromone of the olive fly (*Dacus oleae*). *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, *1*, 52-53.
- Bergero, R., & Charlesworth, D. (2009). The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. *Trends Ecol. Evol.*, *24*, 94–102.
- Bergstrom, D. E., Young, M., Albrecht, K. H., Eicher, E. M. (2000). Related function of mouse SOX3, SOX9, and SRY HMG domains assayed by male sex determination. *Genesis*, *28*, 111–124.
- Bishop, C. et al. (2000). A transgenic insertion upstream of Sox9 is associated with dominant XX sex reversal in the mouse. *Nat. Genet*, *26*, 490–494.
- Bonaccorsi, S., & Lohe, A. (1991). Fine Mapping of Satellite DNA Sequences Along the Y Chromosome of *Drosophila melanogaster* Relationships Between Satellite Sequences and Fertility Factors. *Genetics*, *129*, 177-189.
- Bonaccorsi, S., Pisano, C., Puoti, F., Gatti, M. (1988). Y chromosome loops in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *120*, 1015-34.
- Bridges, C. B. (1916). Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. *Genetics*, *1*, 1–52.
- Brosseau, G. E. (1960). Genetic analysis of the male fertility factors on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, *45*, 257–74.
- Broumas, T., Haniotakis, G., Liaropoulos, C., Tomazou, T., Ragoussis, N. (2002). The efficacy of an improved form of the mass-trapping method, for the control of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Dipt., Tephritidae): pilot-scale feasibility studies. *J. Appl. Entomol.* *126*, 217–23.
- Brunelli, A. (1978). New insecticides and acaricides. *Int. Fitopat.*, *28*, 22-23.
- Bruni, U., & Caira, E. (1980). A trial on the control of olive pests in the Grosseto region.

Int. Fitopat., 30, 13-17.

- Bull, J. J. (1980). Sex determination in reptiles. *Q. Rev. Biol.*, 55, 3–21.
- Bull, J. J. (1983). *Evolution of Sex Determining Mechanisms*. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings.
- Burrack, H. J. et al. (2009). Intraspecific Larval Competition in the Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae). *Environmental Entomology*, 38(5), 1400- 1410.
- Cakici, M., Ercan, H. and Kaya, M. (1973). A chemical experiment against olive fly (*Dacus oleae*) damaging olive trees in the Aegean region. *Plant Prot. Res. Ann.*, 7, 200 pp.
- Capel, B. (2017). Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature Reviews Genetics*. doi:10.1038/nrg.2017.60.
- Capel, B. (2017). Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. *Nature Reviews Genetics*. doi:10.1038/nrg.2017.60.
- Carvalho A. B., & Clark, A. G. (2005). Y Chromosome of *D. pseudoobscura* Is Not Homologous to the Ancestral *Drosophila* Y. *Science*, 307, 108-10. doi: 10.1126/science.1101675.
- Carvalho, A. B. (2002). Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12, 664–68.
- Carvalho, A. B., Dobo, B. A., Vibranovski, M. D., Clark, A. G. (2001). Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 98, 13225–30.
- Carvalho, A. B., Lazzaro, B. P., Clark, A. G. (2000). Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *Proc Natl Acad Sci*, 97, 13239-13244.
- Carvalho, A. B., Lazzaro, B. P., Clark, A. G. (2000). Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 13239–44.
- Carvalho, A. B., & Clark, A. G. (2005). Y chromosome of *D. pseudoobscura* is not homologous to the ancestral *Drosophila* Y. *Science*, 307, 108–10.
- Carvalho, A. B. et al. (2015). Birth of a new gene on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *PNAS*, 112(40), 12450-55. doi:10.1073/pnas.1516543112.
- Casilli, O., Tarantino, L., Gadaleta, G. (1976). Control experiments against the olive fly

- with poisoned protein baits. *Inf. Fitopat.*, 26, 11-14.
- Celik, M. Y., & Suzer T. (1973). Chemical tests against olive fly (*Dacus oleae*) larvae in the southern Anatolia region. *Plant Prot. Res. Ann.* 7, 200 pp
 - Chang, C - H, & Larracuente, A. M. (2017). Genomic changes following the reversal of a Y chromosome to an autosome in *Drosophila pseudoobscura* *Evolution*, 71(5), 1285–1296. doi:10.1111/evo.13229.
 - Charlesworth, B. (1978). Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 5618–22.
 - Charlesworth, B. (1994). The effect of background selection against deleterious mutations on weakly selected, linked variants. *Genet. Res.*, 63, 213–27.
 - Charlesworth, B. (1996). The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol.*, 6, 149–62.
 - Charlesworth, B., Betancourt, A. J., Kaiser, V. B., Gordo, I. (2009). Genetic recombination and molecular evolution. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* ,74, 177–86.
 - Charlesworth, B., Charlesworth, D. (2000). The degeneration of Y chromosomes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 355, 1563–72.
 - Charlesworth, B. (2000). Genome analysis: More *Drosophila* Y chromosome genes . *Current Biology*, 11(5), R182–R184.
 - Cheng, L. et al. (2015). Protein production, crystallization and preliminary crystallographic analysis of the four N-terminal immunoglobulin domains of Down syndrome cell adhesion molecule 1. *Acta Cryst.* ,71, 775–778. doi.org/10.1107/S2053230X15008201.
 - Cirio, U. (1971). Reperti sui meccanismo stimolo-risposta nell'ovideposizione del *Dacus oleae* Gmelin (Diptera, Trypetidae). *Redia*, 52, 577-600.
 - Clarke, A. R., Armstrong, K. E., Carmichael, A. E., Milne, J. R., Raghu, S., et al. (2005). Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: The *Bactrocera dorsalis* complex of fruit flies. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 293–319.
 - Cline, T. W. (1993). The *Drosophila* sex determination signal: How do flies count to two? *Trends Genet.*, 9(11), 385–90.

- Colvin, J. S., Green, R. P., Schmahl, J., Capel, B., Ornitz, D. M. (2001). Male-to-female sex reversal in mice lacking fibroblast growth factor 9. *Cell*, *104*, 875–889.
- Copeland, R. S., White, I. M., Okumu, M., Machera, P., Wharton, R. A. (2004). Insects associated with fruits of the Oleaceae (Asteridae, Lamiales) in Kenya, with special reference to the Tephritidae (Diptera). *Bishop Mus. Bull. Entomol.*, *12*, 135–64.
- Daane, K. M., & Johnson, M. W. (2010). Olive Fruit Fly: Managing an Ancient Pest in Modern Times. *Annu. Rev. Entomol.*, *55*, 151–69.
- Devlin, R. H., & Nagahama, Y. (2002). Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*, *208*, 191–364.
- Dorer, D. R., & Henikoff, S. (1994). Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. *Cell*, *77*, 993–1002.
- Drew, R. A. I. (1989). Taxonomic characters used in identifying Tephritidae, in: *World Crop Pests: Fruit Flies—Their Biology, Natural Enemies and Control*. ed. A.S. Robinson, G. Hooper, 3A:3–7, Amsterdam: Elsevier
- Drosopoulou, E., Nakou, I., Sichova, J., Kubickova, S., Marec, F., Mavragani-Tsipidou, P. (2012). Sex chromosomes and associated rDNA form a heterochromatic network in the polytene nuclei of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, *140*, 169–180. doi: 10.1007/s10709-012-9668-3.
- Drosopoulou, E., Nakou, I., Mavragani-Tsipidou, P. (2014). The *Bactrocera oleae* genome: localization of nine genes on the polytene chromosomes of the olive fruit fly (Diptera: Tephritidae). *Genome*, *57*(10), 573-6. doi: 10.1139/gen-2014-0172.
- Dyck V. A., editor; Hendrichs, J., editor; Robinson, A. S., editor. *Sterile Insect Technique: Principles and Practice in Area-Wide Integrated Pest Management*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2005a.
- Ezaz, T., Stiglec, R., Veyrunes, F., Marshall Graves, J. A. (2006). Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems. *Curr. Biol.*, *16*, 736–743. doi:10.1016/j.cub.2006.08.021.
- Fitt, G. P. (1981), The ecology of northern Australian Dacinae (Diptera: Tephritidae), in: I. Host phenology and utilization of *Opilia amentacea* Roxb. (Opiliaceae) by *Dacus* (*Bactrocera*) *opiliae* Drew and Hardy, with notes on some other species, *Aust. J. Zool.*,

29, 691-705.

- Fitt, G. P. (1986). The influence of a shortage of hosts on the specificity of oviposition behaviour in species of *Dacus* (Diptera: Tephritidae). *Physiol. Entomol.*, *11*, 133-143.
- Fletcher, B. S. (1987). The biology of Dacine fruit flies, *Ann. Rev. Entomol.*, *32*, 115-44.
- Fowler, A. J. (1977). Host-selection in wild and laboratory-culture *Dacus tryoni*. *Hons thesis*, Univ. Sydney, Australia, 137 pp.
- Futami, K. et al. (2007). Mitochondrial and nuclear localization of human Pif1 helicase. *Biol Pharm Bull.*, *9*, 1685-92.
- Gabrieli, P. et al. (2011). Interchromosomal Duplications on the *Bactrocera oleae* Y Chromosome Imply a Distinct Evolutionary Origin of the Sex Chromosomes Compared to *Drosophila*. *PLoS ONE*, *6*(3): e17747. doi:10.1371/journal.pone.0017747.
- Gabrieli, P. et al. (2011). Interchromosomal Duplications on the *Bactrocera oleae* Y Chromosome Imply a Distinct Evolutionary Origin of the Sex Chromosomes Compared to *Drosophila*. *PLoS ONE*, *6*(3): e17747. doi:10.1371/journal.pone.0017747.
- Gariboldi, P., Jommi, G., Rossi, R., Vita, G. (1982). Studies on the chemical constitution and sex pheromone activity of volatile substances emitted by *Dacus oleae*. *Experientia*, *38*, 441-44.
- Gatti, M., & Pimpinelli, S. (1983). Cytological and genetic analysis of the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. Organization of the fertility factors. *Chromosoma*, *88*, 349-73.
- Gatti, M., & Pimpinelli, S. (1992). Functional elements in *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Annu. Rev. Genet.*, *26*, 239-75.
- Gepner, J., & Hays, T. S. (1993). A fertility region on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster* encodes a dynein microtubule motor. *Proc Natl Acad Sci*, *90*, 11132-11136.
- Gilfillan, G., Straub, T., de Wit, E., Greil, F., Lamm, R., et al. (2006). Chromosome-wide gene-specific targeting of the *Drosophila* dosage compensation complex. *Genes Dev.*, *20*, 858-70.
- Girolami, V., Vianello, A., Stapazzon, A., Ragazzi, E., Veronese, G. (1981). Ovipositional deterrents in *Dacus oleae*. *Entomol. Exp. Appl.*, *29*, 177-88.
- Goldstein, L. S. B., Hardy, R. W., Lindsley, D.L. (1982). Structural genes on the
- 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.
- Gracheva, E., Dus, M., Elgin, S. C. (2009). Drosophila RISC component VIG and its homolog Vig2 impact heterochromatin formation. *PLoS One*, 4(7):e6182. doi: 10.1371/journal.pone.0006182.
 - Graves, J. A. (2013). How to evolve new vertebrate sex determining genes. *Dev. Dyn.*, 242, 354–359.
 - Graves, J. A. M. (1995). The evolution of mammalian sex chromosomes and the origin of sex determining genes. *Phil. Trans. R. Soc.*, 350, 305–312.
 - Hackstein, J. H. P., Hochstenbach, R., HauschteckJungen, E., Beukeboom, L. W. (1996). Is the Y chromosome of Drosophila an evolved supernumerary chromosome? *Bioessays*, 18, 317–23.
 - Hall, A. B. et al. (2015). A male-determining factor in the mosquito *Aedes aegypti*. , 348(6240), 1268-70. doi: 10.1126/science.aaa2850.
 - Hall, A. B. et al. (2013). Six novel Y chromosome genes in Anopheles mosquitoes discovered by independently sequencing males and females. *BMC Genomics*, 14: 273. doi:10.1186/1471-2164-14-273.
 - Han, H. Y., & Ro, K. E. (2009). Molecular phylogeny of the family Tephritidae (Insecta: Diptera): new insight from combined analysis of the mitochondrial 12S, 16S, and COII genes. *Mol. Cells*, 27, 55–66.
 - Haniotakis, G. ,& Voyadjoglou, A. (1978). Oviposition regulation in *Dacus oleae* by various olive fruit characters. *Entomol. Exp. Appl.*, 24, 387-92.
 - Haniotakis, G. E., Kozyrakis, E., Bonatsos, C. (1986). Control of the olive fruit fly, *Dacus oleae* Gmel (Dipt., Tephritidae), by mass trapping—pilot scale feasibility study. *J. Appl. Entomol.*, 101, 343–52.
 - Haniotakis, G., Francke, W., Mori, K., Redlich, R., Schurig, V. (1986). Sex specific activity of R(-)- and S - (+)- 1 , 7-dioxaspiro [5.5] undecane, the major pheromone of *Dacus oleae*. *J. Chem. Ecol.*, 12(6), 1559–1568.
 - Haniotakis, G., Kozyrakis, M., Fitsakis, T., Antonidaki, A. (1991). An Effective Mass Trapping Method for the Control of *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *J. Econ. Entomol.*, 84(2), 564-569.
 - Hashimoto, H. (1933). The role of the W chromosome for sex determination in the silkworm, *Bombyx mori*. *Jpn. J. Genet.* , 8, 245–58.

- Hawkes, N. J., Janes, R. W., Hemingway, J., Vontas, J. (2005). Detection of resistance-associated point mutations of organophosphate-insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Gmel.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *81*, 154–163.
- Hediger, M., Burghardt, G., Siegenthaler, C., Buser, N., Hilfiker-Kleiner, D., et al. (2004). Sex determination in *Drosophila melanogaster* and *Musca domestica* converges at the level of the terminal regulator doublesex. *Dev. Genes Evol.* , *214*, 29–42.
- Hediger, M., Henggeler, C., Meier, N., Perez, R., Saccone, G., Bopp, D. (2010). Molecular characterization of the key switch F provides a basis for understanding the rapid divergence of the sex-determining pathway in the housefly. *Genetics*, *184*, 155–70.
- Herpin, A. et al. (2010). Transcriptional rewiring of the sex determining *dmrt1* gene duplicate by transposable elements. *PLoS Genet.*, *6*, e1000844. doi: 10.1371/journal.pgen.1000844.
- Hill, W. G., & Robertson, A. (1966). The effect of linkage on limits to artificial selection. *Genet. Res*, *8*, 269–94.
- Holleley, C. E. et al. (2015). Sex reversal triggers the rapid transition from genetic to temperature-dependent sex. *Nature* , *523*, 79–82. doi: 10.1038/nature14574.
- Jameson, S. A. et al. (2012). Temporal transcriptional profiling of somatic and germ cells reveals biased lineage priming of sexual fate in the fetal mouse gonad. *PLoS Genet.*, *8*, e1002575. doi: 10.1371/journal.pgen.1002575.
- Janzen, F. J., & Phillips, P. C. (2006). Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles. *J. Evol. Biol.*, *19*, 1775–1784. doi: 10.1111/j.1420-9101.2006.01138.x
- Janzen, F. J., & Phillips, P. C. (2006). Exploring the evolution of environmental sex determination, especially in reptiles. *J. Evol. Biol.*, *19*, 1775–1784. doi: 10.1111/j.1420-9101.2006.01138.x.
- Johnson, T, & Barton, N. H. (2002). The effect of deleterious alleles on adaptation in asexual populations. *Genetics*, *162*, 395–411.
- Kaiser, V. B., & Bachtrog, D. (2010). Evolution of Sex Chromosomes in Insects. *Annu. Rev. Genet.*, , *44*, 91–112. doi: 10.1146/annurev-genet-102209-163600
- Kaiser, V. B., & Bachtrog, D. (2010). Evolution of Sex Chromosomes in Insects. *Annu.*

Rev. Genet., 44, 91–112. doi:10.1146/annurev-genet-102209-163600.

- Kakani, E. G., & Mathiopoulos, K. D. (2008). Organophosphate resistance-related mutations in the acetylcholinesterase gene of Tephritidae. *J. Appl. Entomol.*, 132, 762–71.
- Kakani, E. G., Ioannides, I. M., Margaritopoulos, J. T., Seraphides, N. A., Skouras, P. J., et al. (2008). A small deletion in the olive fruit fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38, 781–87.
- Katsoyannos, B. I. (1983). Cultures of *Ceratitis capitata* and *Dacus oleae* flies (Diptera:Tephritidae) by McPhail and Rebell color traps suspended on citrus, fig and olive trees on Chios, Greece, In: R. Cavalloro (Ed.): 451-456.
- Katsoyannos, B. I., & Kouloussis, N. A. (2001). Captures of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* on spheres of different colours. *Entomol. Exp. Appl.*, 100, 165–72.
- Kennison, J. A. (1981). The Genetic and Cytological Organization of the Y Chromosome of *DROSOPHILA MELANOGASTER*. *Genetics*, 98(3), 529-48.
- Kim, Y. et al. (2006). Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol.*, 4, e187. doi: 10.1371/journal.pbio.0040187.
- Koerich, L. B., Wang, X., Clark, A. G., Carvalho, A. B. (2008). Low conservation of gene content in the *Drosophila* Y chromosome. *Nature*, 456, 949–51.
- Koopman, P., Gubbay, J., Vivian, N., Goodfellow, P., Lovell-Badge, R. (1991). Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature*, 351, 117–121.
- Korneyev, V. A. (1999), Phylogenetic relationships among higher groups of Tephritidae, In: *Fruit Flies(Tephritidae): Phylogeny and Evolution of Behavior*, ed. M. Aluja, A. L. Norrbom, pp. 73–113. Boca Raton, FL : CRC Press.
- Kotelnikov, R. N. et al. (2009). Peculiarities of piRNA-mediated post-transcriptional silencing of Stellate repeats in testes of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research*, 37(10), 3254–63. doi:10.1093/nar/gkp167.
- Krafur, E. (1998). Sterile insect technique for suppressing and eradicating insect populations: 55 years and counting. *J Agric Entomol.*, 15:303–317.
- Krentz, A. D. et al. (2009). The DM domain protein DMRT1 is a dose-sensitive regulator of fetal germ cell proliferation and pluripotency. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 106, 22323–22328.
- Lagos, D., Koukidou, M., Savakis, C., Komitopoulou, K. (2007). The transformer gene in

- Bactrocera oleae* : the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Molecular Biology*, 16, 221–230. doi: 10.1111/j.1365-2583.2006.00717.x.
- Larracuenta, A. M., Noor, M. A. F., and Clark, A. G. (2010). Translocation of Y-Linked Genes to the Dot Chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. *Mol. Biol. Evol.*, 27(7), 1612–1620. doi:10.1093/molbev/msq045.
 - Larracuenta, A. M., Noor, M. A. F., Clark, A. G. (2010). Translocation of Y-Linked Genes to the Dot Chromosome in *Drosophila pseudoobscura*. *Mol. Biol. Evol.*, 27(7):1612–1620. doi:10.1093/molbev/msq045.
 - Lavery, R. et al. (2012). Testicular differentiation occurs in absence of R-spondin1 and Sox9 in mouse sex reversals. *PLoS Genet.*, 8, e1003170. doi: 10.1371/journal.pgen.1003170.
 - Levinson, H. Z. , & Levinson, A. R. (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, 136-4.
 - Li, S. A. et al. (2016). Structural basis of Dscam1 homodimerization: Insights into context constraint for protein recognition. *Sci. Adv.*, 2: e1501118.
 - Lippman, Z., Gendrel, A., Black, M., Vaughn, M., Dedhia, N., et al. (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature*, 430, 471–76.
 - Liu ZY, Moore PH, Ma H, Ackerman CM, RagibaM, et al. 2004. A primitive Y chromosome in papaya marks incipient sex chromosome evolution. *Nature* 427:348–52
 - Livak, K. J. (1990). Detailed structure of the *Drosophila melanogaster* stellate genes and their transcripts. *Genetics*, 124, 303-316.
 - Louca, A. (1984). Annual report of the Department of Agriculture for the year 1983. Nicosia, Cyprus; Ministry of Agriculture and Natural Resources, p. viii 167 pp.
 - Mank, J. E., & Avise, J. C. (2009). Evolutionary diversity and turn-over of sex determination in teleost fishes. *Sex. Dev.*, 3, 60–67.
 - Manousis, T., & Moore, N. F. (1987). Control of *Dacus oleae*, a major pest of olives. *Insect Sci. Applic.*, 8(1), 1-9.
 - Margaritopoulos, J. T., Skavdis, G., Kalogiannis, N., Nikou, D., Morou, E., et al. (2008). Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece, and improved diagnostic for an iAChE mutation. *Pest Manage. Sci.*, 64,

900–8.

- Marshall Graves, J. A., & Peichel, C. L. (2010). Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or to limited options? *Genome Biol.*, 11(4), 205. doi: 10.1186/gb-2010-11-4-205.
- Marshall, J. M., & Hay, B. A. (2014). Medusa: A Novel Gene Drive System for Confined Suppression of Insect Populations. *PLOS ONE*, 9(7):e102694. doi:10.1371/journal.pone.0102694.
- Martelli, G. (1908). Note dietologiche sulla mosca delle olive. *Boll. Lab. Zool. gem. agr. Portici* 2, 3-11.
- Martin, H. (1952). Contribution à l'étude de la mouche de l'olive *Dacus oleae* Rossi(Dipt. Trypetidae) en Algérie et en Provence. *Bull. Soc. Entomol.*, 25, 341-348.
- Mavragani-Tsipidou, P. (2002) Genetic and cytogenetic analysis of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 116, 45–57.
- Mazomenos, B. E. (1984). Effect of age and mating on pheromone production in the female olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.). *J. Insect Physiol.*, 30, 765-69.
- Mazomenos, B. E., Haniotakis, G. E. (1985). Male olive fruit fly attraction to synthetic sex pheromone components in laboratory and field tests. *J. Chern . Ecol*, 11, 397-405.
- Mazomenos, B. E., & Pomonis, I. G. (1983). Male fruit fly pheromone: isolation, identification and lab. bioassays. *CEC/IOBC Symp., Athens, Nov. 1982*. pp.96-103.
- Miller, D. D., & Stone, L. E. (1962). A reinvestigation of karyotype in *Drosophila affinis*. *J Hered*, 53, 12-24.
- Muller, H. J. (1940). in *The New Systematics* (ed. Huxley, J.), 185–268. *Clarendon Press*.
- Munger, S. C. et al. (2009). Elucidation of the transcription network governing mammalian sex determination by exploiting strain-specific susceptibility to sex reversal. *Genes Dev.*, 23, 2521–2536.
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Frati, F. (2003). The mitochondrial genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Mol. Biol.*, 12, 605–11.
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G. K., Frati, F. (2005). Population structure and colonization history of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Mol. Ecol.*, 14, 2729–38.

- Neuenschwander, P. (1982). Beneficial insects caught by yellow traps used in mass-trapping of the olive fruit fly, *Dacus oleae*. *Entomol. Exp. Appl.*, *32*, 286–96.
- Neuenschwander, P., & Michelakis, S. (1978). The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Z. ang. Ent.*, *86*, 420-433.
- Neuenschwander, P., Michelakis, S., Holloway, P., Berchtold, W. (1985). Factors affecting the susceptibility of fruits of different olive varieties to attack by *Dacus oleae* (Gmel.) (Dipt., Tephritidae). *Z. ang. Ent.*, *100*, 174-188.
- Neuenschwander, P., Michelakis, S., Kapatos, E. (1986). *Dacus oleae* (Gmel.), In: Y. Arambourg (Ed.): 115-159
- Nicol, B., & Yao, H. H. (2015). Gonadal identity in the absence of pro-testis factor Sox9 and pro-ovary factor β -catenin in mice. *Biol. Reprod.* *93*, 35. doi: 10.1095/biolreprod.115.131276.
- Ohbayashi, F., Suzuki, M. G., Mita, K., Okano, K., Shimada, T. (2001). A homologue of the *Drosophila* doublesex gene is transcribed into sex-specific mRNAs isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.*, *128*, 145–58.
- Orlando, C., Tarantino, L., La Notte, F. (1974). The control of olive fly with poisoned protein bait. *Frutticoltura*, *35*, 33-36.
- Orphanidis, P. S., Patsakos, P. G., Kalmoukos, P. E. (1966). Preliminary field experiments on the possibility of chemical sterilization of the adult olive fruit flies, *Dacus oleae* (Gmel.). *Ann. Inst. Phytopath. Benaki*, *7*, 189-201.
- Orphanidis, P. S., & Kalmoukos, P. K. (1979a). Insecticide mixtures as a means for improving protein hydrolysate baits used against the olive-fly (*Dacus oleae* Gmel.). *Z. Ang. Zool.*, *66*, 75-86.
- Orphanidis, P. S., & Kalmoukos, P. K. (1979b). Improvement of protein hydrolysate baits against the olive-fruit fly (*Dacus oleae* (Gmel.)) by using insecticide mixtures. *Ann. Inst. Phytopath. Benaki*, *12*, 35-49.
- Pimpinelli, S., Berloco, M., Fanti, L., Dimitri, P., Bonaccorsi, S., et al. (1995). Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 3804–8.

- Polanco, J. C., Wilhelm, D., Davidson, T. L., Knight, D., Koopman, P. (2010). Sox10 gain-of-function causes XX sex reversal in mice: implications for human 22q-linked disorders of sex development. *Hum. Mol. Genet*, 19, 506–516.
- Pomiankowski, A., Nothiger, R., Wilkins, A. (2004). The evolution of the Drosophila sex-determination pathway. *Genetics*, 166, 1761–73. PMID:PMC1470811.
- Presgraves, D., & Orr, H. A. (1998). Haldane’s rule in taxa lacking a hemizygous X. *Science*, 282, 889–91.
- Prokopy, R. J., & Haniotakis, G. E. (1975). Responses of wild and laboratory cultured *Dacus oleae* to host plant color. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 68, 73-77.
- Prokopy, R.J. (1982). Tephritid relationships with plants, In: *Fruit Flies of Economic Importance*, Ed. by R. CAVALLORO, *Proc. CEC/IOBC Inter. Symp. Athens Greece*, 16-19 Nov. 1982, 230-239, Rotterdam:Balkema
- Pucci, C., & Ambrosi, G. (1981). Ovideposizione del *Dacus oleae* (Gmel.) e dimensioni delle drupe. *Frust. Entomol. (N. S.)* 4, 181-194.
- Raymond, C. et al. (1998). Evidence for evolutionary conservation of sex-determining genes. *Nature*, 391,691–695.
- Raymond, C. S., Murphy, M. W., O’sullivan, M. G., Bardwell, V. J., Zarkower, D. (2000). Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. *Genes Dev.*, 14, 2587–2595.
- Ribeyre, C, Lopes, J., Boule’, J. B., Piazza, A., Gue’din, A., et al. (2009) The Yeast Pif1 Helicase Prevents Genomic Instability Caused by G-Quadruplex-Forming CEB1 Sequences In Vivo. *PLoS Genet*, 5(5): e1000475. doi:10.1371/journal.pgen.1000475.
- Rice, R. E., Phillips, P. A., Stewart-Leslie, J., Sibbett, G. S. (2003), Olive fruit fly populations measured in central and southern California. *Calif. Agric.*, 57, 122–27.
- Ritossa, F. M., & Spiegelman, S. (1965). Localization of DNA complementary to ribosomal RNA in the nucleolus organizer of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 53, 737-745.
- Sacantanis, K. (1953). Facteurs diterminant le comportement de *Dacus oleae* Gmel. vis-a-vis des variitis d'olivier. *Rev. Path. veg. Ent. agric.*, 32, 50-57.
- Sagri, E., Koskinioti, P., Gregoriou, M. E., Tsoumani, K. T., Bassiakos, Y. C., Mathiopoulos, K. D. (2017). Housekeeping in Tephritid insects: the best gene choice

- for expression analyses in the medfly and the olive fly. *Nature Scientific Reports*, 7:45634. doi: 10.1038/srep45634.
- Salvemini, M. et al. (2014). Subtractive and differential hybridization molecular analyses of *Ceratitis capitata* XX/XY versus XX embryos to search for male-specific early transcribed genes. *BMC Genetics*, 15(Suppl. 2):S5. doi: <http://www.biomedcentral.com/1471-2156/15/S2/S5>.
 - Sato, Y., Shinka, T., Sakamoto, K., Ewis, A. A., Nakahori, Y. (2010). The male-determining gene SRY is a hybrid of DGCR8 and SOX3, and is regulated by the transcription factor CP2. *Mol. Cell Biochem.*, 337, 267–275.
 - Schetelig, M. F., & Handler, A. M. (2013). Y-linked markers for improved population control of the tephritid fruit fly pest, *Anastrepha suspensa*. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, 136, 123-33. doi: 10.1007/10_2013_209.
 - Schoonhoven, M. (1982). The role of chemoreception in host plant finding and oviposition in phytophagous Diptera, In: *Fruit Flies of Economic Importance*, Ed. by R. CAVALLORO, *Proc. CEC/IOBC Inter. Symp. Athens Greece*, 16-19 Nov. 1982, 240-247, Rotterdam: Balkema
 - Sharma, A. et al. (2017) .Male sex in houseflies is determined by Mdmd, a paralog of the generic splice factor gene CWC22. *Science*, 356(6338), 642–645. doi: 10.1126/science.aam5498.
 - Sinclair, A. H. et al. (1990). A gene from the human sex determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 346, 240–244.
 - Sinkins, S. P., (2016). Yob makes mosquitoes male. A gender-switch gene opens avenues to malaria control. *Science*, 353(6294), 33-4. doi: 10.1126/science.aag1012.
 - Skouras, P. J., Margaritopoulos, J. T., Seraphides, N. A., Ioannides, I. M., Kakani, E. G., et al. (2007). Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Manage. Sci.*, 63, 42–48.
 - Soultanopoulos, C., & Broumas, T. (1979). Effectiveness of different insecticides on *Dacus oleae* Gmel. *Phytiatr.-Phytopharm*, 28, 53-58.
 - Soultanopoulos, C., & Broumas T. (1977). Comparative toxicity of insecticidal products to *Eupelmus urozonus* (Hym: Eupelmidae) and *Dacus oleae* (Dipt: Trypetidae). *Entomophaga*, 22, 237-242.
 - Stasinakis, P., Katsares, V., Mavragani-Tsipidou, P. (2001). Organophosphate resistance and allelic frequencies of esterases in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*

(Diptera: Tephritidae). *J. Agric. Urban Entomol.*, 18, 157–68.

- Steinemann, M., & Steinemann, S. (1998). Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution. *Genetica* 102–103, 409–20.
- Steinemann, M., & Steinemann, S. (1998). Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution. *Genetica*, 102–103, 409–20.
- Steinemann, S., & Steinemann, M. (1999). The Amylase gene cluster on the evolving sex chromosomes of *Drosophila miranda*. *Genetics*, 151, 151–61.
- Sved, J. A., Chen, Z., Shearman, D., Frommer, M., Gilchrist, S., Sherwin, W. B. (2015). Extraordinary conservation of entire chromosomes in insects over long evolutionary periods. *Evolution*, 70(1), 229–234. doi: 10.1111/evo.12831.
- Thomas, D. B., & Mangan R. L. (2005). Nontarget impact of spinosad GF-120 bait sprays for control of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Texas citrus. *J. Econ. Entomol.*, 98, 1950–56.
- Thomas, D. B., & Mangan, R. L. (2005). Nontarget impact of spinosad GF-120 bait sprays for control of the Mexican fruit fly (Diptera: Tephritidae) in Texas citrus. *J. Econ. Entomol.*, 98, 1950–56.
- Traut, w. (2010) .New Y chromosomes and early stages of sex chromosome differentiation: sex determination in *Megaselia*. *J Genet.*, 89(3), 307-13.
- Traut, W., Sahara, K., Marec, F. (2007). Sex chromosomes and sex determination in Lepidoptera. *Sex. Dev.* , 1, 332–46. doi: 10.1159/000111765
- Tsakas, S., & Krimbas, C. B. (1970). The genetics of *Dacus oleae*. IV. Relation between adult esterase genotypes and survival to organophosphate insecticides. *Evolution*, 24, 807–15.
- Tsiropoulos, G. J. (1977). Reproduction and survival of the adult *Dacus oleae* feeding on pollens and honeydews. *Environ. Entomol.* 6, 390-392.
- Tsoumani, K. T., Augustinos, A. A., Kakani, E. G., Drosopoulou, E., Mavragani-Tsipidou, P., Mathiopoulou, K. D. (2011). Isolation, annotation and applications of expressed sequence tags from the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol. Genet. Genom.*, 285,33-45. doi:10.1007/s00438-010-0583-y.
- Tsoumani, K. T., Drosopoulou, E., Bourtzis, K., Gariou-Papalexiou, A., Mavragani-Tsipidou, P., Zacharopoulou, A., et al. (2015). Achilles, a New Family of

- Transcriptionally Active Retrotransposons from the Olive Fruit Fly, with Y Chromosome Preferential Distribution. *Distribution*. PLoS ONE, 10(9): e0137050. doi:10.1371/journal.pone.0137050.
- Tucci, A. (1978). First observations on the control of *Dacus oleae* Gmel. in Abruzzo by means of protein bait-sprays. *Not. Mai. Piante*, 63-65.
 - Tzanakakis, M. E. (2003). Seasonal development and dormancy of insects and mites feeding on olive: a review. *Netherlands Journal of Zoology*, 52(2-4), 87-224.
 - Vibranovski, M. D., Koerich, L. B., Carvalho, A. B. (2008). Two new Y-linked genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 179, 2325–27.
 - Vicoso, B., & Bachtrog, D. (2015). Numerous Transitions of Sex Chromosomes in Diptera. *PLOS Biology*. doi:10.1371/journal.pbio.1002078.
 - Vicoso, B., & Bachtrog, D. (2013). Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila*. *Nature*, 499, 332-335. doi:10.1038/nature12235.
 - Vicoso, B., & Bachtrog, D. (2013). Reversal of an ancient sex chromosome to an autosome in *Drosophila*. *Nature*, 499, 332-37. doi:10.1038/nature12235.
 - Vidal, V. P., Chaboissier, M. C., de Rooij, D. G., Schedl, A. (2001). A. Sox9 induces testis development in XX transgenic mice. *Nat. Genet*, 28, 216–217.
 - Vita, G., & Barbera, F. (1976). Aspetti biochimici del rapporto piante insetto nel *Dacus oleae* (Gmel.). *Atti Congr. Naz. Ital. Entomol.*, 11, 151-61.
 - Vontas, J. G., Cosmidis, N., Loukas, M., Tsakas, S., Hejazi, M. J., et al. (2001). Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 71, 124–32.
 - White, I. M. (2006). Taxonomy of the *Dacina* (Diptera: Tephritidae) of Africa and the Middle East. *Afr. Entomol. Mem.*, 2, 1–152.
 - White, I. M., & Elson-Harris, M. M. (1992). *Fruit Flies of Economic Significance: Their Identification and Bionomics*. Oxon, UK: CAB Int.
 - Wiegmann, B. M., Trautwein, M. D., Winkler, I. S., Barr, N. B., Kim, J.W., et al. (2011). Episodic radiations in the fly tree of life. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 5690–5695. doi:10.1073/pnas.1012675108.
 - Willhoeft, U., & Franz, G. (1996). Identification of the Sex-Determining Region of the *Ceratitidis capitata* Y Chromosome by Deletion Mapping. *Genetics*, 144, 737-745.
 - Willhoeft, U., & Traut, W. (1990). Molecular differentiation of the homomorphic sex

- chromosomes in *Megaselia scalaris* (Diptera) detected by random DNA probes. *Chromosoma*, 99, 237–42.
- Y chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci*, 79, 7405-7409.
 - Zdobnov, E., M., von Mering, C., Letunic, I., Torrents, D., Suyama, M., et al. (2002). Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science*, 298, 149–59.
 - Zurovcova, M., & Eanes, W. F. (1999). Lack of nucleotide polymorphism in the Y-linked sperm flagellar dynein gene *Dhc-Yh3* of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Genetics* 153, 1709–15.
 - Zygouridis, N. E., Augustinos, A. A., Zalom, F. G., Mathiopoulos, K. D. (2009). Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity*, 102, 402–12.