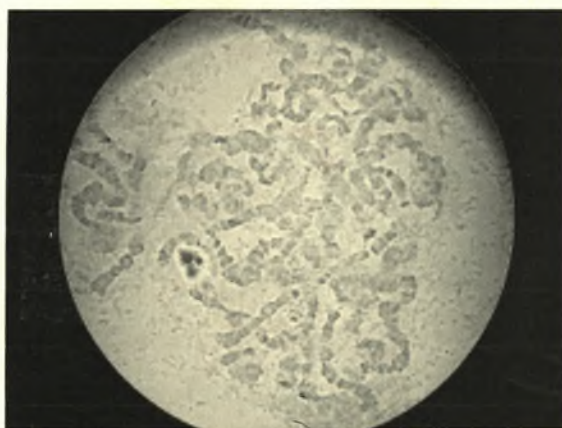




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΦΥΣΙΚΩΝ ΧΑΡΤΩΝ
ΣΤΟ ΕΝΤΟΜΟ *Bactrocera oleae***



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΣΟΥΜΑΝΗ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

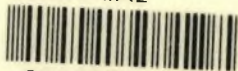
ΛΑΡΙΣΑ 2006



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 4730/1
Ημερ. Εισ.: 27-02-2006
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2006
ΤΣΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087837

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος
Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Μαμούρης Ζήσης
Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
- Κωστελίδου Καλλιόπη
Ερευνήτρια Ινστιτούτου Pasteur, Διδάσκουσα ΠΔ 407 του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας – Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, υπό την επίβλεψη του Επίκουρου Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Κωνσταντίνου Μαθιόπουλου.

Νιώθω υποχρεωμένη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον κ. Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο που με εμπιστεύθηκε δίνοντάς μου τη δυνατότητα να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα. Έχω ωφεληθεί τα μέγιστα από την επιστημονική και εύστοχη κριτική του καθώς και τις πολύτιμες συμβουλές του. Ως πραγματικός ακαδημαϊκός δάσκαλος με την υπομονή, την ενθάρρυνση και την κατανόησή του συνέβαλε στη διαμόρφωση των προτύπων σκέψης μου.

Επιθυμώ επίσης να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κ. Ευδοξία Κακάνη, Υποψήφια Διδάκτορα, για την άψογη συνεργασία, την ηθική υποστήριξη και τη φιλία με την οποία με περιέβαλε. Η βοήθεια και οι υποδείξεις της υπήρξαν πολύτιμες καθ' όλη τη διάρκεια της συγκεκριμένης προσπάθειας.

Τέλος θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλη την ομάδα του εργαστηρίου για την πολύ καλή συνεργασία, καθώς και όλους όσους βοήθησαν με άμεσο ή έμμεσο τρόπο στη διεκπεραίωση της εργασίας αυτής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1. Ο δάκος της ελιάς.....	8
1.1.1. Οικονομική σημασία, προέλευση, εξάπλωση.....	8
1.1.2. Μορφολογία.....	9
1.1.3. Βιολογικός κύκλος.....	10
1.1.4. Προκαλούμενη ζημία.....	13
1.1.5. Διαχείριση, καταπολέμηση.....	14
1.2. Μοριακές και γενετικές έρευνες.....	16
1.3. Πολυταινικά χρωμοσώματα , υβριδοποίηση <i>in situ</i>	18
1.4. Χαρτογράφηση χρωμοσωμάτων και Γενετικοί δείκτες.....	21
1.5. <i>Expressed sequence tags (ESTs)</i>	25
1.6. Σκοπός εργασίας.....	26
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	27
2.1. <i>cDNA</i> βιβλιοθήκη δάκου.....	27
2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (<i>PCR</i>).....	28
2.3. Ηλεκτροφόρηση <i>DNA</i> σε πήκτωμα αγαρόζης.....	30
2.4. Απομόνωση μορίων <i>DNA</i> από πήκτωμα αγαρόζης.....	32
2.5. Πέψη πλασμιδιακού <i>DNA</i> με ένζυμα περιορισμού.....	33
2.6. Αντίδραση σύνδεσης μορίων <i>DNA</i> (<i>Ligation</i>).....	35
2.7. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια.....	38
2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού <i>DNA</i>	41
2.9. Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης <i>DNA</i>	45
2.10. Χαρακτηρισμός αλληλουχίας.....	45
2.11. Κατασκευή πολυταινικών χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων.....	46

2.12. Υβριδισμός <i>in situ</i> σε πολυταινικά χρωμοσώματα.....	47
2.12.1. Προετοιμασία παρασκευασμάτων για υβριδισμό.....	48
2.12.2. Σήμανση ανιχνευτών.....	48
2.12.3. Υβριδισμός.....	50
2.12.4. Ανίχνευση σήματος.....	50
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	52
3.1. Απομόνωση ενθεμάτων.....	52
3.1.1. Ενίσχυση φαγικής βιβλιοθήκης.....	52
3.1.2. Ενίσχυση απομονωμένων φαγικών κλώνων.....	53
3.2. Χαρακτηρισμός της αλληλουχίας των απομονωμένων ενθεμάτων...54	
3.3. Κυτταρογενετική χαρτογράφηση με <i>in situ</i> υβριδοποίηση.....	57
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	59
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	63
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	67

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Gmelin), είναι το πιο επιβλαβές έντομο των ελαιοκαλλιεργειών. Η επιτακτική ανάγκη για την ανάπτυξη εναλλακτικών, αποτελεσματικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων ελέγχου του παρασίτου έδωσε νέα ώθηση στην έρευνα και τη μελέτη του σε μοριακό και γενετικό επίπεδο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η κυτταρογενετική χαρτογράφηση του γονιδιώματος του εντόμου. Στα πλαίσια του στόχου αυτού, επιτεύχθηκε η απομόνωση και η ταυτοποίηση 10 κλωνοποιημένων αλληλουχιών της cDNA βιβλιοθήκης του δάκου. Ο καθορισμός της αλληλουχίας αυτών των EST (expressed sequence tags) δεικτών έδωσε τη δυνατότητα σύγκρισής τους με άλλες ήδη γνωστές αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων, με αποτέλεσμα να εκτιμηθεί η λειτουργία των αντίστοιχων γονιδίων σύμφωνα με τις παρατηρούμενες ομολογίες. Ακολούθως, δύο από αυτούς τους τυχαίους κλώνους χαρτογραφήθηκαν με την τεχνική της *in situ* υβριδοποίησης στους βραχίονες των πολυταινικών του χρωμοσωμάτων, προσδιορίζοντας την κυτταρογενετική θέση των γονιδίων *hsp70* και *CDK5* που υποδηλώνουν αντίστοιχα.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελιά είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη ζωή των ανθρώπων της Μεσογείου. Από αρχαιοτάτων χρόνων, εμφανίζεται στους μύθους, στις παραστάσεις και στην ιστορία των λαών της. Η καλλιέργειά της έχει μεγάλη κοινωνική, οικονομική, πολιτιστική, πολιτική και οικολογική σημασία για τις χώρες της Μεσογείου,



διότι καλύπτει σημαντικό μέρος της γεωργικής έκτασης και η παραγωγή της χρησιμοποιείται για παραγωγή λαδιού και βρώσιμης ελιάς, προϊόντα που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της διαίτας των μεσογειακών λαών. Στα δύο αυτά κυριότερα προϊόντα που προκύπτουν από την καλλιέργεια της ελιάς, πρέπει να προστεθεί και το πυρηνέλαιο που προορίζεται για βιομηχανική χρήση, αλλά και κάποια υποπροϊόντα με οικονομική σημασία, όπως τα φύλλα, ο κορμός, ο πυρήνας κ.α.



Η ελιά παίζει μείζονα ρόλο στη διατήρηση του περιβάλλοντος, γιατί προσφέρεται για την αξιοποίηση των εδαφών που εξαρτώνται μόνο από βροχοπτώσεις. Σε τέτοιες «ευαίσθητες» περιοχές, η εγκατάσταση άλλων καλλιεργειών, εκτός της ελιάς, εκθέτει τα εδάφη

στον κίνδυνο των διαβρώσεων, ενώ η ελαιοκαλλιέργεια, σε συγκαλλιέργεια με άλλα είδη, προσφέρεται για τη συντήρηση των προβληματικών αυτών εδαφών. Υπολογίζεται ότι σήμερα υπάρχουν περίπου 800 εκατομμύρια ελαιόδεντρα στον κόσμο ενώ η συντριπτική πλειοψηφία (99%) ανήκει στις μεσογειακές χώρες, οι οποίες διαθέτουν άριστες εδαφοκλιματικές συνθήκες για την ανάπτυξη της ελιάς.

Περιοχή	Αριθμός ελαιοδένδρων
Μεσόγειος	754.200.000
ΗΠΑ	8.500.000
Ασία	21.000.000
Αφρική + Αυστραλία	500.000
Σύνολο	784.200.000

Πίνακας 1. Κατανομή και αριθμοί καλλιεργούμενων ελαιοδένδρων (<http://www.elialadi.gr>).

Η Ελλάδα, παρότι χώρα μικρή σε έκταση, κατέχει την 3η θέση παγκοσμίως στην παραγωγή λαδιού, μετά την Ισπανία και την Ιταλία. Σήμερα στην Ελλάδα υπάρχουν περίπου 120.000.000 ελαιόδενδρα (για έναν πληθυσμό 10.000.000 περίπου) που καλύπτουν έκταση 7 περίπου εκατομμυρίων στρεμμάτων. Περίπου 450.000 ελληνικές οικογένειες ασχολούνται με την καλλιέργεια και επεξεργασία του ελαιόδενδρου σε όλες τις περιοχές της χώρας.

Περιοχή	Αριθμός (εκατομ.) ελαιοδένδρων	Έκταση (στρέμματα)
Ισπανία	167	20.870.000
Γαλλία	5	448.000
Ελλάδα	120	7.581.000
Πορτογαλία	165	1.765.000
Σύνολο	506	31.164.000

Πίνακας 2. Γεωγραφική κατανομή των καλλιεργούμενων ελαιοδένδρων στην Ευρωπαϊκή Κοινότητα (<http://www.elialadi.gr>).

Το ελαιόλαδο είναι σπουδαίο προϊόν, μεγάλης οικονομικής και κοινωνικής σημασίας γιατί η ακαθάριστη αξία της παραγωγής του αντιπροσωπεύει το 12,5% της ακαθάριστης φυτικής παραγωγής της χώρας και το 46,5% του ακαθαρίστου γεωργικού εισοδήματος (<http://www.elialadi.gr>). Η καλλιέργεια

της ελιάς στις περισσότερες περιοχές της χώρας έχει τη μορφή μονοκαλλιέργειας και το ελαιόλαδο αποτελεί το αποκλειστικό εισόδημα των κατοίκων των περιοχών αυτών. Οι αναντικατάστατες και μοναδικές ιδιότητές του και τα εξαιρετικά συγκριτικά πλεονεκτήματα του τόπου μας, δίδουν προοπτικές και μεγάλες δυνατότητες στο προϊόν αυτό που θα πρέπει να αξιοποιηθούν.

Γι' αυτό και η προστασία του από τους διάφορους εχθρούς ή ασθένειες έχει επίσης μεγάλη σημασία. Ιδιαίτερα μάλιστα για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς, που είναι μια δύσκολη υπόθεση. Γι' αυτό και η προστασία του από τον εχθρό αυτό, βρίσκεται χρόνια τώρα σε πρώτη προτεραιότητα της Διοίκησης, της Επιστήμης, των Φορέων και των Ελαιοπαραγωγών.

1.1. Ο δάκος της ελιάς

1.1.1. Οικονομική σημασία, προέλευση, εξάπλωση

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Gmelin), αποτελεί το πιο επιβλαβές έντομο των ελαιοκαλλιεργειών (Clarke et al, 2005). Ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των Διπτέρων, που περιλαμβάνει τις αποκαλούμενες «μύγες των φρούτων» (fruit flies). Χαρακτηριστικό τους αποτελεί η εναπόθεση των αυγών τους στους καρπούς των



Εικόνα 1. Θηλυκό άτομο *Bactrocera oleae*.

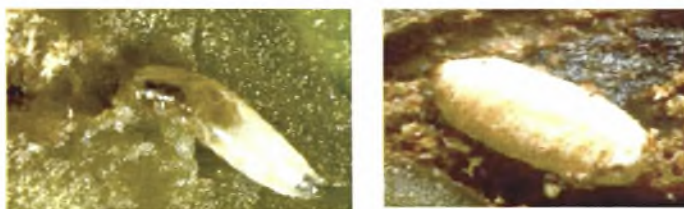
φρούτων και κατ' επέκταση η ανάπτυξη των προνυμφών τους στο εσωτερικό αυτών, με αποτέλεσμα η παραγωγή να καθίσταται πλέον μη εμπορεύσιμη. Για το λόγο αυτό και η οικονομική σημασία του δάκου εστιάζεται στη σημαντική ποσοτική και ποιοτική ζημία που προκαλεί στην παγκόσμια παραγωγή. Όπως έχει εκτιμηθεί, ο δάκος ευθύνεται για την καταστροφή της ολικής παραγωγής ελαιών σε ποσοστό 5% (30% στις Μεσογειακές χώρες), με άμεσο αντίκτυπο σε οικονομικό επίπεδο την απώλεια 800 εκατομμυρίων δολλαρίων ετησίως (Montiel Bueno & Jones, 2002).

Η εξάπλωσή του συμπίπτει εξελικτικά με εκείνη του ξενιστή του, καθώς αποτελεί έντομο μονοφάγο με αποκλειστική διατροφική πηγή τον καρπό της ελιάς. Οι πληθυσμοί του δάκου εντοπίζονται τόσο σε περιοχές με εκτεταμένη

καλλιέργεια ήμερων ελαιοδένδρων (που έχουν εισαχθεί από τον άνθρωπο), όσο και σε περιοχές με γηγενείς άγριες ποικιλίες (*Olea europaea*). Ιδιαίτερη εξάπλωση παρατηρείται στις χώρες κατά μήκος της Μεσογειακής λεκάνης, όπου και καταγράφονται τα πρώτα δείγματα εισβολής του παρασίτου από τον 3ο αιώνα π.Χ.. Ωστόσο, παρά την διαδεδομένη εμφάνισή του στις περιοχές αυτές, σύμφωνα με πρόσφατες αναφορές εντοπίζεται ακόμη κατά μήκος των ανατολικών ακτών της Αφρικής ως τη Νότιο Αφρική, στα Κανάρια Νησιά, τη Μέση Ανατολή, την Ινδία και την Κεντρική Αμερική, καθώς και στην πολιτεία της Καλιφόρνια των Η.Π.Α. (Rice, 1999; Augustinos et al, 2002; Rice et al, 2003). Συνεπώς, η παρουσία του δάκου σχετίζεται άμεσα με την εισαγωγή της ελαιοκαλλιέργειας για γεωργική εκμετάλλευση στις περιοχές αυτές. Επιπλέον, η ικανότητα που χαρακτηρίζει το δάκο να αποικίζει γρήγορα νέες περιοχές κατορθώνοντας να επιβιώνει και τελικά να αναπτύσσεται, θέτει κάθε χώρα με καλλιέργεια ελαιοδένδρων σε κίνδυνο εισβολής του (USDA, 2001).

1.1.2. Μορφολογία

Μεταξύ των ειδών του γένους Tephritidae των Διπτέρων, ο δάκος της ελιάς αποτελεί το μικρότερο σε μέγεθος έντομο. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του εντόμου διαφοροποιούνται κατά τα διαδοχικά στάδια ανάπτυξής του. Τα αυγά είναι άσπρα με μήκος 0,7mm και διάμετρο 0,2mm. Η προνύμφη έχει δομή



Εικόνα 2. Προνύμφη και Βομβύκιο του εντόμου.

άποδης κάμπιας με λευκοκίτρινη χροιά και μήκος 7mm, ενώ το βομβύκιο εμφανίζεται ως ωοειδής σχηματισμός μήκους περίπου 4mm σε αποχρώσεις του κίτρινου ή ακόμη και του καφέ. Στην ενήλικη μύγα μήκους περίπου 5mm, η κεφαλή, ο θώρακας και η κοιλία εμφανίζονται με καστανό χρώμα, ενώ χαρακτηριστικοί είναι οι μεγάλοι σύνθετοι κοκκινωποί οφθαλμοί, και οι μικρές κεραίες. Κατά μήκος της επιφάνειας του ανώτερου τμήματος του θώρακα (κορμός) διακρίνονται τρεις παράλληλες μαύρες ταινίες, καθώς και μια άσπρη τριγωνική δομή στο οπίσθιο τμήμα του όπου επισυνάπτονται τα φτερά.

Η κοιλία, στις άκρες της οποίας παρατηρούνται σκουρότερες περιοχές, καταλήγει στις θηλυκές μύγες στον ωοθέτη (ovipositor) που είναι ορατός με γυμνό μάτι, ενώ στις αρσενικές το τελικό της τμήμα είναι αμβλύ.



Εικόνα 3. Μορφολογικές διαφορές μεταξύ θηλυκού και αρσενικού ατόμου δάκου.

Οι βραχίονες και μια περιοχή εκατέρωθεν της βάσης των φτερών παρουσιάζονται με κίτρινο χρώμα. Τα φτερά έχουν δυνατότητα έκτασης έως



Εικόνα 4. Μορφολογικά χαρακτηριστικά θηλυκού ατόμου δάκου.

10mm και είναι συνήθως διαφανή με ιριδίζουσες αποχρώσεις. Χαρακτηριστική είναι η μαύρη κηλίδα στις άκρες τους, που λειτουργεί και ως στοιχείο διαφοροποίησης από τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας που εμφανίζουν σκοτεινές ζώνες ή σχέδια στην επιφάνεια των φτερών τους. Τα πόδια και οι αλτήρες εμφανίζονται με κιτρινο-κόκκινο και λευκό χρωματισμό αντίστοιχα. (Weems *et al.* 1999).

1.1.3. Βιολογικός κύκλος

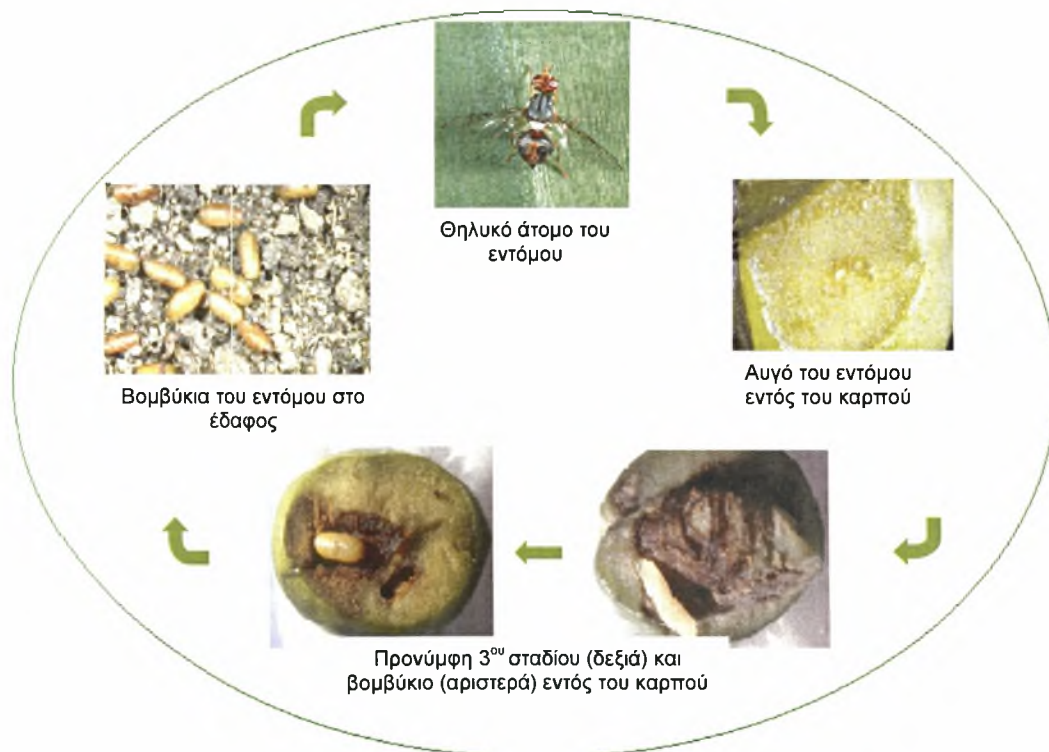
Η μύγα της ελιάς έχει την ικανότητα να συμπληρώνει τον βιολογικό της κύκλο περισσότερες από μια φορές κατά τη διάρκεια ενός έτους ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες κάθε περιοχής, γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως πολυκυκλικό έντομο. Συγκεκριμένα στην περιοχή της Μεσογείου παρατηρούνται σε διάστημα ενός έτους από 2 έως 5 γενεές. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα είναι δυνατόν να εντοπιστούν οι πληθυσμοί του εντόμου είτε ως ενήλικα άτομα ή αυγά στον καρπό, είτε ως βομβύκια μερικά εκατοστά κάτω από την επιφάνεια του εδάφους. Οι πληθυσμοί των ενήλικων ατόμων που κατορθώνουν να επιβιώσουν όμως ως την άνοιξη είναι ελάχιστοι. Η μείωση του αριθμού τους παρατηρείται κυρίως κατά τους μήνες Φεβρουάριο – Μάρτιο λόγω περιοριστικών παραγόντων που σχετίζονται με τη μειωμένη

διαθεσιμότητα των καρπών και τις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως οι χαμηλές θερμοκρασίες. Παρ' όλα αυτά, όταν οι συνθήκες το επιτρέπουν οι ενήλικες μύγες μπορούν να επιβιώσουν για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των έξι μηνών. Επιπλέον, σε ήπια κλίματα που ευνοούνται τόσο το αναπαραγωγικό όσο και τα αναπτυξιακά στάδια, η διαδοχή των γενεών μπορεί να είναι συνεχής σε όλη τη διάρκεια του έτους. Ωστόσο, ο μεγαλύτερος αριθμός ενήλικων ατόμων, που προκύπτουν από βομβύκια που έχουν διατηρηθεί κατά τους χειμερινούς μήνες, εμφανίζεται συνήθως τον Μάρτιο και τον Απρίλιο και εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία και το γεωγραφικό πλάτος κάθε περιοχής. Η γενιά αυτή αποτελεί την αφετηρία του οικολογικού κύκλου του εντόμου, γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως πρώτη. Κάθε θηλυκό άτομο που προκύπτει από αυτή έχει τη δυνατότητα εναπόθεσης 10-12 αυγών ημερησίως (ένα σε κάθε καρπό) ενώ μπορεί να φτάσει τα 400 αυγά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του. Τα αυγά εναποθέτονται στο εσωτερικό των καρπών που δεν έχουν συλλεχθεί κατά την προηγούμενη συγκομιδή και έχουν απομείνει στα δένδρα ή περιμένουν έως ότου οι νέοι καρποί φτάσουν σε κατάλληλο μέγεθος ώστε να υποστηρίξουν την λαρβική ανάπτυξη. Στο διάστημα αυτό είναι δυνατό να λειτουργούν ως ξενιστές του εντόμου φυτά διαφορετικά της ελιάς, χωρίς όμως αρνητικές συνέπειες προς αυτά (<http://www.oliveoilsource.com>). Συνεπώς η ωρίμανση των ωοθηκών στα θηλυκά, ο σχηματισμός των πρώτων αυγών και η έκκριση φερομονών που οδηγούν στη σύζευξη με τα αρσενικά άτομα σηματοδοτούνται από την διαθεσιμότητα των καρπών και τον βαθμό σκληρότητας του μεσοκαρπίου τους (σχετική υγρασία). Η πληγή που δημιουργείται από τον ωοθέτη του θηλυκού στην επιφάνεια του καρπού, αποτελεί την πρώτη ένδειξη εισβολής του εντόμου, ενώ οι ουσίες που εκκρίνονται λειτουργούν αποτρεπτικά για τα υπόλοιπα άτομα, όσον αφορά την ωοαπόθεση στον ίδιο καρπό. Στα μέσα του καλοκαιριού κάνει την εμφάνισή της η δεύτερη γενιά, η οποία λόγω των ευνοϊκών κλιματολογικών συνθηκών συμπληρώνεται σε διάστημα μόνο 30-35 ημερών. Συγκεκριμένα, τα αυγά εκκολάπτονται μεταξύ 2-4 ημερών, ενώ η ανάπτυξη των προνυμφών διαρκεί περίπου 20



Εικόνα 5. Εναπόθεση αυγών από θηλυκό άτομο (Vossen et al, 2005).

μέρες και πραγματοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στο μεσοκάρπιο του ελαιόκαρπου. Οι ώριμες λάρβες βομβυκιώνονται στο εσωτερικό του καρπού κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ το φθινόπωρο τον εγκαταλείπουν, σχηματίζοντας βομβύκια στο έδαφος. Ο χρόνος που απαιτείται για να αναπτυχθούν τα βομβύκια κυμαίνεται μεταξύ 8 και 10 ημερών. Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα της τροφής – ώστε να εξασφαλίζεται η επιβίωση και η αναπαραγωγή των ατόμων – είναι δυνατό να υπάρξουν και επιπλέον γενεές κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου έως και τον Δεκέμβριο, οπότε και καταγράφεται η τελευταία γενιά του έτους. Χαρακτηριστικό της αποτελεί το γεγονός ότι τα άτομα μετακινούνται από τον καρπό στο έδαφος όπου και βομβυκιώνονται, για να αντεπεξέλθουν στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες του χειμώνα και τελικά να αποτελέσουν την απαρχή της γενιάς της άνοιξης. Η μετακίνηση αυτή μπορεί όμως να ερμηνευθεί και εξελικτικά ως τρόπος επιβίωσης, αν συνυπολογιστεί ότι την εποχή αυτή πραγματοποιείται η συγκομιδή των καρπών (Vossen et al, 2005).



Εικόνα 6. Βιολογικός κύκλος του εντόμου.

Συνεπώς, όπως εύκολα μπορεί να γίνει αντιληπτό από τα παραπάνω, ο βιολογικός κύκλος της μύγας της ελιάς επηρεάζεται άμεσα από παράγοντες

που σχετίζονται με το περιβαλλοντικό προφίλ κάθε περιοχής, με πιο αντιπροσωπευτικούς τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία. Αν και ακολουθεί συγκεκριμένα αναπτυξιακά στάδια, η διάρκειά τους ποικίλει και κατ' επέκταση και ο αριθμός των γενεών που προκύπτουν μεταξύ διαφορετικών περιοχών.

1.1.4. Προκαλούμενη ζημία

Η προσβολή του ελαιόκαρπου από τον δάκο είναι δυνατό να οδηγήσει σε καταστροφή της παραγωγής είτε σε προνυμφικό, είτε σε στάδιο ενηλικίωσης.

Κατά τη διαδικασία εναπόθεσης των αυγών τους, τα ενήλικα θηλυκά άτομα τρυπούν το επικάρπιο μέσω του ωοθέτη που φέρουν στην άκρη της κοιλίας τους. Η πληγή που δημιουργείται αποτελεί την πρώτη ένδειξη εισβολής του εντόμου, μειώνοντας την εμπορική αξία της επιτραπέζιας ελιάς. Ένας άλλος παράγοντας που μπορεί να λειτουργήσει



Εικόνα 7. Πληγή του επικαρπίου, ως ένδειξη προσβολής του ελαιόκαρπου από ενήλικα άτομα.

αρνητικά είναι δευτερογενής επιμόλυνση των καρπών από μικροοργανισμούς και μύκητες. Η είσοδος των οργανισμών αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την αποσύνθεση (σήψη) του ελαιόκαρπου με χαρακτηριστική πλέον οσμή καθώς και την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων (οξύτητα) σε υψηλά επίπεδα στο λάδι, γεγονός που υποβαθμίζει την ποιότητά του. Τα αυγά εκκολάπτονται και τελικά προκύπτουν οι προνύμφες, το στάδιο που προκαλεί τη μεγαλύτερη ζημία στην παραγωγή. Οι λάρβες, αν και ιδιαίτερα δυσδιάκριτες αρχικά, μεγαλώνουν σε μέγεθος και αναπτύσσονται με αποκλειστική διατροφική πηγή τους ιστούς του μεσοκαρπίου. Αποτέλεσμα της ανάπτυξής τους αυτής είναι η δημιουργία στοών στο εσωτερικό του καρπού και επομένως η καταστροφή του, που μπορεί επιπλέον να οδηγήσει σε πρόωρη πτώση των καρπών. Συμπερασματικά, η προσβολή των ελαιόδενδρων από πληθυσμούς του δάκου μπορεί να προκαλέσει ζημία τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό επίπεδο, ελαττώνοντας την εμπορευματική αξία της παραγωγής (Vossen et al, 2005).

1.1.5. Διαχείριση, καταπολέμηση

Η καταστροφή ή υποβάθμιση του ελαιόκαρπου είναι συνυφασμένη με σημαντικές οικονομικές απώλειες για τις ελαιοπαραγωγούς χώρες, γεγονός που καθιστά αναγκαίο τον αποτελεσματικό έλεγχο των φυσικών πληθυσμών του δάκου. Η χρήση συμβατικών εντομοκτόνων με τη μορφή ψεκασμών αποτέλεσε την επικρατέστερη μέθοδο καταπολέμησης του εντόμου. Οι ψεκασμοί μπορεί να είναι οι προληπτικοί (δολωματικού τύπου – bait sprays) ή καλύψεως (θεραπευτικού τύπου – cover sprays) ανάλογα με το αν αποσκοπούν αντίστοιχα στην αντιμετώπιση ενήλικων ατόμων ή προνυμφών που έχουν ήδη προσβάλει τον καρπό, οπότε και επιλέγονται διαφορετικού τύπου εντομοκτόνα. Στην περίπτωση των προληπτικών ψεκασμών, χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με τα εντομοκτόνα και ουσίες που δρουν προσελκυστικά, όπως προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών (Econoμπορουλος et al, 1986). Ωστόσο η χημική καταπολέμηση αμφισβητήθηκε ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια από περιβαλλοντολόγους. Η μαζική χρήση των χημικών εντομοκτόνων εμπλέκεται στην ευρεία περιβαλλοντική μόλυνση, στην παρουσία χημικών καταλοίπων στα προϊόντα και το περιβάλλον της ελιάς, καθώς και στη διατάραξη της τροφικής αλυσίδας με δυσάρεστες συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία (Denholm & Rowland, 1992). Επιπλέον, οι κατά συρροή ψεκασμοί είχαν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία στελεχών που ανέπτυξαν μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα. Στα ανθεκτικά αυτά άτομα, αλλά και στους απογόνους τους, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις σε γονίδια του νευρικού συστήματος που τους επέτρεπαν να επιβιώσουν, με αποτέλεσμα κάθε επακόλουθη εφαρμογή των εντομοκτόνων να είναι αναποτελεσματική στην ταυτόχρονη αύξηση της συχνότητας των ανθεκτικών ατόμων (Vontas et al, 2002). Επίσης, πρέπει να συνυπολογιστεί το γεγονός ότι τα χημικά εντομοκτόνα δεν παρουσιάζουν εκλεκτικό τρόπο δράσης (species-specific), οπότε δε αποκλείεται το ενδεχόμενο να βλάπτονται εκτός των εντόμων – στόχων και άλλα ωφέλιμα είδη. Όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, συνιστούν την αναγκαιότητα ανάπτυξης εναλλακτικών, πιο ήπιων και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου.

Η χρήση δακοπαγίδων για την παρακολούθηση των φυσικών πληθυσμών μπορεί με μαζική εφαρμογή να μετατραπεί σε μέσο καταπολέμησής τους (Varela et al, 2005). Η λειτουργία τους στηρίζεται στην αξιοποίηση διαφόρων ερεθισμάτων με στόχο την προσέλκυση και τελικά την παγίδευση του εντόμου.



Εικόνα 8. Δακοπαγίδα.

Τα ερεθίσματα μπορεί να είναι είτε οπτικά, είτε ουσίες που επηρεάζουν την συμπεριφορά του εντόμου όπως η σεξουαλική φερομόνη ή τροφικά προσελκυστικά (υδρολυμένη πρωτεΐνη), είτε συνδυασμός τους εξασφαλίζοντας πιο αποτελεσματικά επίπεδα αντιμετώπισης (Bueno et al, 2002).

Η επιτακτική ανάγκη για την εξεύρεση μεθόδων ασφαλούς καταπολέμησης του δάκου έδωσε νέα ώθηση στην έρευνα για τον βιολογικό έλεγχο του παρασίτου. Ο βιολογικός έλεγχος συνίσταται στη διαχείριση των φυσικών εχθρών του εντόμου ή τη στείρωση ατόμων του πληθυσμού του, με απώτερο σκοπό τον φυσικό περιορισμό του. Η τεχνική της στείρωσης των εντόμων (S.I.T.) βασίζεται στη μαζική παραγωγή ή συλλογή ατόμων, τα οποία αφού στείρωθούν μετά από έκθεση σε ακτινοβολία γ , απελευθερώνονται ελεγχόμενα στο φυσικό τους περιβάλλον. Κατά τη σύζευξη τα άτομα αυτά ανταγωνίζονται τα άγρια περιορίζοντας αριθμητικά τον πληθυσμό, εφόσον παρατηρείται ελάττωση των γόνιμων διασταυρώσεων λόγω ανικανότητας του σπέρματος να καταλήξει σε γονιμοποίηση (Econoμopoulos, 1972; Robinson, 2002). Όμως, ακόμα και αν η τελευταία επιτευχθεί, τα άτομα που προκύπτουν έχουν μικρή διάρκεια ζωής εξαιτίας δομικών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των γαμετών μετά την εφαρμογή της ακτινοβολίας. Παρά τα ενθαρρυντικά αποτελέσματα της μεθόδου, στην περίπτωση του δάκου δεν υπήρξε επιτυχημένη έκβαση, γεγονός που αποδόθηκε στη διαφοροποίηση της συμπεριφοράς σύζευξης των εργαστηριακών πληθυσμών σε σχέση με τους φυσικούς (IAEA, 1998).

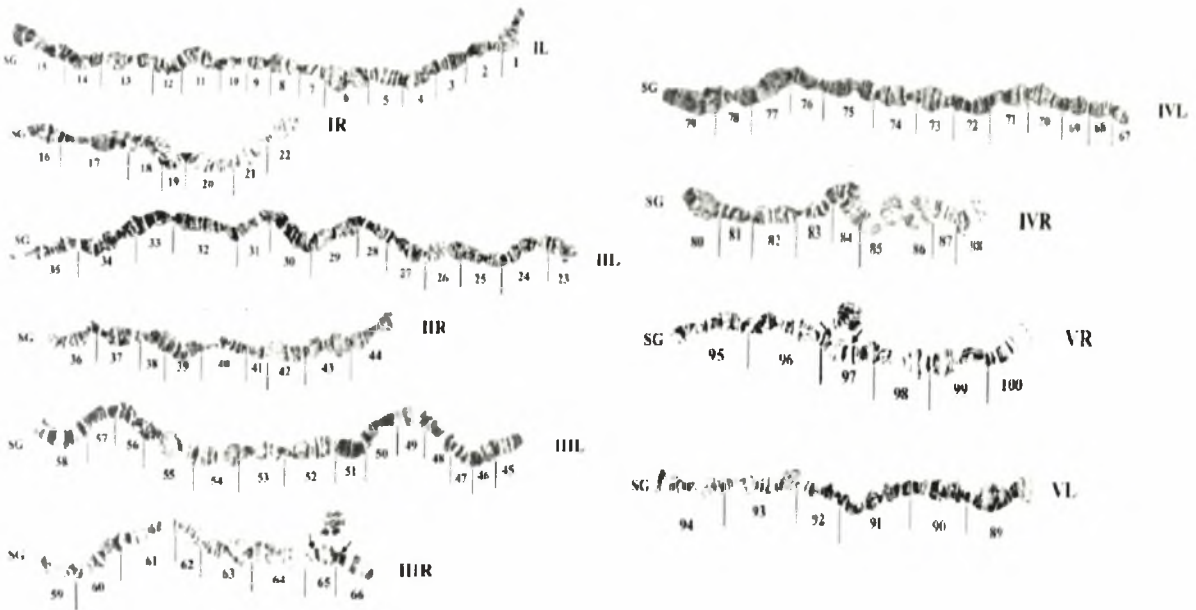
Παρ' όλα αυτά, ολοένα και περισσότερο έδαφος κερδίζει τελευταία η τάση για ολοκληρωμένη καταπολέμηση των παρασίτων (IPM). Πρόκειται για μια στρατηγική συνδυασμού μεθόδων και τεχνολογιών που αποσκοπεί στην εξασφάλιση οικονομικών, οικολογικών και τοξικολογικών παραμέτρων όσον

αφορά την προστασία του φυτού (Bueno et al, 2002). Στις επιμέρους μεθόδους που συγκροτούν αυτή τη στρατηγική συμπεριλαμβάνονται καλλιεργητικά μέτρα περιορισμού των προκαλούμενων ζημιών, ουσίες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του εντόμου με δράση προσελκυστική ή απωθητική, η δυνατότητα χρήσης βελτιωμένων – εκλεκτικών εντομοκτόνων, καθώς και ο βιολογικός έλεγχος του παρασίτου.

1.2. Μοριακές και γενετικές έρευνες

Όπως διατυπώθηκε παραπάνω, για την ανάπτυξη εναλλακτικών, εκλεκτικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων ελέγχου του παρασίτου, απαιτείται η έρευνα και η κατανόηση όχι μόνο της βιολογίας – οικολογίας του αλλά και της γενετικής του. Οι διαθέσιμες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία του παρασίτου περιορίζονται στους παράγοντες διατροφής και διαβίωσης (θερμοκρασία, υγρασία, κλπ), στη συμπεριφορά του κατά τη σύζευξη (επίδραση φυλετικών φερομονών) και την ωοτοκία (καταλληλότητα υποστρωμάτων), καθώς και στις τεχνικές παραμέτρους όσον αφορά την εργαστηριακή ανάπτυξη των στελεχών του (Mazomenos, 1989; Tzanakakis, 1989). Ακόμη, έρευνες σε βιοχημικό επίπεδο ενζυμικών πολυμορφισμών σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου αποτέλεσαν τις πρώτες γενετικές πληροφορίες (Zougos and Loukas, 1989), ενώ μοριακές μελέτες κατέληξαν στην κλωνοποίηση γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες της επιδερμίδας. Παρά το γεγονός ότι ο δάκος αποτελεί ένα έντομο εξαιρετικής οικονομικής σημασίας, η ανάλυσή του σε μοριακό και γενετικό επίπεδο υστερεί σε αντίθεση με άλλα είδη της οικογένειας Tephritidae, όπως η *Ceratitis capitata* που αποτελεί πλέον οργανισμό μοντέλο. Οι πρώτες κυτταρολογικές αναφορές στο δάκο σχετίζονταν με τον καρυότυπο των πυρήνων της μίτωσης, όπου διαπιστώθηκε η ύπαρξη πέντε ζευγών σωματικών χρωμοσωμάτων και ενός ζεύγους φυλετικών και επιπλέον καθορίστηκαν ως ετερογαμετικά τα αρσενικά άτομα (Frizzi and Springetti, 1953; Krimbas 1963; Mavragani – Tshipidou et al, 1992). Η ανάλυση των μεταφασικών πολυταινικών χρωμοσωμάτων που προέρχονταν από τρεις διαφορετικούς προνυμφικούς ιστούς, του λιπώδους ιστού (Mavragani – Tshipidou et al, 1992), των σιελογόνων αδένων και των

μαλπιγγειανών σωληναρίων (Zampetaki et al, 1995) και η διαθεσιμότητα των φωτογραφικών χαρτών τους αποτέλεσαν σημαντικά κυτταρογενετικά δεδομένα για την περαιτέρω αξιοποίηση τους σε τεχνικές όπως η υβριδοποίηση *in situ*.



Εικόνα 9. Φωτογραφικοί χάρτες των δεξιών (R) και αριστερών (L) βραχιόνων των πολυταινικών χρωμοσωμάτων (I – V) των σιελογόνων αδένων του *B. oleeae*.

Η εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου στα πολυταινικά του χρωμοσώματα έδωσε τη δυνατότητα χαρτογράφησης 10 αλληλουχιών DNA (εννιά ετερόλογων δεικτών από την *C. capitata* και ενός από τη *D. melanogaster*) ώστε να είναι πλέον διαθέσιμοι μοριακοί δείκτες για όλα τα σωματικά χρωμοσώματα (Zampetaki et al, 1999). Με τον τρόπο αυτό έγινε εφικτή η συσχέτιση γενετικών και μοριακών πληροφοριών στα στελέχη του εντόμου καθώς και ο καθορισμός ομολογιών (φυλογενετικών σχέσεων) με άλλα είδη της οικογένειάς του. Πεδίο έρευνας αποτέλεσε ακόμη και η απόκριση του δάκου στο περιβαλλοντικό στρες. Οι μελέτες, που επικεντρώθηκαν στο πρότυπο των θερμοεπαγόμενων διογκώσεων που προκαλούνται στα χρωμοσώματα, οδήγησαν στην χαρτογράφηση γονιδίων θερμικού σοκ (Zampetaki et al, 2000). Πρόσφατες προσεγγίσεις είχαν σαν αποτέλεσμα την κατασκευή μιας γενωμικής και δύο cDNA βιβλιοθηκών που προέρχονταν από

ενήλικα άτομα δάκου και των δύο φύλων και την κλωνοποίηση των γονιδίων φυλοκαθορισμού (*sex lethal, double sex*) (Lagos et al, 2005). Επιπλέον, απομονώθηκαν και χαρακτηρίστηκαν 64 αλληλουχίες μικροδορυφορικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν σε αναλύσεις της πληθυσμιακής δομής και της γενετικής ροής Μεσογειακών πληθυσμών του εντόμου, καθώς και στη διερεύνηση της πορείας εξάπλωσής του στη λεκάνη της Μεσογείου (Augustinos et al, 2005). Επίσης, αξίζει να σημειωθεί η απομόνωση του γονιδίου της αλκοολικής δεϋδρογονάσης (*Adh*) μετά από κλωνοποίησή του σε κύτταρα ζύμης, καθώς ο γονιδιακός αυτός τύπος μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης σε πειράματα μετασχηματισμού του εντόμου (Benos et al, 2000). Τέλος, χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερης σημασίας η επίτευξη του γενετικού μετασχηματισμού του δάκου με χρήση του μεταθετού στοιχείου *Minos* (Koukidou et al, 2006).

Ωστόσο εξακολουθούν να παραμένουν αδιευκρίνιστα πολλά στοιχεία που συνθέτουν τη βιολογία και τη γενετική του εντόμου, με μελλοντικές μελέτες να εστιάζουν τόσο στην κλασσική όσο και στη μοριακή γενετική του. Για την ανάπτυξη μεθόδων γενετικού ελέγχου, ιδιαίτερης σημασίας κρίνεται η καλλιέργεια εργαστηριακών στελεχών που θα χαρακτηρίζονται από φαινοτυπικούς και βιοχημικούς δείκτες αλλά και μεταλλάξεις. Τα δεδομένα αυτά πρόκειται να διευκολύνουν περαιτέρω τις κυτταρογενετικές αναλύσεις στο γονιδίωμα του δάκου, συμπεριλαμβάνοντας τη δημιουργία φυσικών χαρτών λόγω της ύπαρξης πολυταινικών χρωμοσωμάτων, που επιτρέπουν τον καθορισμό της θέσης γονιδίων με πολλαπλούς μοριακούς δείκτες μέσω της *in situ* υβριδοποίησης.

1.3. Πολυταινικά χρωμοσώματα , υβριδοποίηση *in situ*

Σε ορισμένους ιστούς (π.χ. σιελογόνοι αδένες) των προνυμφών των Δίπτερων εντόμων, οι μεσοφασικοί πυρήνες περιέχουν χρωμοσώματα χαρακτηριστικής μορφολογικής κατασκευής που χαρακτηρίζονται από τη μεγάλη διάμετρο αλλά και το μήκος τους. Καθένα από τα χρωμοσώματα αυτά δημιουργείται από διαδοχικές φάσεις αντιγραφής ενός διπλοειδούς ζεύγους που βρίσκεται σε σύναψη. Τα αντίγραφα των χρωμονημάτων δε

διαχωρίζονται αλλά παραμένουν συνδεδεμένα μεταξύ τους σε εκτεταμένη μορφή, σε αντίθεση με τη συμπυκνωμένη κατάσταση της μεσοφασικής χρωματίνης ή των μιτωτικών χρωμοσωμάτων. Για το λόγο αυτό τα χρωμοσώματα που προκύπτουν σύμφωνα με την παραπάνω διαδικασία ονομάζονται πολυταινικά. Το γεγονός ότι κάθε χρωμοσωμικό νημάτιο πιθανόν να αντιστοιχεί σε ένα μονό, απλοειδές χρωμόσωμα, αντικατοπτρίζει τον βαθμό πολυταινίας, δηλαδή τον αριθμό των χρωμοσωμάτων που περιέχουν αυτά τα γιγαντιαία χρωμοσώματα. Κάθε πολυταινικό χρωμόσωμα αποτελείται από μια ορατή διαδοχή ζωνών (δεσμικών περιοχών) που αντιστοιχούν στα χρωμομερή. Οι ζώνες συνιστούν το μεγαλύτερο μέρος της μάζας του DNA και χρωματίζονται έντονα με κατάλληλα αντιδραστήρια. Οι περιοχές ανάμεσά τους βάζονται πιο ελαφρά και ονομάζονται διαζωνικές (μεσοδεσμικές) περιοχές. Με αυτό τον τρόπο η εναλλασσόμενη σειρά ζωνών και διαζωνικών περιοχών δημιουργεί μια γραμμική διαφοροποίηση φωτεινότητας. Τα κεντρομερή των πολυταινικών χρωμοσωμάτων συναθροίζονται για να σχηματίσουν μια χαρακτηριστική δομή, το χρωμόκεντρο, το οποίο αποτελείται κυρίως από ετεροχρωματίνη. Επιπλέον, κατά μήκος των πολυταινικών χρωμοσωμάτων ορισμένες ζώνες μεταπίπτουν παροδικά σε μια ιδιαίτερη κατάσταση, στην οποία η χρωματίνη προβάλλει από τον άξονα του χρωμοσώματος σχηματίζοντας χαρακτηριστικές δομές που ονομάζονται διογκώσεις. Κάθε διογκωση αποτελείται από μια περιοχή στην οποία τα χρωμοσωμικά νημάτια είναι λιγότερο περιελιγμένα απ' ό,τι κατά τη συνηθισμένη στοίχισή τους σε ζώνες και αντιστοιχούν σε θέσεις σύνθεσης RNA, δηλαδή σε ενεργά γονίδια (Lewin, 2004; Τριανταφυλλίδης, 2001).

Ο αριθμός, η θέση και η κατανομή των διαφόρων δεσμικών περιοχών σε κάθε πολυταινικό χρωμόσωμα, χαρακτηρίζει το είδος, τον ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο. Έτσι, ενώ το πρότυπο των ζωνών είναι χαρακτηριστικό για κάθε στέλεχος ενός είδους, ο αριθμός των διπλασιασμών διαφέρει μεταξύ των ιστών του. Ο σταθερός αριθμός και η γραμμική διευθέτηση των ζωνών παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1930 σε στελέχη της *D. melanogaster*, όταν ανακαλύφθηκε ότι σχηματίζουν έναν κυτταρολογικό χάρτη των χρωμοσωμάτων. Οι αναδιατάξεις – όπως ελλείμματα, αναστροφές και διπλασιασμοί – έχουν ως συνέπεια την αλλαγή της γραμμικής διάταξης των

ζωνών, η οποία αντιστοιχεί στη γραμμική διάταξη των γονιδίων. Έτσι, οι γενετικές αναδιατάξεις, όπως φαίνονται σε ένα χάρτη σύνδεσης, είναι δυνατόν να συσχετιστούν με μορφολογικές αναδιατάξεις στον κυτταρολογικό χάρτη. Τελικά, μια συγκεκριμένη μετάλλαξη μπορεί να εντοπιστεί σε μια συγκεκριμένη ζώνη (Lewin, 2004).

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα αποδείχθηκαν σημαντικά εργαλεία στα χέρια των γενετιστών από τη στιγμή της ανακάλυψής τους στους ιστούς της *Drosophila* και άλλων διπτέρων. Σήμερα, αν και έχουν δημιουργηθεί πολυταινικοί χρωμοσωμικοί χάρτες για περίπου 270 στελέχη της *Drosophila* και 250 άλλα είδη της οικογένειας των διπτέρων (Ashburner et al, 1992), μόνο ένα μικρό ποσοστό από αυτούς είναι ικανοποιητικής ποιότητας ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε γενετικές μελέτες. Η σημασία των πολυταινικών χρωμοσωμάτων στη γενετική έγκειται στην δυνατότητα αξιοποίησης των χαρακτηριστικών τους μέσω πολλαπλών χρήσεων όπως: (i) στην ανάλυση της διευθέτησης των χρωμοσωμάτων οργανισμών – μοντέλων, όπως η *Drosophila*, συνεισφέροντας στην περαιτέρω ανάπτυξη της γενετικής τους, (ii) στον προσδιορισμό φυλογενετικών σχέσεων ανάμεσα σε κοντινά συγγενικά είδη εφόσον παρουσιάζουν ομοιότητες στους χάρτες των πολυταινικών τους χρωμοσωμάτων, (iii) στο διαχωρισμό μελών μεταξύ συμπλεγμάτων αδελφών ειδών, δρώντας διαγνωστικά, (iv) στον ακριβή προσδιορισμό κάθε κλωνοποιημένης αλληλουχίας DNA πάνω σε περιοχές των πολυταινικών χρωμοσωμάτων μέσω της *in situ* υβριδοποίησης (Γαριού – Παπαλεξιού et al, 2002).

Όσον αφορά τα πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου, αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά το 1963 (Krimbas) 10 πολυταινικοί βραχίονες μεγάλου μήκους και δύο πολύ μικρότεροι. Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτής της περιγραφής ήταν δύσκολο να χρησιμοποιηθούν σε κυτταρογενετικές μελέτες. Νέα ώθηση στο επίπεδο αυτό δόθηκε τρεις δεκαετίες αργότερα, όταν ήταν πλέον διαθέσιμοι φωτογραφικοί χάρτες διαφορετικής ιστικής προέλευσης. Από την χαρτογράφηση των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του λιπώδους ιστού (Mavragani – Tsiplidou et al, 1992), των σιελογόνων αδένων και των μαλπιγγειανών σωληναρίων (Zampetaki et al, 1995) και ακολούθως την ανάλυση τους, διαπιστώθηκε η ύπαρξη πέντε χρωμοσωμάτων (καθένα από

τα οποία περιλαμβάνει δύο βραχίονες) που παρουσιάζουν αντιστοιχία με τα πέντε αυτοσωμικά χρωμοσώματα των πυρήνων της μίτωσης και μια δομή ετεροχρωματίνης που αντιστοιχεί στα φυλετικά χρωμοσώματα. Η δομή αυτή είναι δυνατό να διαφέρει σε μέγεθος και πυκνότητα, χαρακτηριστικά που μπορεί να λειτουργήσουν διαχωριστικά στην περίπτωση των δύο φύλων, καθώς στα θηλυκά εμφανίζεται μεγαλύτερη και περισσότερο συμπαγής, ενώ στα αρσενικά ισχύουν τα αντίθετα δεδομένα (Zampetaki et al, 1995). Άλλα χαρακτηριστικά των πολυταινικών χρωμοσωμάτων που ανέδειξαν οι έρευνες ήταν η σταθερότητα του ζωνικού προτύπου μεταξύ διαφορετικών ιστών του ίδιου στελέχους, η απουσία ενός τυπικού χρωμόκεντρου (ως συσσώρευση ετεροχρωματίνης) εξασφαλίζοντας έτσι τον διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων, η ύπαρξη αντίστροφων διαδοχικών διπλασιασμών καθώς και η παρουσία δακτυλιοειδών άκρων στους χρωμοσωμικούς βραχίονες (Mavragani – Tsiplidou, 2002).

1.4. Χαρτογράφηση χρωμοσωμάτων και Γενετικοί δείκτες

Ο χαρακτηρισμός του περιεχομένου ενός χρωμοσώματος ουσιαστικά αναφέρεται στη δημιουργία ενός χάρτη. Η χαρτογράφηση επιτρέπει την ταυτοποίηση μεμονωμένων γονιδίων και τον προσδιορισμό της αλληλουχίας τους, αλλά και ολόκληρων γονιδιωμάτων. Δύο είναι οι κύριες κατηγορίες χαρτών, οι γενετικοί και οι φυσικοί, που διαφέρουν τόσο στις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τη διάταξη των γονιδίων όσο και στα αποτελέσματα που εξάγονται σχετικά με τον καθορισμό των αποστάσεων μεταξύ τους. Επιπλέον, ανάλογα με τα επιθυμητά επίπεδα ανάλυσης είναι δυνατό να κατηγοριοποιηθούν περαιτέρω (Casey, 1992).

Ένας **γενετικός χάρτης** ή χάρτης σύνδεσης απεικονίζει τη σχετική απόσταση ανάμεσα σε γονίδια και/ή πολυμορφικούς δείκτες πάνω στο γονιδίωμα των χρωμοσωμάτων, με βάση τη σχετική συχνότητα του μεταξύ τους ανασυνδυασμού. Η απόσταση δύο γενετικών τόπων καθορίζεται γενετικά σε μονάδες centimorgans (cM) βάσει των αποτελεσμάτων από μελέτες γενετικής σύνδεσης. Δύο γονίδια απέχουν 1 cM, αν υπάρχει 1%

πιθανότητα ανασυνδυασμού μεταξύ τους σε μια μειωτική διαίρεση (Gelehrter et al, 2003). Ένας γενετικός χάρτης μπορεί να περιλαμβάνει τόσο γονοτυπικούς όσο και φαινοτυπικούς δείκτες, αρκεί αυτοί να είναι πολυμορφικοί. Ο όρος γενετικός πολυμορφισμός αναφέρεται στην ταυτόχρονη ύπαρξη πολλαπλών αλληλομόρφων ενός γενετικού τόπου στα άτομα ενός πληθυσμού, με συχνότητα εμφάνισης >1%. Ο πολυμορφισμός μπορεί να παρατηρηθεί σε επίπεδο φαινοτύπου, αν επηρεάζει μια γονιδιακή λειτουργία, σε επίπεδο τμημάτων περιορισμού (RFLPs, AFLPs), αν επηρεάζει μια θέση – στόχο ενός ενζύμου περιορισμού, καθώς και σε επίπεδο αλληλουχίας (VNTRs, Microsatellites, SNPs), με απευθείας ανάλυση της αλληλουχίας του DNA (Lewin, 2004). Οι πολυμορφισμοί μήκους τμημάτων περιορισμού (**RFLPs**, Restriction Fragment Length Polymorphisms) αφορούν τις κληρονομούμενες διαφορές στην αλληλουχία του DNA που αντιστοιχούν σε θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού. Οι ποικιλομορφίες αυτές μπορεί να προκύπτουν από απλές σημειακές μεταλλάξεις που δημιουργούν ή/και καταστρέφουν θέσεις περιορισμού και ανιχνεύονται μέσω ηλεκτροφόρησης από τη διαφορά μεγέθους των τμημάτων DNA που παράγονται κατά την πέψη με τα αντίστοιχα ένζυμα περιορισμού. Η τυχαία κατανομή των πολυμορφικών θέσεων περιορισμού στο γονιδίωμα και η μεγάλη συχνότητα με την οποία απαντώνται τα καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμα στη γενετική χαρτογράφηση. Οι τεχνικές ανάλυσης των **AFLPs** (Amplified Fragment Length Polymorphisms) στηρίζονται στην PCR – ενίσχυση αλληλουχιών DNA που προηγουμένως έχουν υποστεί πέψη με κατάλληλα ένζυμα περιορισμού, ώστε να δημιουργηθούν συμβατά άκρα με μικρές ακολουθίες συνδέτες, προς τις οποίες έχουν σχεδιαστεί ομόλογοι εκκινητές για την αντίδραση PCR. Επιπλέον, στις τεχνικές αυτές δεν απαιτούνται πληροφορίες για την αλληλουχία DNA που μελετάται. Οι πολυμορφισμοί μονού νουκλεοτιδίου (**SNPs**, Single Nucleotide Polymorphisms) είναι πολυμορφικές θέσεις του γονιδιώματος που αντανακλούν την ποικιλομορφία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των αλληλομόρφων και οφείλονται σε διαφορές ενός μόνο νουκλεοτιδίου από άτομο σε άτομο. Οι πολυμορφισμοί SNP ευθύνονται για την πλειοψηφία των γενετικών πολυμορφισμών μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού και μπορούν να προσδιοριστούν με διάφορους τρόπους, όπως με απευθείας σύγκριση αλληλουχιών, με φασματοσκοπία

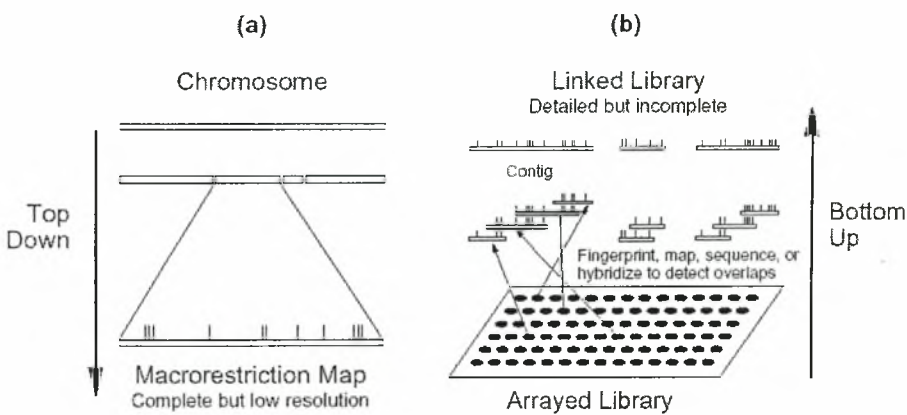
μάζας ή βιοχημικές μεθόδους που ανιχνεύουν διαφορές σε πολυμορφικές θέσεις εντός μιας συγκεκριμένης περιοχής (SSCP). Επιπλέον, σημαντικό εργαλείο στα χέρια των γενετιστών για τις μελέτες πολυμορφισμών του γενώματος ενός είδους απόδειχθηκε η χρήση ολιγονουκλεοτιδίων. Το γονιδίωμα των θηλαστικών χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη αλληλουχιών που αποτελούνται από διαδοχικές επαναλήψεις μιας μικρής μονάδας νουκλεοτιδίων και ονομάζονται εν σειρά επαναλήψεις μεταβλητού αριθμού (**VNTRs**, Variable Number of Tandem Repeats). Οι αλληλουχίες αυτές είναι ιδιαίτερα ασταθείς και επιρρεπείς στις μεταλλάξεις καθώς εντοπίζονται σε μη κωδικοποιητικές περιοχές, γι' αυτό και όπως διαπιστώθηκε, παρουσιάζουν μεγάλη γενετική ποικιλότητα. Το γεγονός αυτό τους καθιστά χρήσιμους δείκτες σε μελέτες χαρτογράφησης και πληθυσμιακών αναλύσεων. Επίσης, μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού εμφανίζεται μεγάλο ποσοστό ετεροζυγωτίας, ενώ είναι δυνατό να εντοπιστούν αλληλόμορφα που διαφέρουν ως προς τον αριθμό των επαναλήψεων της επαναλαμβανόμενης μονάδας. Ανάλογα με το μήκος των αλληλουχιών που επαναλαμβάνονται οι VNTRs διαχωρίζονται στους μικροδορυφόρους (<10 bp) και τους μινιδορυφόρους (~10-100 bp). Οι μικροδορυφόροι συγκεντρώνουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της συχνής εμφάνισής τους στα γονιδιώματα, της μεγάλης επαναληψιμότητάς τους, του Μεντελικού τρόπου κληρονόμησης, αλλά και της εύκολης απομόνωσής τους από τις γονιδιωματικές βιβλιοθήκες (Lewin, 2004).

Η **φυσική χαρτογράφηση** παρέχει τις πραγματικές αποστάσεις μεταξύ γονιδίων ή/και δεικτών κατά μήκος ενός χρωμοσώματος, όπως αυτές καθορίζονται από φυσικές τεχνικές. Οι φυσικοί χάρτες, ανάλογα με το βαθμό ανάλυσης που εξασφαλίζουν, διαιρούνται σε δύο κατηγορίες: τους χάρτες χαμηλής και υψηλής ανάλυσης (Casey, 1992).

Στην πρώτη περίπτωση συμπεριλαμβάνονται οι χρωμοσωμικοί και οι cDNA χάρτες. Οι χρωμοσωμικοί ή κυτταρογενετικοί χάρτες βασίζονται στον προσδιορισμό της θέσης γονιδίων ή τμημάτων DNA πάνω σε ένα χρωμόσωμα, σύμφωνα με το διακριτό πρότυπο ζωνών που δημιουργείται μέσω της *in situ* υβριδοποίησης. Οι cDNA χάρτες ή χάρτες γονιδίων καθορίζουν την θέση εξονίων σε χρωμοσωμικούς χάρτες, καθώς η κατασκευή τους στηρίζεται στον εντοπισμό αλληλουχιών cDNA, γνωστών ως *expressed*

sequence tags (ESTs), πάνω στα χρωμοσώματα. Για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιούνται ως δείκτες τα sequence tagged sites (STS), τα οποία περιλαμβάνουν μια αλληλουχία PCR εκκινήτων (~ 20 bp) που ενισχύουν ένα μοναδικό τμήμα του γονιδιώματος. Με τον τρόπο αυτό παρέχεται η δυνατότητα προσδιορισμού γονιδίων, εφόσον κάθε θέση σε έναν cDNA χάρτη αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό γονίδιο (Casey, 1992).

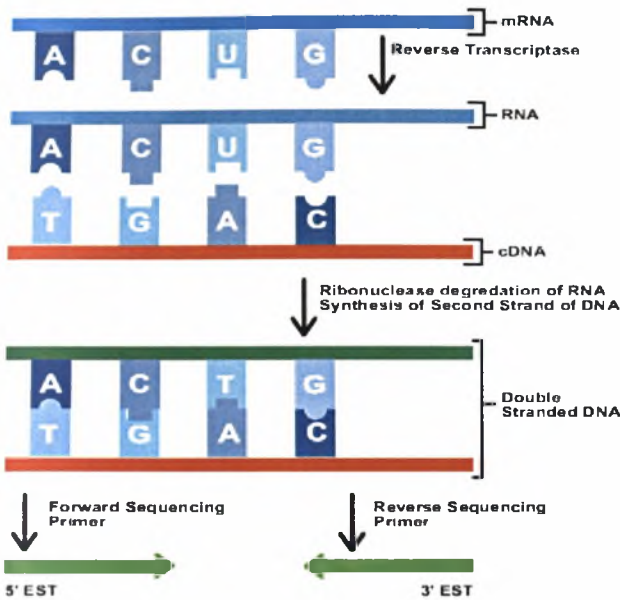
Όσον αφορά την χαρτογράφηση υψηλής ανάλυσης, σ' αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι μακροπεριοριστικοί και οι contig χάρτες. Η πρώτη κατηγορία αναφέρεται στον καθορισμό της θέσης και της απόστασης μεταξύ τμημάτων που έχουν προκύψει από πέψη με ένζυμα περιορισμού, ενώ η δεύτερη στον καθορισμό της θέσης (σειράς) αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων DNA (Casey, 1992).



Εικόνα 10. Τεχνικές φυσικής χαρτογράφησης υψηλής ανάλυσης. (a) Μακροπεριοριστικοί και (b) contig χάρτες.

Τέλος, ως ο υψηλότερης ανάλυσης φυσικός χάρτης χαρακτηρίζεται ο χάρτης αλληλουχίας, ο οποίος θα παρέχει την ακριβή σειρά των βάσεων του DNA στα χρωμοσώματα.

1.5. Expressed sequence tags (ESTs)



Εικόνα 11. Διαδικασία δημιουργίας των ESTs.

Για την ταυτοποίηση αλλά και τη χαρτογράφηση γονιδίων αποδείχθηκε ιδιαίτερα σημαντική η χρήση δεικτών, που αντιστοιχούν σε τμήματα DNA με δυνατότητα έκφρασης. Στην κατηγορία αυτή συμπεριλαμβάνονται τα expressed sequence tags (ESTs), τα οποία είναι cDNA αλληλουχίες που αντιπροσωπεύουν ένα γονίδιο μερικώς ή στο σύνολό του. Τα

ESTs είναι μικρές αλληλουχίες που προκύπτουν από τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής του 5' ή/και του 3' άκρου τμημάτων cDNA τυχαίας επιλογής. Ο ρόλος τους ως δείκτες (tags) στην ανίχνευση γονιδίων εντοπίζεται στην ικανότητά τους να προσδένονται συμπληρωματικά σε μοναδικές περιοχές του γονιδιώματος. Η αποτελεσματικότητά τους περιορίζεται ανάλογα με το είδος του οργανισμού, το μέγεθος του γενώματος αλλά του ίδιου του EST, καθώς επίσης την παρουσία ιντρονίων που παρεμβάλλονται μεταξύ των περιοχών του γονιδίου (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html>).

Οι δείκτες EST συνιστούν σημαντικά εργαλεία στα χέρια των γενετιστών λόγω της γρήγορης και ανέξοδης παραγωγής τους, αλλά και της ευκολίας χρήσης τους, καθώς δεν απαιτείται ο έλεγχος της αλληλουχίας τους για την ύπαρξη τυχόν λαθών. Έχουν τη δυνατότητα να παρέχουν πολύτιμες πληροφορίες σχετικά με τη λειτουργία των γονιδίων που αντιπροσωπεύουν, εφόσον είναι δυνατή η σύγκρισή τους με ήδη γνωστές αλληλουχίες που είναι αποθηκευμένες στις βάσεις δεδομένων, ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν με ικανοποιητικά αποτελέσματα στις μελέτες χαρτογράφησης των γονιδιωμάτων των οργανισμών, καθορίζοντας τις θέσεις των γονιδίων στα χρωμοσώματα. Η ανάλυση των EST δεικτών μπορεί να συμβάλει επίσης στον προσδιορισμό των μεταγραφόμενων περιοχών του γονιδιώματος, μέσω του καθορισμού των

ορίων μεταξύ εξονίων και ιντρονίων. Επιπλέον, λόγω της συντηρημένης αλληλουχίας τους, επιτρέπουν τη σύγκριση μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, διευκολύνοντας έτσι μελέτες σε επίπεδο φυλογενετικών σχέσεων, αναπτυξιακό και εξελικτικό (Matthews et al, 2001).

1.6. Σκοπός εργασίας

Η εργασία που διεκπεραιώθηκε είχε σαν στόχο την κυτταρογενετική χαρτογράφηση του γονιδιώματος του δάκου, *Bactrocera oleae*. Για τον σκοπό αυτό κλώνοι που απομονώθηκαν από τη cDNA βιβλιοθήκης του δάκου χαρτογραφήθηκαν μέσω της *in situ* υβριδοποίησης στους βραχίονες των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του εντόμου. Οι κλώνοι αυτοί αποτελούν έναν EST (expressed sequence tags) κυτταρογενετικό χάρτη του δάκου. Επιπλέον ο καθορισμός της αλληλουχίας των κλώνων αυτών έδωσε τη δυνατότητα σύγκρισής τους με άλλες ήδη γνωστές αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων, ώστε σύμφωνα με τις παρατηρούμενες ομολογίες να πιθανολογηθεί η λειτουργία των αντίστοιχων γονιδίων.

2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια *in vitro* τεχνική που επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό μιας μικρής αλληλουχίας DNA από ένα πολύπλοκο μίγμα. Η χρήση δύο πλευρικών ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (5' και 3' primers), μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους επιμήκυνσής τους με τη βοήθεια μιας ειδικής DNA πολυμεράσης, παρέχει τελικά την εκλεκτική ενίσχυση ενός τμήματος DNA. Η εκλεκτικότητα συνεπάγεται του σχεδιασμού των εκκινητών, που βασίζεται στις γνωστές αλληλουχίες εκατέρωθεν της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί, ώστε να είναι ειδικοί προς αυτή. Έτσι καθορίζονται τα άκρα του επιθυμητού τμήματος. Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται είναι βακτηριακής προέλευσης εφόσον απομονώνεται από το θερμοφιλο *Thermus aquaticus* (Taq πολυμεράση) γεγονός που της προσδίδει ανθεκτικότητα σε υψηλές θερμοκρασίες (έως 95°C). Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί το στάδιο της αντιγραφής από την πολυμεράση είναι απαραίτητη η προσθήκη διαλύματος 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζινουκλεοτιδίων (dNTPs), το ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου καθώς και διάλυμα ιόντων Mg^{2+} , ενώ για την συμπλήρωση του τελικού όγκου προστίθεται αποστειρωμένο H_2O . Οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι αποδιάταξης, ένωσης και αντιγραφής από την πολυμεράση πραγματοποιούνται σε ειδική PCR συσκευή, γνωστή ως θερμικός κυκλοποιητής, που προγραμματίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ως αποτέλεσμα της διαδικασίας, η αρχική αμελητέα ποσότητα του DNA αυξάνεται εκθετικά, αφού διπλασιάζεται στο τέλος κάθε κύκλου. Με τον τρόπο αυτό μετά την ολοκλήρωση η κύκλων η αρχική αλληλουχία θα έχει πολλαπλασιαστεί 2^n φορές, δηλαδή θα έχουν συντεθεί περίπου 2^n νέα δίκλινα μόρια DNA.

☒ Η διαδικασία περιλαμβάνει τρία διακριτά στάδια που επαναλαμβάνονται κυκλικά (30-40 κύκλοι χωρίς ενδιάμεση ανανέωση αντιδραστηρίων) ως εξής.

- i. Αφού αναμειχθούν όλα τα συστατικά, η αντίδραση ξεκινά με θέρμανση του δείγματος στους 93-95°C για λίγα λεπτά ώστε να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation).

- ii. Ακολούθως, η θερμοκρασία μειώνεται μεταξύ 50-70°C (ανάλογα με τη θερμοκρασία τήξης – T_m – των αλυσίδων που αναμένονται να σχηματιστούν) και οι εκκινητές υβριδοποιούνται στις συμπληρωματικές τους αλληλουχίες στο συνολικό μίγμα του DNA (annealing). Συνήθως η κατάλληλη θερμοκρασία σύνδεσης των εκκινητών υπολογίζεται με αρνητική απόκλιση 5°C από το αναμενόμενο T_m .
- iii. Τελικά η πολυμεράση ξεκινά να συνθέτει μια αλυσίδα από το τέλος κάθε εκκινητή, χρησιμοποιώντας το αρχικό DNA ως μήτρα (DNA synthesis). Η θερμοκρασία σταθεροποιείται στους 72°C έως ότου ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός από τη δράση του ενζύμου.

Αντιδραστήρια

Για αντίδραση τελικού όγκου 25 μl χρησιμοποιήθηκαν:

- 2 μl φαγικό DNA (~50 ng)
- 2.5 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (10X buffer)
- 1.5 μl διάλυμα $MgCl_2$ (25 mM)
- 2 μl dNTPs (2.5 mM/ dNTP)
- 1.5 μl εκκινητής T3 (10 pmol/ μl)
- 1.5 μl εκκινητής T7 (10 pmol/ μl)
- 0.2 μl Taq πολυμεράση (5 u/ μl)
- 13.8 μl ddH₂O

Συνθήκες θερμικού κυκλοποιητή ("PCR Sprint Thermal Cycler", Thermo Electron Corporation)

Στάδιο PCR	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αποδιάταξη αρχικού DNA	97°C	4 min	1
Αποδιάταξη DNA	94°C	45 sec	30
Υβριδισμός εκκινητών	40°C	1 min	
Πολυμερισμός αλυσίδων	72°C	2 min	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	10 min	1

2.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση (προσδιορισμός μεγέθους) και τον καθαρισμό τμημάτων DNA χρησιμοποιείται η μέθοδος της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης. Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην ικανότητα μετακίνησης των γραμμικών δίκλωνων μορίων DNA σε ένα ηλεκτρικό πεδίο, σύμφωνα με το φορτίο και το μέγεθός τους. Η ηλεκτροστατική δύναμη που αναπτύσσεται λόγω του ηλεκτρικού πεδίου κατευθύνει τα αρνητικά φορτισμένα μόρια προς τα ηλεκτρόδια της ανόδου της ηλεκτροφορητικής συσκευής, με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους. Ένας άλλος περιοριστικός παράγοντας της ταχύτητας μετακίνησης των μορίων, είναι το μέγεθος των πόρων της πηκτής. Συνδυαστικά, όσο μεγαλύτερα είναι τα μόρια τόσο πιο αργά μετακινούνται διαμέσου μικρών πόρων. Η συγκέντρωση της αγαρόζης (φυτικός πολυσακχαρίτης) που χρησιμοποιείται καθορίζει το μέγεθος των πόρων της πηκτής και συνεπώς ποικίλει ανάλογα με το μέγεθος του DNA που θέλουμε να διαχωρίσουμε και να ανιχνεύσουμε. Χρησιμοποιώντας πηκτώματα συγκέντρωσης αγαρόζης 1% επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός τμημάτων μεγέθους 0.5-5 kb. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης από την ένταση του ρεύματος που παρέχεται, με αποτέλεσμα να μειώνεται η αξιοπιστία και η διαχωριστική ικανότητα των πηκτωμάτων αγαρόζης όταν αυξάνεται η τάση (volts) που εφαρμόζεται. Οι ζώνες του DNA που προκύπτουν από τον διαχωρισμό χρωματίζονται ώστε να είναι ορατές. Η μέθοδος χρώσης του DNA συνίσταται σε έκθεσή του σε μικρές συγκεντρώσεις μιας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου, που παρεμβάλλεται ανάμεσα στις βάσεις του DNA και φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως. Το πρότυπο των ζωνών που δημιουργείται επιτρέπει τον προσδιορισμό του μεγέθους αλλά και της ποσότητας των τμημάτων μετά από σύγκρισή τους με τους μάρτυρες του μοριακού βάρους (ladders).

Διαλύματα – Υλικά

- Αγαρόζη
- Διάλυμα TBE Buffer 0.5X
- Βρωμιούχο αιθίδιο

- Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων
- Δείγματα DNA
- Μάρτυρας (DNA ladder)

Μεθοδολογία

☞ Παρασκευή πηκτώματος (gel) αγαρόζης 1%

1. Για την παρασκευή 40 ml gel, αναμιγνύονται 40 ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE 0.5X με 0.4 gr σκόνη αγαρόζης.
2. Το διάλυμα θερμαίνεται με διαδοχικές ανακινήσεις μέχρις ότου διαλυθεί η αγαρόζη και γίνει διαυγές.
3. Αφού κρυώσει λίγο ώστε η θερμοκρασία του να είναι περίπου 50°C, προσθέτονται 1.2 ml βρωμιούχου αιθιδίου.
4. Το ζεστό διάλυμα της αγαρόζης μεταφέρεται στη στεγανοποιημένη βάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα μετά από χρονικό διάστημα 20 περίπου λεπτών (θερμοκρασία δωματίου). Στη βάση αυτή έχουν προηγουμένως τοποθετηθεί με κάθετη διεύθυνση “χτενάκια” που θα δώσουν τις ειδικές θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.
5. Όταν η αγαρόζη έχει πήξει εντελώς τα “χτενάκια” απομακρύνονται προσεκτικά και η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης μπορεί να αρχίσει.

☞ Ηλεκτροφόρηση

1. Αρχικά προετοιμάζονται τα δείγματα και οι μάρτυρες (ladders) μοριακού βάρους που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν, με την προσθήκη σε αυτά loading buffer 6X (1 ml ανά 6 ml δείγματος). Το διάλυμα φόρτωσης περιέχει μια μπλε χρωστική και φέρει αρνητικό φορτίο με αποτέλεσμα η κατεύθυνση μετακίνησής του να είναι προς το ηλεκτρόδιο της ανόδου, όμοια δηλαδή με εκείνη των μορίων του DNA. Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή την παρατήρηση της πορείας της διαδικασίας. Επιπλέον η ποσότητα γλυκερόλης που συμπεριλαμβάνεται στο διάλυμα εμποδίζει τη διάχυση των δειγμάτων διευκολύνοντας την φόρτωσή τους, καθώς αυξάνεται η πυκνότητα της σύστασής τους.

2. Το στερεοποιημένο πήκτωμα βυθίζεται με τη βάση στο εσωτερικό της ηλεκτροφορητικής συσκευής που έχει πληρωθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να καλύπτεται πλήρως και δείγματα – μάρτυρες φορτώνονται στις θέσεις εκκίνησης της καθόδου.
3. Στη συνέχεια συνδέονται τα ηλεκτρόδια της ηλεκτροφορητικής συσκευής με την συσκευή τροφοδότησης έτσι ώστε το θετικό ηλεκτρόδιο να βρίσκεται στην αντίθετη κατεύθυνση από τις θέσεις φόρτωσης και εφαρμόζεται τάση 90 V. Η διαδικασία ολοκληρώνεται μετά από περίπου 30 min.
4. Το πήκτωμα εκτίθεται σε υπεριώδη ακτινοβολία, οπότε είναι πλέον ορατό το πρότυπο των ζωνών του DNA που έχει προκύψει από τον διαχωρισμό.

2.4. Απομόνωση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Τα μόρια DNA που διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ανακτήθηκαν με χρήση του HiYield Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit της εταιρίας Yeastern Biotech. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προτείνεται στο εγχειρίδιο της εταιρείας.

Διαλύματα

- Διάλυμα DF
- Διάλυμα Wash (με αιθανόλη 100%)
- dd H₂O

Μεθοδολογία

1. Αρχικά απομονώνεται με προσοχή από το gel αγαρόζης η ζώνη που αντιστοιχεί στο επιθυμητό τμήμα DNA, ώστε να ελαχιστοποιηθεί ο περιττός όγκος του gel.
2. Το κομμάτι του gel τοποθετείται σε σωληνάκι eppendorf και προσδιορίζεται το βάρος του, εφόσον δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 300mg.

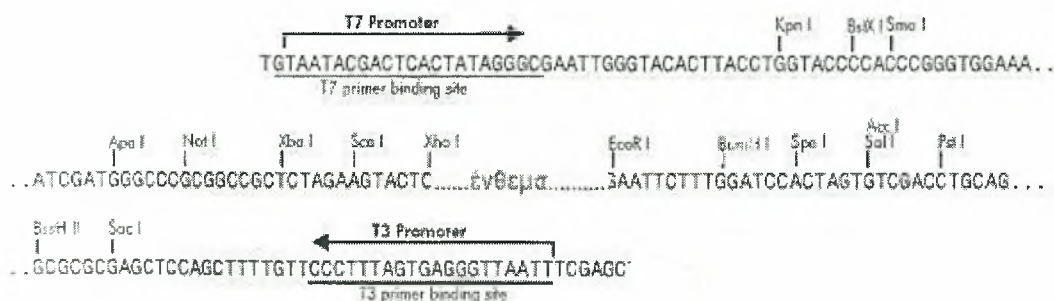
3. Προσθέτονται 500μl διαλύματος DF και το δείγμα αναδεύεται με τη βοήθεια vortex.
4. Το δείγμα επωάζεται στους 55°C για 10-15 min, με ταυτόχρονη ανάδευση στο vortex ανά τακτά χρονικά διαστήματα ώστε να επιτευχθεί η διάλυση του gel.
5. Προσθέτονται 800μl του δείγματος σε ειδική στήλη (DF Column) και κατόπιν αυτή τοποθετείται σε σωλήνα συλλογής.
6. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 30 sec στις 8.000 rpm.
7. Το έκλουσμα απομακρύνεται από τον σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη.
8. Προσθέτονται 500μl διαλύματος Wash και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 8.000 rpm για 30 sec.
9. Επαναλαμβάνεται το στάδιο 7.
10. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 2 min στις 13.2000 rpm.
11. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα ώστε στη συνέχεια να εκλουστεί το DNA. Οι χαμηλής ισχύος ιοντικές συνθήκες και το ελαφρώς αλκαλικό pH του απιονισμένου νερού και επιτρέπουν την έκλουση του.
12. Προσθέτονται στη στήλη 15 μl dd H₂O και επωάζεται για 2 min σε θερμοκρασία δωματίου για να αυξηθεί η απόδοση της έκλουσης.
13. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 2 min στις 13.2000 rpm.
14. Επανάληψη των σταδίων 12 και 13, ώστε ο τελικός όγκος της έκλουσης να είναι 30 μl.

2.5. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ειδικές ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν ειδικές περιοχές (μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες) κατά μήκος των αλληλουχιών του DNA, ακολουθώντας έναν επαναλήψιμο τρόπο πέψης. Φυσιολογικά οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες απομονώνονται από βακτήρια, στα οποία παρέχουν προστατευτικούς μηχανισμούς, έναντι της εισβολής των φαγικών σωματιδίων των ιών στο εσωτερικό τους. Ο βιολογικός τους ρόλος συνίσταται στην ικανότητά τους να αποικοδομούν ξένα μόρια DNA. Αντίθετα το DNA του ίδιου του κυττάρου αποφεύγει τη διάσπαση, γιατί οι θέσεις –

στόχοι των ενζύμων περιορισμού προστατεύονται λόγω της μεθυλίωσης που υφίστανται είτε από τα ίδια τα ένζυμα είτε από ειδικές μεθυλάσες που παράγονται σε συνδυασμό με αυτά. Τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα αναγνωρίζουν ειδικές παλίνδρομες αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και υδρολύουν έναν φωσφοδιεστερικό δεσμό σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα συμμετρίας. Τελικά, ανάλογα με τον τρόπο πέψης δημιουργούνται τμήματα DNA με συμπληρωματικά ή τυφλά άκρα. Για τη βελτιστοποίηση μιας αντίδρασης πέψης πρέπει να ληφθούν υπόψη παράγοντες όπως η ιονική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος και οι μονάδες ενεργότητας (units) του ενζύμου, που καθορίζουν την ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται σε αντίδραση συνολικού όγκου 20 μl για την υδρόλυση 1 μg λDNA σε μια ώρα στους 37°C.

Για τις αντιδράσεις πέψης φάγων μετά από καθαρισμό του προϊόντος PCR ενίσχυσης καθώς και των κλωνοποιημένων ενθεμάτων σε φορέα pUC19 χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα *Bam*HI (10 U/μl) και *Xba*I (10 U/μl), ενώ για την εξαγωγή του ενθέματος από ανασυνδυασμένα πλασμίδια pGEM T easy το ένζυμο *Eco*RI (10 U/μl). Η αρχική προσπάθεια για την ανάκτηση των κλώνων από τη φαγική βιβλιοθήκη πραγματοποιήθηκε με χρήση των ενζύμων *Eco*RI (10 U/μl) και *Xho*I (10 U/μl), των οποίων οι θέσεις κοπής εντοπίζονται εκατέρωθεν του ενθέματος. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που αναγνωρίζουν τα παραπάνω ένζυμα και οι αντίστοιχες θέσεις κοπής τους απεικονίζονται παρακάτω:



Εικόνα 14. Θέση εισαγωγής του ενθέματος εκατέρωθεν των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων *Eco*RI και *Xho*I στον πολυνδέτη του φορέα λZAP.

Αντιδραστήρια

- Δείγμα DNA
- Ένζυμο/α
- Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 10X
- dd H₂O

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι erppendorf τοποθετούνται διαδοχικά το DNA, το buffer, το ddH₂O και τελευταίο το ένζυμο. Κατά τη διάρκεια προετοιμασίας τους τα δείγματα, αλλά και τα αντιδραστήρια, διατηρούνται σε πάγο.
2. Το δείγμα που σχηματίζεται επωάζεται για μία ώρα στους 37°C.

Αντίδραση πέψης	Πλασμιδιακού DNA (pGEM) με <i>EcoRI</i>	Πλασμιδιακού DNA pUC19 με <i>BamHI / XbaI</i>	Απομόνωση DNA από gel με <i>Bam / XbaI</i>
DNA	3.0 μl	3.0 μl	30.0 μl
Buffer	1.5 μl	1.5 μl	3.0 μl
Ένζυμο	0.2 μl	0.2 μl / 0.2 μl	1.0 μl / 1.0 μl
ddH ₂ O	10.3 μl	10.1 μl	15.0 μl
Τελικός όγκος	15.0 μl	15.0 μl	50.0 μl

2.6. Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA (Ligation)

Η αντίδραση ligation καθιστά δυνατή την κλωνοποίηση της αλληλουχίας ενός γονιδίου σε κατάλληλους φορείς, όπως είναι τα πλασμίδια. Τα πλασμίδια είναι μικρά δίκλινα κυκλικά μόρια DNA που πολλαπλασιάζονται αυτόνομα στο εσωτερικό των βακτηριακών κυττάρων. Η ανάπτυξη της γενετικής μηχανικής κατέστησε αναγκαία την κατασκευή τεχνητών πλασμιδίων (με βάση τα φυσικά πλασμίδια) που φέρουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά. Τα τεχνητά

πλασμίδια, με μέγεθος γύρω στα 3000 ζεύγη βάσεων (3 Kb), περιέχουν ένα γονίδιο που προσδίδει αντοχή σε κάποιο κοινό αντιβιοτικό (π.χ. αμπικυλίνη) και μια αλληλουχία (polylinker) 100 περίπου νουκλεοτιδίων που περιλαμβάνει τις θέσεις αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού. Η αλληλουχία αυτή επιτρέπει την κλωνοποίηση στο πλασμίδιο τμημάτων DNA, με την προϋπόθεση ότι στα άκρα του τμήματος αυτού περιλαμβάνεται κάποια από τις περιοριστικές θέσεις του polylinker.

Ο γραμμικός φορέας (pBS-SK(+) ή PUC19) και το τμήμα που επιθυμούμε να κλωνοποιήσουμε – όπως έχουν προκύψει μετά από πέψη με ένα ή δύο κατάλληλα ένζυμα – επωάζονται με προσθήκη του ενζύμου T4 λιγάσης, η οποία συνδέει τα ελεύθερα άκρα τους. Η T4 λιγάση κωδικοποιείται από τον βακτηριοφάγο T4 και καταλύει τον σχηματισμό φωσφοδιεστερικών δεσμών μεταξύ της 3-OH' ομάδας και της 5-φωσφορικής ομάδας παρακείμενων νουκλεοτιδίων στα άκρα δίκλωνων μορίων DNA. Ακόμη, απαιτείται η προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος του ενζύμου και αποστειρωμένου H₂O για την συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης. Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης σύνδεσης τόσο τα εξωγενή τμήματα DNA όσο και τα πλασμίδια εμφανίζουν τάση επανακυκλοποίησης προς τον σχηματισμό τυχαίων ολιγομερών. Για το λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητος ο προσεκτικός προσδιορισμός των απαιτούμενων συγκεντρώσεων για τα δύο είδη DNA (ποσοτικοποίηση), ώστε να επιτευχθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα σύνδεσης. Η αναλογία μεταξύ της αλληλουχίας που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και του πλασμιδιακού φορέα καθορίστηκε 3:1. Επιπλέον η ποσότητα του ενθέματος που απαιτείται σε ng, εξαρτάται από το είδος του πλασμιδίου που χρησιμοποιείται κάθε φορά και υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{απαιτούμενη ποσότητα ενθέματος (ng)} = \frac{\text{ποσότητα φορέα (ng)} \times \text{μέγεθος ενθέματος (kb)}}{\text{μέγεθος φορέα (kb)}} \times \frac{3}{1}$$

Ωστόσο η ενζυμική πέψη του φορέα και του τμήματος DNA δεν απαιτείται να έχει προηγηθεί κατά τη χρήση του φορέα pGem T-easy. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται απευθείας το προϊόν της αντίδρασης PCR. Ο φορέας εμφανίζει στα 3' άκρα εκατέρωθεν της περιοχής εισαγωγής του ενθέματος μία βάση θυμίνης αντίστοιχα (3'-T overhangs). Η δομή αυτή αυξάνει την απόδοση της αντίδρασης, καθώς αποτρέπει την επανακυκλοποίηση του φορέα και

καθιστά δυνατή τη σύνδεση των προϊόντων PCR λόγω συμπληρωματικότητας της 3'πολύ-A ουράς που διαθέτουν από τη δράση του ενζύμου Taq πολυμεράση. Επιπλέον η ύπαρξη δύο θέσεων αναγνώρισης του περιοριστικού ενζύμου *EcoRI* επιτρέπει στη συνέχεια την απομόνωση του ενθέματος με την μοναδική εφαρμογή του ενζύμου.

Αντιδραστήρια

- Δείγμα DNA
- 0.5 μl πλασμιδιακός φορέας
- 1 μl T4 DNA λιγάση (1 U/μl)
- 1 μl buffer 1X
- ddH₂O

Μεθοδολογία

☒ Η ποσότητα του ενθέματος που απαιτείται σε ng, εξαρτάται από το είδος του πλασμιδίου που χρησιμοποιείται κάθε φορά και υπολογίζεται από τον τύπο:

1. Η ποσότητα αυτή τοποθετείται σε σωληνάκι erpendorf και διαδοχικά προστίθενται 0.5 μl πλασμιδιακού φορέα, 1 μl buffer 1X, το ddH₂O με τελευταία την προσθήκη 1 μl T4 DNA λιγάσης, για αντίδραση τελικού όγκου 10 μl. Η ποσότητα ddH₂O αντιστοιχεί σε αυτή που απαιτείται για να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης.
2. Ακολουθεί επώαση του δείγματος που σχηματίζεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα σε κατάλληλη θερμοκρασία. Ορισμένες από τις αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με overnight επώαση στους 4°C ή 16°C , ενώ οι υπόλοιπες με επώαση στους 22°C για μία ώρα. Κατά τη διάρκεια προετοιμασίας τους τα δείγματα διατηρούνται σε πάγο, όπως επίσης και τα αντιδραστήρια.

2.7. Μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων με ανασυνδυασμένα πλασμίδια

Μόρια cDNA μπορούν να κλωνοποιηθούν σε φορείς που επάγουν τη λειτουργική τους έκφραση σε ξενιστές όπως το βακτήριο *E.coli*. Τα βακτήρια αποτελούν ιδανικούς ξενιστές για τον πολλαπλασιασμό των μορίων DNA. Τα βακτηριακά κύτταρα είναι σε θέση να προσλαμβάνουν νουκλεϊκά οξέα σε μορφή ανθεκτική ως προς τη δράση νουκλεασών. Κατά τη διάρκεια της περιόδου αυτής (εκλειπτική φάση) γίνεται ο ανασυνδυασμός του DNA με ομόλογες αλληλουχίες στο βακτηριακό χρωμόσωμα. Μετά την ολοκλήρωσή του, η γενετική πληροφορία που έχει ενσωματωθεί μπορεί να εκφραστεί με αποτέλεσμα την εμφάνιση του λειτουργικού μετασχηματισμένου κυττάρου. Ο φυσικός μηχανισμός μετασχηματισμού απουσιάζει από το βακτήριο *E.coli*, γι' αυτό και η ικανότητα αυτή επάγεται τεχνητά με έκθεση των κυττάρων σε χλωριούχο ασβέστιο (CaCl_2) (προετοιμασία δεκτικών κυττάρων). Κατόπιν προστίθεται DNA – που σχηματίζει ένα σύμπλοκο φωσφορικού υδροξυλίου του ασβεστίου, ανθεκτικό στη δράση βακτηριο DNAσών – και το μίγμα εκτίθεται σε υψηλή θερμοκρασία, οπότε τα βακτηριακά κύτταρα μπορούν πλέον να ενσωματώσουν τα σύμπλοκα DNA. Μετά από καλλιέργεια σε πλούσιο θρεπτικό υλικό τα μεταβιβασμένα γονίδια εκφράζονται και τα μετασχηματισμένα βακτήρια επιλέγονται και εκφράζονται με στρώση σε τρυβλία που φέρουν επιλεκτικό θρεπτικό υλικό.

Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε, χρησιμοποιήθηκε ως ξενιστής το στέλεχος K12, με γενότυπο DH5α, του βακτηρίου *E.coli* και ως φορέας κλωνοποίησης τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν από τις αντιδράσεις σύνδεσης και φέρουν γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη. Η είσοδος του πλασμιδίου δημιουργεί μετασχηματισμένα βακτήρια με ανθεκτικότητα στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό. Ο polylinker στον οποίο έχει εισαχθεί το επιθυμητό ένθεμα, είναι ενσωματωμένος στο γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*). Παρουσία X-gal (5-bromo-4chloro-3indolyl-β-D-galactosidase) στο θρεπτικό μέσο, το προϊόν του γονιδίου *lacZ* συμβάλλει στην εμφάνιση χαρακτηριστικού μπλε χρώματος στις βακτηριακές αποικίες μέσω της διάσπασης του πρώτου. Η είσοδος του ενθέματος διακόπτει το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου *lacZ* και εμποδίζει την έκφρασή του, με

αποτέλεσμα το X-gal να μη διασπάται και οι αποικίες που περιέχουν το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο να εμφανίζονται άσπρες. Η παραπάνω διάκριση βρίσκει εφαρμογή στην επιλογή των μετασχηματισμένων βακτηρίων που περιέχουν τα ανασυνδυασμένα με το επιθυμητό ένθεμα πλασμίδια.

Αντιδραστήρια

- Τριβλία SOC άγαρ
- Θρεπτικό μέσο SOB
- Διάλυμα FSB
- Διάλυμα DMSO
- DNA (από αντίδραση ligation)
- Διάλυμα δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*
- Θρεπτικό μέσο SOC
- Τριβλία LB άγαρ/αμπικικιλίνη
- Διάλυμα X-gal (20 mg/ ml)
- Διάλυμα IPTG (200 mg/ ml)

Μεθοδολογία

✎ Προετοιμασία δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

1. Χρησιμοποιώντας έναν αποστειρωμένο μικροβιολογικό κρίκο επιστρώνεται τριβλίο SOB άγαρ με δείγμα πληθυσμού *E.coli* (από stock που διατηρείται σε συνθήκες -80°C) και επωάζεται για 16 ώρες στους 37°C .
2. Σε 2 ml υγρού θρεπτικού μέσου διαλύματος SOB ενοφθαλμίζεται μία αποικία και το μίγμα επωάζεται με ταυτόχρονη ανάδευση για 16 ώρες στους 37°C .
3. Η καλλιέργεια μεταφέρεται σε 50 ml διαλύματος SOB και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 2-3 ώρες. Παράλληλα ανά τακτά χρονικά διαστήματα (20-30 min) ελέγχεται η ανάπτυξη των κυττάρων, φωτομετρώντας ποσότητα της καλλιέργειας σε μήκος κύματος 600 nm ώστε η οπτική απορρόφησή της (OD) να κυμαίνεται μεταξύ 0.4-0.5, τιμή που αντιστοιχεί σε 10^8 κύτταρα/ ml καλλιέργειας.

4. Στη συνέχεια τα κύτταρα αφού μεταφερθούν σε σωλήνες 25 ml (polypropylene tubes, Falcon) διατηρούνται σε πάγο (0°C) για 10 λεπτά.
5. Τα κύτταρα ανακτούνται με φυγοκέντρωση στις 4000 rpm στους 4°C για 10 min.
6. Το υπερκείμενο αποχύνεται και το ίζημα αφήνεται για 1 min να στεγνώσει.
7. Το ίζημα αναδυσάλυεται σε 20 ml παγωμένου διαλύματος FSB και επωάζεται για 10 min στον πάγο.
8. Ακολουθεί επανάληψη των σταδίων 5 και 6.
9. Το ίζημα αναδιαλύεται με ελαφρύ vortex σε 4 ml παγωμένου διαλύματος FSB.
10. Για κάθε 4 ml αναδιαλυμένων κυττάρων προσθέτονται 140 μl DMSO (dimethyl sulfoxide), τα οποία αναμιγνύονται με ελαφριά ανακίνηση και αφήνονται στον πάγο για 15 min.
11. Προσθέτονται επιπλέον 140 μl DMSO και ακολουθεί ελαφριά ανάδευση.
12. Τέλος, τα κύτταρα μοιράζονται σε σωληνάκια erpendorf και διατηρούνται στους -80°C.

☒ Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων

1. Σε 200 μl κυττάρων *E. coli* προστίθενται 10μl DNA (5% του όγκου των δεκτικών κυττάρων) και το δείγμα επωάζεται σε πάγο για 30 λεπτά, αφού προηγηθεί ελαφριά ανάδευση για την ανάμιξη των συστατικών του.
2. Ακολουθεί επώαση του δείγματος στους 42°C για 90 sec.
3. Το δείγμα μεταφέρεται στον πάγο για 2 λεπτά. Στο σημείο αυτό τα πλασμίδια εισέρχονται στα κύτταρα που υποστεί θερμικό σοκ (heat shock).
4. Στη συνέχεια το δείγμα προστίθεται σε 800 μl θρεπτικού μέσου SOC και επωάζεται υπό ανάδευση (180 rpm) στους 37°C για μία ώρα.
5. Τα συνολικά 1000ml μοιράζονται σε σωληνάκια τύπου erpendorf, καθένα από τα οποία περιέχει 200 και 800 μl αντίστοιχα. Τα 800 μl φυγοκεντρώνονται στις 2000 rpm για 4 min και τα καθιζάνοντα κύτταρα

αναδιαλύονται σε τελικό όγκο 200 μl (αφαιρούνται 600 μl υπερκείμενου υγρού).

6. Οι παραπάνω ποσότητες επιστρώνονται σε τριβλία με θρεπτικό μέσο LB άγαρ που περιέχουν αμπικικιλίνη. Πριν την επίστρωση των κυττάρων, στην επιφάνεια των τριβλίων προσθέτονται προσθήκη 30 μl X-gal και 3 μl IPTG, ώστε να είναι δυνατή η επιλογή των αποικιών με το επιθυμητό πλασμίδιο.
7. Τέλος, τα τριβλία επωάζονται overnight στους 37°C.

2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

Μεταξύ των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για την απομόνωση των πλασμιδίων μιας βακτηριακής καλλιέργειας, επιλέχθηκε η αλκαλική λύση καθώς και η χρήση του GFX Micro Plasmid prep kit της εταιρείας Amersham Biosciences που αποδίδει πλασμίδια υψηλού βαθμού καθαρότητας. Κατά την εφαρμογή του kit, ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται στο εγχειρίδιο της εταιρείας. Η αλκαλική μέθοδος συνίσταται στην αποδιάταξη, παρουσία NaOH και SDS, του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών του βακτηρίου και ακολούθως τον σχηματισμό αδιάλυτου ιζήματος μετά από εξουδετέρωση του διαλύματος με οξικό κάλιο. Το πλασμιδιακό DNA και το βακτηριακό RNA στην πλειονότητά τους παραμένουν σε διαλυτή μορφή και παραλαμβάνονται με φυγοκέντριση από το υπερκείμενο. Στη συνέχεια πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη – χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη και τελικά αναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα RNάσης (ελεύθερο DNασών), ώστε να αποικοδομηθούν τα μόρια RNA. Τα βακτηριακά κύτταρα που μετασχηματίστηκαν με τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, στα οποία είχαν εισαχθεί τα ενθέματα που απομονώθηκαν, αποθηκεύτηκαν στους -80°C σε διάλυμα γλυκερόλης (850 μl κύτταρα υγρής καλλιέργειας σε 150 μl γλυκερόλη).

Διαλύματα

- Μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα
- Θρεπτικό μέσο LB Broth/αμπικικιλίνη

- Διαλύματα I, II και III
- Διάλυμα TE- Rnase
- Διαλύματα φαινόλης και χλωροφορμίου
- Παγωμένη αιθανόλη 70% και 100%
- Διάλυμα CH₃COONa 0.3 M
- Γλυκογόνο

Μεθοδολογία

☒ Καλλιέργεια και συλλογή βακτηριακών κυττάρων

1. Για τη δημιουργία υγρών καλλιεργειών ενοφθαλμίζονται αποικίες μετασηματισμένων κυττάρων (βλ. § 2.5) σε θρεπτικό μέσο LB Broth που περιέχει το αντιβιοτικό αμπικιλίνη (1 αποικία / 3 ml LB Broth).
2. Στη συνέχεια οι καλλιέργειες επωάζονται σε ένα σωλήνα υπό ανάδευση (220 rpm) στους 37°C overnight.
3. Από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε, φυγοκεντρώνται 1.5 ml στις 3.000 rpm για 3 min. Τα βακτηριακά κύτταρα που κατακρημνίζονται και συλλέγονται με αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού, διατηρούνται σε πάγο.

☒ Λύση κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA

1. Το ιζήμα αναδιαλύεται σε 100 ml παγωμένου διαλύματος I μετά από έντονη ανάδευση σε vortex και επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min. Η γλυκόζη που εμπεριέχεται στο διάλυμα συμβάλλει στη διατήρηση της ισοτονικότητάς του ώστε να αποφεύγεται η ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών λόγω ωσμωτικής πίεσης. Επιπλέον η παρουσία του χηλικού παράγοντα EDTA παρεμποδίζει τη δράση των DNAσών εφόσον δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα Ca⁺² και Mg⁺².
2. Στη συνέχεια προστίθενται 200ml από πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα II και αφού πραγματοποιηθεί ήπια ανάδευση (όχι vortex) αφήνεται στον πάγο για 3-5 min. Στο διάστημα αυτό τα κύτταρα λύνονται γι' αυτό και αυξάνεται το ιξώδες του διαλύματος. Το απορρυπαντικό SDS αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και διασπά τα μεμβρανικά τοιχώματα με την

απομάκρυνση λιπιδίων ώστε να εξέλθουν τελικά τα μόρια του πλασμιδιακού και όχι του χρωμοσωμικού DNA. Το NaOH λειτουργεί ως αποδιατακτικό του DNA καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου και επιτρέπει την ελεγχόμενη ρήξη των μεμβρανών.

3. Ακολουθεί προσθήκη 150 ml παγωμένου διαλύματος III και το μίγμα τοποθετείται στον πάγο, αφού προηγηθεί ανάμειξη με ήπιο vortex. Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων οξικού καλίου εξουδετερώνονται οι αλκαλικές συνθήκες λύσης, καθώς αυτό αντιδρά με τα NaOH και SDS, με αποτέλεσμα να κατακρημνίζονται ως αδιάλυτα σύμπλοκα τα κυτταρικά υπολείμματα και οι πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί με το SDS. Ταυτόχρονα κατακρημνίζεται και ένα μεγάλο ποσοστό του χρωμοσωμικού DNA που έχει προσδεθεί στις μεμβράνες.
4. Το υπόλοιπο χρωμοσωμικό DNA καθιζάνει με φυγοκέντρωση στις 13.200 rpm για 5 min. Το πλασμιδιακό DNA παραμένει σε διαλυτή μορφή στο υπερκείμενο, που μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι.
5. Για την πλήρη απομάκρυνση των πρωτεϊνών πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο.

☒ Εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο

1. Στο δείγμα DNA προστίθεται ποσότητα ίσου όγκου μίγματος φαινόλης – χλωροφορμίου (1:1) και το μίγμα αναδεύεται έντονα με τη βοήθεια vortex.
2. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 13.200 rpm και η υδατική φάση μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι προσεκτικά ώστε να μη ληφθεί καθόλου μεσόφαση ή οργανική φάση.
3. Προστίθεται χλωροφόρμιο ίσου όγκου και επαναλαμβάνεται το στάδιο 2.
4. Η διαδικασία του σταδίου 3 πραγματοποιείται για ακόμα μία φορά και ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη.

☒ Κατακρήμνιση με αιθανόλη

1. Στο δείγμα DNA όγκου V προσθέτονται 2.5 V αιθανόλης 100%, 1/10 V διαλύματος CH₃COONa 3 M και 0.5 ml γλυκογόνου και το μίγμα διατηρείται για 15 min στους -80°C.

2. Το μίγμα φυγοκεντρείται για 10 min στις 13.200 rpm.
3. Το υπερκείμενο αφαιρείται προσεκτικά και προστίθεται αιθανόλη 70% ίση με 0.5 V.
4. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 5 min στις 13.200 rpm και αφαίρεση του υπερκείμενου.
5. Το ίζημα αφήνεται να στεγνώσει και αναδιαλύεται σε 100μl TE-RNase. Το δείγμα, που αποθηκεύεται στους -20°C, αποτελείται από καθαρό πλέον πλασμιδιακό DNA.

☞ Λύση κυττάρων και απομόνωση πλασμιδιακού DNA με χρήση του kit.

1. Από την καλλιέργεια *E. coli* που αναπτύχθηκε, φυγοκεντρούνται 1.5 ml στις 13.200 rpm για 30 sec.
2. Τα βακτηριακά κύτταρα που κατακρημνίζονται και συλλέγονται με αφαίρεση του υπερκείμενου υγρού.
3. Το ίζημα αναδιαλύεται σε 150 ml παγωμένου διαλύματος I και αναδεύεται έντονα με vortex.
4. Προσθέτονται 150 ml διαλύματος II και το μείγμα αναδεύεται ήπια.
5. Ακολουθεί προσθήκη 300 ml διαλύματος III και ήπια ανάμειξη έως ότου σχηματιστούν αδιάλυτα σύμπλοκα.
6. Το μείγμα φυγοκεντρείται στις 13.200 rpm για 5 min.
7. Το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε ειδική στήλη (GFX Column) και κατόπιν αυτή τοποθετείται σε σωλήνα συλλογής, όπου επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min.
8. Ακολουθεί φυγοκέντριση για 30 sec στις 13.200 rpm.
9. Το έκλουσμα απομακρύνεται από τον σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη.
10. Προσθέτονται 300 ml διαλύματος III στη στήλη και φυγοκεντρούνται για 30 sec στις 13.200 rpm.
11. Επανάληψη του σταδίου 9.

12. Προσθέτονται 400μl διαλύματος Wash και το δείγμα φυγοκεντρείται στις 13.200 rpm για 1 min.
13. Η στήλη μεταφέρεται σε νέο σωλήνα ώστε στη συνέχεια να εκλουστεί το DNA.
14. Προσθέτονται στη στήλη 50 μl διαλύματος TE και επωάζεται για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου για να αυξηθεί η απόδοση της έκλουσης.
15. Κατόπιν φυγοκεντρείται για 1 min στις 13.2000 rpm.
16. Επανάληψη των σταδίων 14 και 15, ώστε ο τελικός όγκος της έκλουσης να είναι 100 μl.

Παρατήρηση: Τα διαλύματα I, II, III, Wash και TE συμπεριλαμβάνονται στο kit.

2.9. Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA έγινε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Sanger. Ο καθορισμός της πρωτοταγούς δομής των δειγμάτων που απομονώθηκαν έγινε από την εταιρεία Macrogen. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αλληλούχισης κάθε δείγματος απαιτούνται 1000 ng DNA.

2.10. Χαρακτηρισμός αλληλουχίας

Κάθε αλληλουχία που προσδιορίστηκε, επεξεργάστηκε αρχικά στο πρόγραμμα Omiga. Το Omiga (Oxford Molecular Ltd, 1996-1999) είναι πρόγραμμα επεξεργασίας της πρωτοταγούς δομής του DNA (και των πρωτεϊνών) με δυνατότητα σύγκρισης και ομοπαράθεσης αλληλουχιών, που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του ενθέματος από τα επιμέρους τμήματα της αλληλουχίας του όπως αυτά απεστάλησαν από την εταιρεία αλληλούχισης. Στη συνέχεια με χρήση του προγράμματος BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) που παρέχεται δικτυακά από το NCBI (National Center for Biotechnology Information) συγκρίθηκε με τις υπάρχουσες σε βάσεις δεδομένων, ώστε να διαπιστωθεί αν υπάρχουν ομοιότητες με γνωστές

αλληλουχίες. Στο πρόγραμμα αυτό διενεργούνται τοπικές ομοπαράθεσεις μεταξύ νουκλεοτιδικών ή πρωτεϊνικών αλληλουχιών με αποθηκευμένες στις βάσεις δεδομένων αλληλουχίες και εκτιμάται η στατιστική σημαντικότητα των ομολογιών. Γι' αυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εύρεση λειτουργικών και εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των αλληλουχιών, αλλά και την ταυτοποίηση μελών σε οικογένειες γονιδίων.

2.11. Κατασκευή πολυταινικών χρωμοσωματικών παρασκευασμάτων

Για την κατασκευή παρασκευασμάτων για κυτταρογενετικές αναλύσεις χρησιμοποιήθηκαν τα πολυταινικά χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων ατόμων που βρίσκονταν σε προνυμφικό στάδιο.

Διαλύματα

- Διάλυμα Ringer
- Διάλυμα οξικού οξέος 45%
- Μονιμοποιητικό διάλυμα
- Υγρό άζωτο
- Αιθανόλη 100%

Μεθοδολογία

1. Αρχικά γίνεται η εξαγωγή των σιελογόνων αδένων σε διάλυμα Ringer στην επιφάνεια μιας αντικειμενοφόρου πλάκας. Η επιλογή του ισοτονικού διαλύματος Ringer έγκειται στην δυνατότητά του να εξασφαλίζει την ωσμωτικότητα των κυττάρων ώστε να αποτρέπεται η διάρρηξη των μεμβρανών.
2. Οι αδένες μεταφέρονται σε διάλυμα οξικού οξέος 45% για 30 sec, έως ότου αποκτήσουν μια γαλακτόχρωμη χροιά.
3. Το ½ κάθε αδένα μεταφέρεται σε καθαρή καλυπτρίδα, πάνω στην οποία έχει τοποθετηθεί μία σταγόνα (10 μl) μονιμοποιητικού διαλύματος και αφήνεται εκεί για 2-3 min.

4. Μια καθαρή αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται πάνω από την καλυπτρίδα και αφού αντιστραφεί (η καλυπτρίδα να βρίσκεται στην πάνω πλευρά) εφαρμόζεται ελαφρό χτύπημα για να σπάσουν τα κύτταρα και οι πυρήνες και να απλωθούν οι χρωμοσωμικοί βραχίονες. Στο σημείο αυτό γίνεται έλεγχος με οπτικό μικροσκόπιο και το στάδιο επαναλαμβάνεται ανάλογα με την αποτελεσματικότητα της κυτταρικής λύσης.
5. Για να γίνουν τελείως επίπεδοι οι βραχίονες, εφαρμόζεται ισχυρή πίεση με τον αντίχειρα πάνω από το παρασκεύασμα.
6. Το παρασκεύασμα διατηρείται στους -20°C για 24 ώρες.
7. Η αντικειμενοφόρος εμβαπτίζεται σε υγρό άζωτο και η καλυπτρίδα απομακρύνεται γρήγορα με την άκρη ενός ξυραφιού.
8. Τέλος τα παρασκευάσματα αφυδατώνονται σε αιθανόλη 100% (1 φορά για 15 min) και διατηρούνται σε ξηρό και σκιερό μέρος.

2.12. Υβριδισμός *in situ* σε πολυταινικά χρωμοσώματα

Οι θέσεις συγκεκριμένων γονιδίων στον κυτταρολογικό χάρτη μπορεί να προσδιοριστούν άμεσα με την τεχνική του υβριδισμού *in situ*. Ένας ειδικά σημασμένος ανιχνευτής υβριδίζεται *in situ* με το μετουσιωμένο DNA των μεταφασικών πολυταινικών χρωμοσωμάτων, που είναι διατεταγμένα πάνω σε μια αντικειμενοφόρο πλάκα. Ο ανιχνευτής αναγνωρίζεται με μια φθορίζουσα ή χρωμογόνο σήμανση ή είναι ραδιοσημασμένος και η χρωμοσωμική θέση των αντίστοιχων γονιδίων προσδιορίζεται με μικροσκοπική παρατήρηση ή αυτοραδιογραφία αντίστοιχα. Η *in situ* υβριδοποίηση χρησιμοποιείται στον ακριβή προσδιορισμό των κλωνοποιημένων αλληλουχιών DNA που έχουν απομονωθεί πάνω σε περιοχές των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του εντόμου.

2.12.1. Προετοιμασία παρασκευασμάτων για υβριδισμό

Διαλύματα

- Διάλυμα SSC 20X
- Διαλύματα αιθανόλης 70% και 96%
- Διάλυμα NaOH 0.07 N

Διάλυμα SSC 20X, pH 7-8 (για 1 L): 175.3 gr NaCl, 88.2 gr κιτρικό νάτριο, απιονισμένο H₂O

Μεθοδολογία

1. Τα παρασκευάσματα επωάζονται σε προθερμασμένο στους 65°C διάλυμα 2X SSC για 30 min.
2. Ξεπλένονται με 2X SSC για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου (το στάδιο αυτό επαναλαμβάνεται).
3. Στη συνέχεια αφυδατώνονται σε διαδοχικές πεντάλεπτες εμβάπτισεις σε σειρά διαλυμάτων αιθανόλης (2 φορές σε 70% και 1 φορά σε 96%) και αφήνονται να στεγνώσουν.
4. Ακολουθεί βύθισή τους για 10 min σε 2X SSC.
5. Τα παρασκευάσματα μετουσιώνονται με εμβάπτιση για 2min σε 0.07 N NaOH πρόσφατα παρασκευασμένο.
6. Τέλος επαναλαμβάνονται τα στάδια 2 και 3.

2.12.2. Σήμανση ανιχνευτών

Ως ανιχνευτές χρησιμοποιήθηκαν οι EST κλώνοι 165 και 158 που απομονώθηκαν από τη cDNA βιβλιοθήκη του δάκου. Η σήμανση έγινε με διγοξιγενίνη, ένα στεροειδές που απομονώθηκε από το φυτό *digitalis*, σύμφωνα με το πρωτόκολο της εταιρείας Boehringer Mannheim (Digoxigenin, DIG labelling system). Η μοναδική αυτή πηγή προέλευσής της εξασφαλίζει ότι τα ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή της δεν θα προσδεθούν σε άλλο βιολογικό υλικό. Το αποδιαταγμένο DNA αναμειγνύεται με εξαμερή νουκλεοτιδίων, με σημασμένα με διγοξυγενίνη δεοξυριβονουκλεοτίδια και το ένζυμο Klenow που εμφανίζει δράση DNA πολυμεράσης και επωάζεται στους 37°C. Ως εκκινητές για τη δράση της

πολυμεράσης δρουν οι αλληλουχίες των εξαμερών. Η επιμήκυνση της συμπληρωματικής αλυσίδας του αποδιαταγμένου DNA με χρήση του μίγματος δεοξυριβονουκλεοτιδίων – διγοξυγενίνης, έχει σαν αποτέλεσμα τον σχηματισμό σημασμένου ανιχνευτή.

Διαλύματα – αντιδραστήρια

- Διάλυμα υβριδισμού *dig*
- Διάλυμα EDTA 0.2 M
- Διάλυμα LiCl 4 M
- Διαλύματα αιθανόλης 70% και 100%
- Δείγμα DNA
- Μίγμα εξανουκλεοτιδίων 10X (Boehringer Mannheim)
- Μίγμα σήμανσης Dig-dNTPs 10X (Boehringer Mannheim)
- Ένζυμο Klenow (3 U/μl)
- Απιονισμένο H₂O

Μεθοδολογία

1. Το γραμμικό DNA (~120 ng) που πρόκειται να σημανθεί, αποδιατάσσεται με βράσιμο για 10 min σε σωληνάκι erpendorf και μεταφέρεται γρήγορα στον πάγο.
2. Στη συνέχεια προστίθενται 2 μl μίγματος εξανουκλεοτιδίων, 2 μl μίγματος σήμανσης Dig-dNTPs, 1 μl ενζύμου Klenow και ο όγκος συμπληρώνεται με ddH₂O ως τα 20 μl.
3. Το δείγμα επωάζεται στους 37°C για 1-2 ώρες.
4. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 2 μl EDTA.
5. Στη συνέχεια προσθέτονται 2.5 μl LiCl και το DNA κατακρημνίζεται με 75 μl παγωμένης αιθανόλης 100%.
6. Το δείγμα διατηρείται στους -80°C για 30 min.
7. Ακολουθεί φυγοκέντρισή του στα 12000g για 20 min και τελικά το ίζημα ξεπλένεται με 70% αιθανόλη και αναδιαλύεται σε 75 μl διαλύματος υβριδισμού.

2.12.3. Υβριδισμός

Διαλύματα – αντιδραστήρια

- Διαλύματα SSC 5X και 2X
- Σημασμένος ανιχνευτής
- Παρασκεύασμα πολυταινικών χρωμοσωμάτων,

Μεθοδολογία

1. Ο σημασμένος ανιχνευτής αποδιατάσσεται με βράσιμο για 10 min και μεταφέρεται γρήγορα σε πάγο.
2. Στη συνέχεια τοποθετούνται προσεκτικά επάνω στο παρασκεύασμα 15 μl αποδιαταγμένου ανιχνευτή (περίπου 10-20 ng) και μία καλυπτρίδα 18 x 18 mm, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.
3. Τα παρασκευάσματα μεταφέρονται σε “υγρό θάλαμο” και τοποθετούνται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας για 16-24 ώρες. Η επιλεγμένη θερμοκρασία υβριδισμού είναι 62°C. Ως “υγρός θάλαμος” μπορεί να λειτουργήσει οποιοδήποτε πλαστικό ή γυάλινο κουτί που κλείνει αεροστεγώς και η εσωτερική του βάση είναι επίπεδη. Στη βάση εφαρμόζονται κομμάτια απορροφητικού χαρτιού εμποτισμένα με 5X SSC, στα οποία προσαρμόζεται κάποιο γυάλινο ή πλαστικό πλέγμα όπου τοποθετούνται τα παρασκευάσματα. Κατά τη διάρκεια του υβριδισμού είναι σημαντικό τα παρασκευάσματα να παραμένουν υγρά.
4. Μετά το πέρας του υβριδισμού, η καλυπτρίδα απομακρύνεται και τα παρασκευάσματα ξεπλένονται σε διάλυμα 2X SSC για 20 min σε θερμοκρασία χαμηλότερη κατά 10°C από αυτή του υβριδισμού και κατόπιν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου.

2.12.4. Ανίχνευση σήματος

Η ανίχνευση γίνεται ανοσοχημικά με χρήση χρωμογόνων αντισωμάτων ειδικών για τη διγοξιγενίνη (Anti-dig antibodies). Τα αντισώματα είναι συζευγμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, το οποίο όταν επωάζεται

παρουσία του χρωμογόνου NBT (Nitroblue Tetrazolium) και του υποστρώματος BCIP (5-bromo- 4-chloro- 3 idolyI-phosphate), καταλύει την αποφωσφορλίωση του BCIP δημιουργώντας ένα μπλε ίζημα από την ταυτόχρονη κατακρήμνιση χρωμογόνου – υποστρώματος. Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί με μικροσκοπική παρατήρηση η θέση υβριδισμού του ανιχνευτή πάνω στα πολυταινικά χρωμοσώματα και συνεπώς να καθοριστεί η ακριβής θέση του αντίστοιχου γονιδίου.

Διαλύματα

- Διαλύματα 1, 2 και 3
- Διάλυμα αντισωμάτων
- Διάλυμα χρώσης

Μεθοδολογία

1. Τα παρασκευάσματα εμβαπτίζονται για 5 min στο διάλυμα 1.
2. Επωάζονται για 30 min στο διάλυμα 2.
3. Ξεπλένονται για 1 min στο διάλυμα 1.
4. Στη συνέχεια τοποθετούνται 200 μl διαλύματος αντισωμάτων πάνω σε κάθε παρασκεύασμα και πραγματοποιείται επώαση για 45 min αφού προηγουμένως σκεπαστούν με καλυπτρίδα.
5. Ξεπλένονται δύο φορές για 15 min σε διάλυμα 1.
6. Εμβαπτίζονται για 2 min στο διάλυμα 3, ώστε να ανακτήσουν το αλκαλικό pH του διαλύματος που απαιτείται για τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης.
7. Ακολούθως προστίθεται 1 ml διαλύματος χρώσης σε κάθε παρασκεύασμα και επαναλαμβάνεται η επώαση των 45 min, αυτή τη φορά στο σκοτάδι λόγω της φωτοευαισθησίας που παρουσιάζουν τα χρωμογόνα.
8. Τέλος η χρωμοαντίδραση διακόπτεται με ξέπλυμα των παρασκευασμάτων με απιονισμένο H₂O, οπότε και είναι πλέον έτοιμα για μικροσκοπική παρατήρηση.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

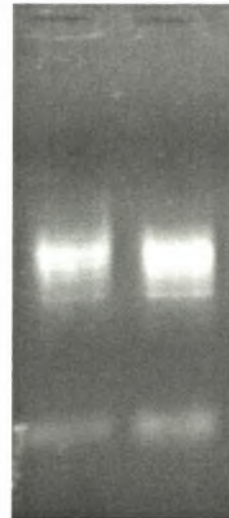
3.1. Απομόνωση ενθεμάτων

Οι φάγοι λΖΑΡ που περιέχουν τα κλωνοποιημένα ενθέματα της cDNA βιβλιοθήκης του δάκου απομονώθηκαν από προγενέστερες εργασίες του εργαστηρίου και ανακτήθηκαν από stock που διατηρούταν αναδιαλυμένο σε 200 μl διαλύματος SM Buffer στους 4°C. Για την απομόνωση των κλώνων των EST δεικτών ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις. Πρώτον, ενίσχυση του συνόλου της φαγικής βιβλιοθήκης και κλωνοποίηση του προϊόντος ενίσχυσης σε πλασμιδιακό φορέα. Δεύτερον, ενίσχυση προϋπαρχόντων απομονωμένων φαγικών κλώνων και υποκλωνοποίησή τους είτε σε πλασμιδιακό φορέα pUC19 είτε σε pGEM T-easy.

3.1.1. Ενίσχυση φαγικής βιβλιοθήκης

Η αρχική προσπάθεια εστίαζε στην PCR ενίσχυση του συνόλου της φαγικής βιβλιοθήκης με εκκινητές T3 και T7 και ακολούθως στην κλωνοποίηση του προϊόντος ενίσχυσης σε πλασμιδιακούς φορείς. Για να διαπιστωθεί αν επετεύχθη η ενίσχυση των αλληλουχιών των ενθεμάτων, ηλεκτροφορήθηκε μικρή ποσότητα του PCR προϊόντος σε πήκτωμα αгарόζης (Εικ. 15) δίνοντας μια ενιαία διάχυτη ζώνη μεγάλου εύρους (smear) που αντιστοιχεί στους κλώνους της βιβλιοθήκης και μία επιπλέον ζώνη των 1000 bp κάποιου μη ειδικού προϊόντος. Η υπόλοιπη ποσότητα κλωνοποιήθηκε στον φορέα pBS-SK(+) μετά από πέψη και των δύο με τα ένζυμα *EcoRI* και *XhoI*. Προηγουμένως στα προϊόντα της πέψης έγινε ηλεκτροφόρηση για να προσδιοριστεί το μέγεθος των ενθεμάτων, ακολούθως καθαρισμός του DNA από το gel και επανάληψη της ηλεκτροφόρησης για ποσοτικοποίηση του δείγματος. Ωστόσο, παρ' ότι πραγματοποιήθηκε επιτυχής μετασχηματισμός βακτηριακών κυτάρων με ικανοποιητικό αριθμό

Εικόνα 15.
Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% προϊόντων PCR ενίσχυσης της φαγικής βιβλιοθήκης. Διακρίνεται το smear των φαγικών κλώνων και η ζώνη (1 kb) που αντιστοιχεί σε κάποιο μη ειδικό προϊόν.

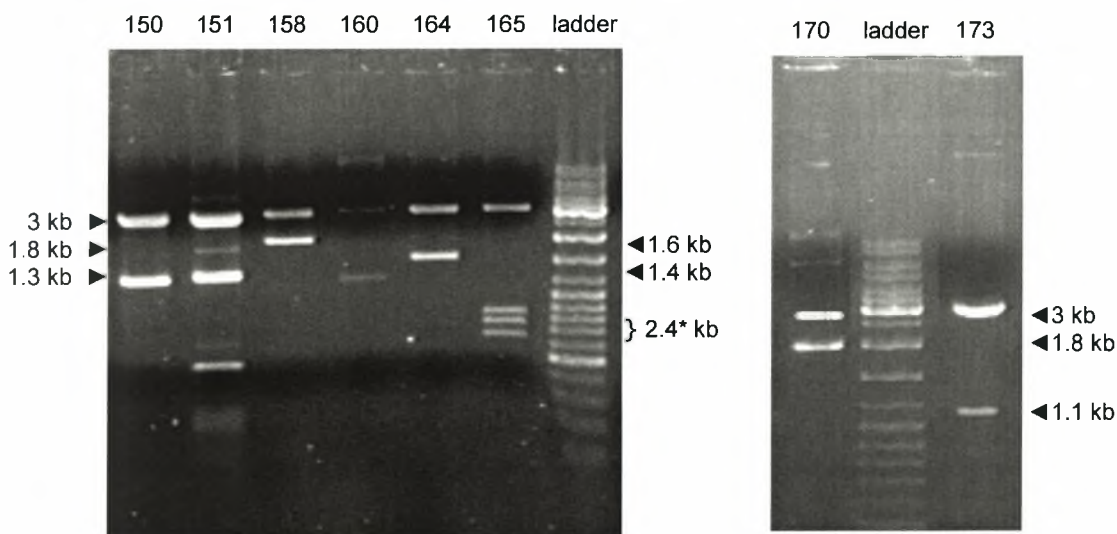


λευκών αποικιών, στην ηλεκτροφόρηση της πέψης του πλασμιδιακού DNA που απομονώθηκε από τις λευκές αποικίες, δεν εμφανίστηκαν ζώνες που να αντιστοιχούν σε πλασμίδιο.

3.1.2. Ενίσχυση απομονωμένων φαγικών κλώνων

Στην περίπτωση αυτή ενισχύθηκαν απομονωμένοι φαγικοί κλώνοι της βιβλιοθήκης. Η πορεία που ακολουθήθηκε είναι όμοια με αυτή που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.1.1. με μόνη διαφορά ότι τα προϊόντα της ενίσχυσης κλωνοποιήθηκαν στον φορέα pUC19 με τη χρήση των ενζύμων *Bam*HI και *Xba*I στις αντιδράσεις πέψης. Με τον τρόπο αυτό κατορθώθηκε η απομόνωση μόνο ενός κλώνου (pKT133).

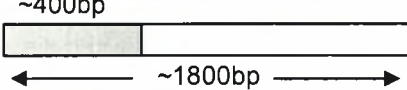
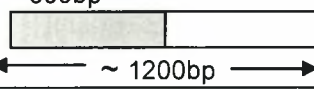
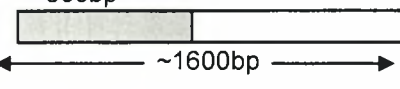
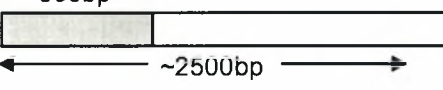
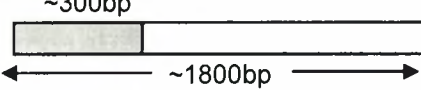
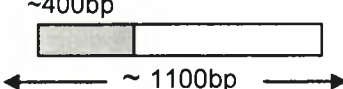
Εναλλακτικά, επιχειρήθηκε ενίσχυση προϋπαρχόντων απομονωμένων cDNA κλώνων (με εκκινητές T3 και T7), καθαρισμός του προϊόντος ενίσχυσης και απευθείας κλωνοποίηση σε φορέα pGem T-easy. Στο πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε από το μετασχηματισμό των βακτηριακών κυττάρων, έγινε πέψη με το ένζυμο *Eco*RI για την απελευθέρωση του ενθέματος. Η ηλεκτροφόρηση που ακολούθησε επιβεβαίωσε την επιτυχή κλωνοποίηση του ενθέματος. Από αυτή την προσπάθεια απομονώθηκαν τελικά 9 EST κλώνοι (Εικ. 16).



Εικόνα 16. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων πέψης (15μl) του ανασυνδρασμένου πλασμιδιακού φορέα pGEM που απομονώθηκε από κύτταρα *E. coli* με χρήση του περιοριστικού ενζύμου *Eco*RI. Ο φορέας αντιστοιχεί στη ζώνη 3 kb, ενώ τα ενθέματα στις υπόλοιπες που υποδεικνύονται με βέλη, σύμφωνα με τις ζώνες του μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder). Ο κλώνος 165 εμφανίζει εσωτερικές θέσεις κοπής για το συγκεκριμένο ένζυμο.

3.2. Χαρακτηρισμός της αλληλουχίας των απομονωμένων ενθεμάτων

Ο προσδιορισμός της πρωτοταγούς δομής των συνολικά 10 ενθεμάτων που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία MacroGen, δίνοντας επιτυχή αποτελέσματα για 6 από αυτά. Οι αλληλουχίες συγκρίθηκαν μέσω του προγράμματος BLAST (μετά από επεξεργασία τους στο πρόγραμμα Omega) με τις υπάρχουσες σε βάσεις δεδομένων, σε αναζήτηση ομοιοτήτων με ήδη γνωστές αλληλουχίες. Κάθε ομολογία θεωρείται ως ένδειξη παρόμοιας λειτουργίας. Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αναζήτησης αυτής.

Κλώνος	Μέγεθος	Ομοιότητα
pKT158	~400bp 	CDK5 regulatory subunit associated protein 3 [Gallus gallus] E value : 1e-42
pKT160	~500bp 	Tropomyosin isoform 127 E value : 3e-98
pKT164	~600bp 	mitochondrial citrate synthase precursor [Xiphias gladius] E value : 3e-111
pKT165	~600bp 	heat shock-like protein, similar to heat shock 70 kDa proteins [Ceratitis capitata] E value : 4e-112
pKT170	~300bp 	beta-N-acetylglucosaminidase [Choristoneura fumiferana] E value : 7e-38
pKT173	~400bp 	polyprotein [sacbrood virus] E value : 2e-31

Πίνακας 1. Παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αναζήτησης ομοιότητας των κλώνων που απομονώθηκαν, μετά από σύγκριση με υπάρχουσες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων. Στις τρεις στήλες εμφανίζονται αντίστοιχα ο κλώνος, το μέγεθός του και το αποτέλεσμα της σύγκρισης της αλληλουχίας του που παρουσιάζει το μικρότερο E value.

Η λειτουργία των πρωτεϊνών που εμφανίζουν ομοιότητα με τους απομονωμένους κλώνους είναι η ακόλουθη:

✓ Κλώνος pKT158 : Η CDK5 είναι μια πρωτεϊνική κινάση σερίνης – θρεονίνης, που ανήκει δομικά στην οικογένεια των πρωτεϊνικών κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες (CDKs) και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στο σύστημα ελέγχου του κυτταρικού κύκλου. Ωστόσο, η CDK5 δεν σχετίζεται με τη ρύθμιση της κυτταρικής διαίρεσης. Ο ρόλος της περιορίζεται στους νευρώνες που βρίσκονται στο τελικό στάδιο διαφοροποίησης, καθώς μόνο εκεί εκφράζεται εκλεκτικά σαν ενεργό ένζυμο (Hellmich et al, 1994). Ενεργοποιείται από την ρυθμιστική πρωτεΐνη p35 και θεωρείται ότι ρυθμίζει την απελευθέρωση νευροδιαβιβαστών μέσω φωσφορυλίωσης και down-regulation της δραστηριότητας των καναλιών ιόντων ασβεστίου. Γι' αυτό και η αναστολή της θεωρείται ότι παρέχει προστατευτική δράση στα νευρικά κύτταρα (Wesierska-Gadek et al, 2003).

✓ Κλώνος pKT160 : Η τροπομυοσίνη (tropomyosin) είναι μια συντηρημένη πρωτεΐνη, με δομή σπειροειδούς σπειράματος που ρυθμίζει τη συστολή στα μυϊκά κύτταρα. Συγκεκριμένα, είναι ένα άκαμπτο ραβδόμορφο πρωτεϊνικό μόριο που προσδένεται στο αυλάκι της έλικας της ακτίνης επικαλύπτοντας επτά μονομερή ακτίνης και εμποδίζει τη σύνδεση των κεφαλών της μυοσίνης με τα νημάτια της ακτίνης. Από πειράματα που διεξάχθηκαν στη *Drosophila*, διαπιστώθηκε ότι η απουσία της ισομορφής της τροπομυοσίνης του κυτταροσκελετού, επηρεάζει σε εμβρυϊκό επίπεδο τη μορφογένεση της κεφαλής καθώς και τη συσσώρευση του oskar mRNA, απαραίτητου για τον σχηματισμό των γαμετικών κυττάρων (Tetzlaff et al, 1996). Επιπλέον, σε μεταμιτωτικούς νευρώνες διαπιστώθηκε ο αυτόνομος ρόλος της τροπομυοσίνης στη ρύθμιση του μεγέθους των δενδριτικών πεδίων του νευρικού συστήματος (Li and Gao, 2003).

✓ Κλώνος pKT164 : Η κιτρική συνθάση (mt citrate synthase) καταλύει τη συμπύκνωση του οξαλοξικού και του ακετυλο-CoA για τον σχηματισμό του

κιτρυλο-CoA, κατά την πρώτη αντίδραση του κύκλου του κιτρικού οξέος που λαμβάνει χώρα στα μιτοχόνδρια (Stryer, 1997).

✓ Κλώνος pKT165 : Η *hsp70* αποτελεί μια από τις πιο συντηρημένες εξελικτικά και συχνά εκφραζόμενες πρωτεΐνες της οικογένειας των πρωτεϊνών θερμικού σοκ (heat shock proteins, *hsp*). Η παραγωγή τους επάγεται σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας, αλλά και υπό την επίδραση συνθηκών ανοξίας ή τοξικών ουσιών (π.χ. εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων). Η λειτουργία τους έγκειται στην ελαχιστοποίηση των βλαβών που προκαλεί η θερμική μετουσίωση των πρωτεϊνών. Οι *hsp70*, δρώντας ως μοριακοί συνοδοί, ελέγχουν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των εκτεθειμένων υδρόφοβων ενεργών περιοχών των μετουσιωμένων πρωτεϊνών, διευκολύνοντας την αναδίπλωσή τους στη σωστή στερεοδιαμόρφωση. Επιπλέον, κατά τη σύνθεση των πρωτεϊνών, προσδένονται σε περιοχές που τείνουν να αλληλεπιδράσουν εμποδίζοντας την αυθόρμητη συσσωμάτωσή τους και κατ' επέκταση αποτρέποντας τον σχηματισμό λανθασμένης τριτοταγούς δομής (Gurta et al, 2005)

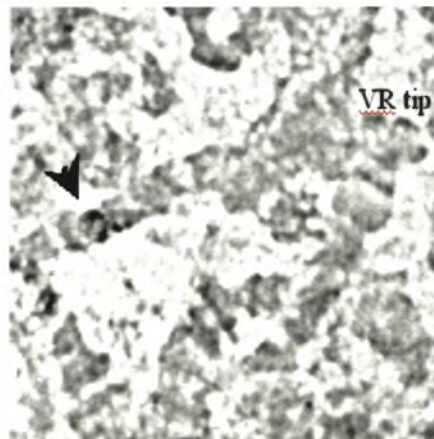
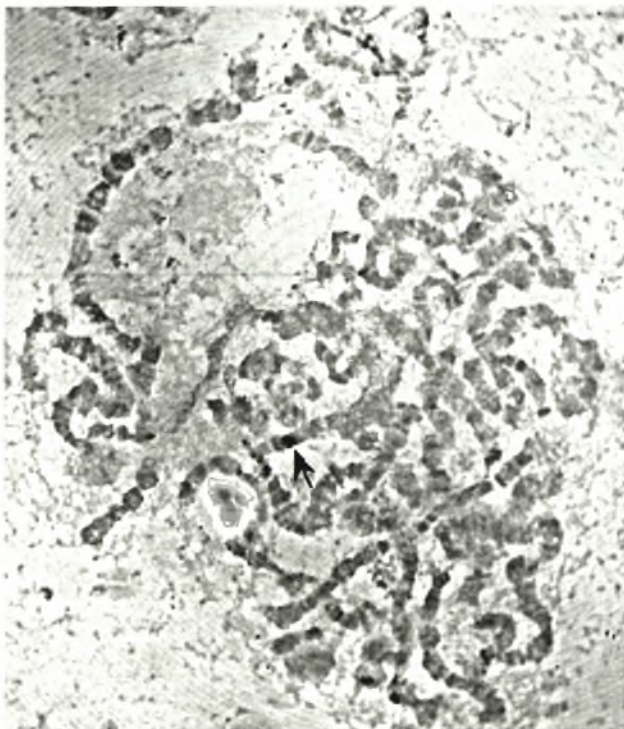
✓ Κλώνος pKT170 : Η N-ακετυλογλυκοζαμίνη είναι παράγωγο της γλυκοζαμίνης, στην οποία η αμινομάδα είναι ακετυλιωμένη. Ο εξωτερικός σκελετός των εντόμων περιέχει χιτίνη, έναν πολυσακχαρίτη που αποτελείται από κατάλοιπα N-ακετυλογλυκοζαμίνης που συνδέονται με δεσμούς β -1,4 (beta-N-acetylglycosaminidase, NAG). Η χιτίνη σχηματίζει επιμήκεις ευθείες αλυσίδες που χρησιμεύουν ως δομικά στοιχεία (Stryer, 1997).

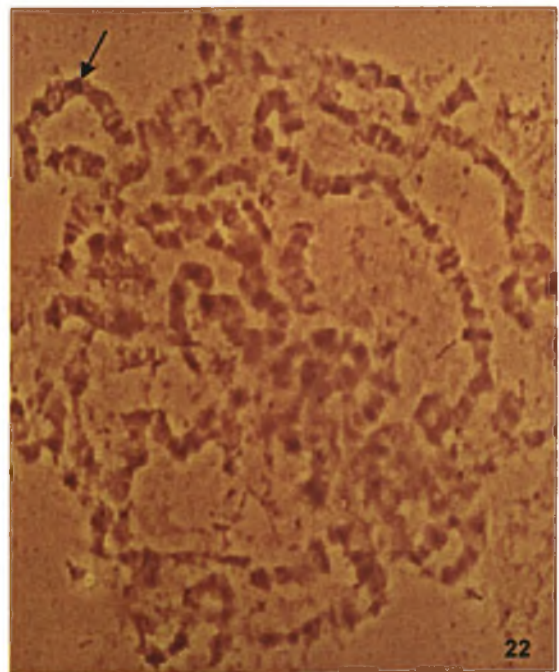
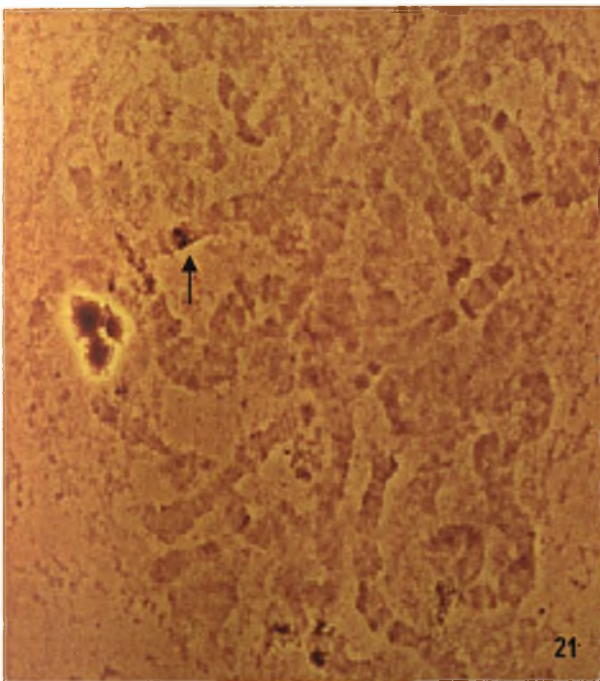
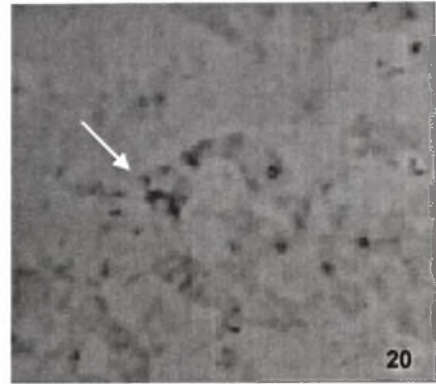
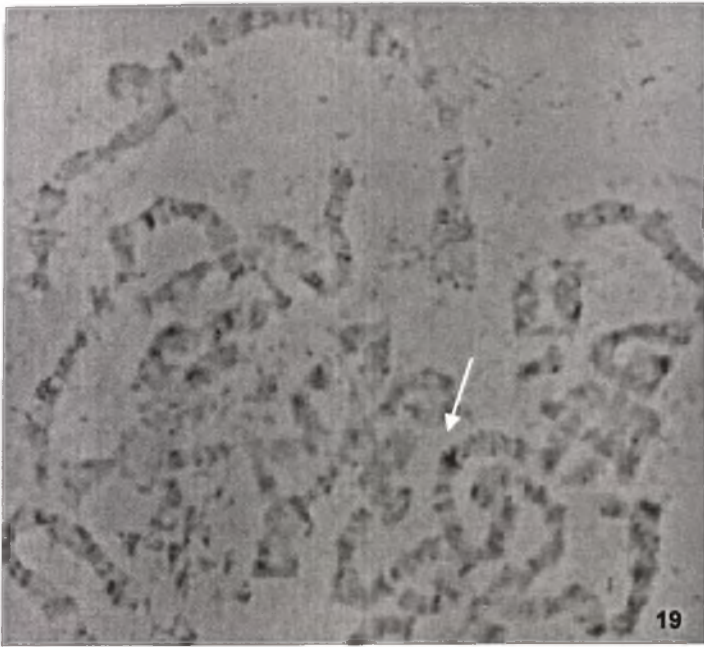
✓ Κλώνος pKT173 : Ο ιός sacbrood (SBV), που κατατάσσεται στους RNA ιούς, χαρακτηρίζεται από την ικανότητά του να προσβάλλει τις λάρβες των μελισσών, με συνέπεια τον θάνατό τους. Οι λάρβες που έχουν μολυνθεί από τον SBV αδυνατούν να σχηματίσουν βομβύκια, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αλλαγή στον χρωματισμό τους, καθώς από λευκές αποκτούν τελικά μια υποκίτρινη χροιά (Ghosh et al, 1999).

3.3. Κυτταρογενετική χαρτογράφηση με *in situ* υβριδοποίηση

Από τις κλωνοποιημένες αλληλουχίες της cDNA βιβλιοθήκης του δάκου που απομονώθηκαν, επιλέχθηκαν δύο ώστε να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την χαρτογράφηση των γονιδίων που αντιπροσωπεύουν στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου μέσω της υβριδοποίησης *in situ*. Συγκεκριμένα, οι κλώνοι pKT165 και pKT158, αφού σημάνθηκαν με διγοξιγενίνη, υβριδοποιήθηκαν σε παρασκευάσματα πολυταινικών χρωμοσωμάτων και η ανίχνευση του σήματος έγινε ανοσοχημικά με χρήση χρωμογόνων αντισωμάτων ειδικών για τη διγοξιγενίνη. Η θέση υβριδισμού κάθε ανιχνευτή πάνω στα πολυταινικά χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων προσδιορίστηκε μετά από μικροσκοπική παρατήρηση και ακολουθώς σύγκριση με τους υπάρχοντες φωτογραφικούς χρωμοσωμικούς χάρτες (Εικ. 9). Με τον τρόπο αυτό καθορίστηκαν οι θέσεις των γονιδίων *hsp70* και *CDK5* (Εικ. 17 – 22) στα τμήματα 96 και 95 αντίστοιχα, του δεξιού βραχίονα του χρωμοσώματος 5 (VR).

Εικόνες 17 – 22. *In situ* υβριδοποίηση ανιχνευτών των γονιδίων *hsp70* (Εικ. 17, 18, 21) και *CDK5* (Εικ. 19, 20, 22) στα πολυταινικά χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Οι θέσεις υβριδισμού των ανιχνευτών υποδεικνύονται από τα βέλη.





4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επιτακτική ανάγκη για την εξεύρεση αποτελεσματικών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου, *Bactrocera oleae*, έδωσε νέα ώθηση στην έρευνα και τη μελέτη του σε μοριακό και γενετικό επίπεδο. Η συγκεκριμένη εργασία αποσκοπούσε στη δημιουργία κυτταρογενετικών χαρτών του γονιδιώματος του δάκου. Στα πλαίσια του στόχου αυτού, επιτεύχθηκε η απομόνωση και η ταυτοποίηση 10 τυχαίων κλώνων της cDNA βιβλιοθήκης του δάκου και ο κυτταρογενετικός καθορισμός της θέσης δύο από αυτών στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου. Η απομόνωση των αλληλουχιών αυτών, χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερης σημασίας, καθώς δεν περιλαμβάνονται στην ήδη περιορισμένη διεθνή βιβλιογραφία.

Για την απομόνωση των cDNA κλώνων της βιβλιοθήκης του δάκου ακολουθήθηκαν διαφορετικές προσεγγίσεις, που βασίστηκαν στην απευθείας PCR ενίσχυση της φαγικής βιβλιοθήκης στο σύνολό της αλλά και των απομονωμένων φάγων λΖΑΡ και ακολούθως στην κλωνοποίηση των ενθεμάτων τους σε πλασμιδιακούς φορείς αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση, το γεγονός ότι κατά την ηλεκτροφόρηση του προϊόντος της πέψης δεν εμφανίστηκαν ζώνες που να αντιστοιχούν στα ενθέματα ή στο DNA του φορέα, μπορεί να είναι απόρροια i) *in vivo* ανασυνδυασμών που πραγματοποιούνται στα βακτήρια, με αποτέλεσμα να χάνεται τελικά το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο ή ii) ανάκτησης τόσο μικρής ποσότητας πλασμιδιακού DNA ώστε να είναι μη ανιχνεύσιμη. Στην δεύτερη περίπτωση, όσον αφορά τα δείγματα που επρόκειτο να υποκλωνοποιηθούν σε φορέα pUC19, πιθανόν να υπήρχαν θέσεις κοπής εσωτερικά των ενθεμάτων για τα ένζυμα *Bam*HI και *Xba*I, με αποτέλεσμα να μη πραγματοποιηθεί η κλωνοποίησή τους στον πλασμιδιακό φορέα. Έτσι δικαιολογείται το ότι κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων πέψης του πλασμιδιακού DNA εμφανίζονταν μόνο οι ζώνες που αντιστοιχούσαν στους φορείς.

Τελικά, κατά την ενίσχυση των απομονωμένων φάγων και ακολούθως την υποκλωνοποίηση τους σε πλασμιδιακό φορέα pUC19 κατορθώθηκε η ανάκτηση μόνο ενός κλωνοποιημένου ενθέματος, ενώ κατά την υποκλωνοποίηση τους σε pGEM T-easy 9 κλωνοποιημένων ενθεμάτων. Το γεγονός ότι οι παραπάνω περιπτώσεις συνιστούν επίπονες και χρονοβόρες

διαδικασίες, στρέφουν το ενδιαφέρον σε μελλοντικές προσεγγίσεις που θα εστιάζουν στην *in vivo* μαζική εκτομή των ενθεμάτων από τον φορέα λΖΑΡ, υπό τη μορφή φαγεμιδίων. Αξιοποιώντας συγκεκριμένες αλληλουχίες του γενώματος του λ φάγου και με τη βοήθεια πρωτεϊνών του βοηθού (helper) βακτηριοφάγου, το DNA του φορέα αντιγράφεται και επανακυκλοποιείται εμπεριέχοντας ταυτόχρονα το κλωνοποιημένο ένθεμα. Προσπάθεια εφαρμογής της συγκεκριμένης μεθόδου έγινε σε προηγούμενες εργασίες του εργαστηρίου, χωρίς όμως ικανοποιητικά αποτελέσματα, καθιστώντας αναγκαία τη βελτιστοποίηση των επιμέρους παραμέτρων, συμπεριλαμβανομένης και της αντιπροσώπευσης της βιβλιοθήκης.

Ο καθορισμός της πρωτοταγούς δομής των 10 κλωνοποιημένων ενθεμάτων από την εταιρεία Macrogen, έδωσε επιτυχή αποτελέσματα για 6 από αυτά. Για τα υπόλοιπα 4, η μη ικανοποιητική αλληλούχηση αποδόθηκε στην ανεπαρκή ποσότητα DNA για την πραγματοποίηση της αντίδρασης ή στη μη καθαρότητα των δειγμάτων που απεστάλησαν. Επίσης, δεν αποκλείονται και τεχνικές παράμετροι που σχετίζονται με τις συνθήκες μεταφοράς των δειγμάτων. Οι αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν για τα 6 ενθέματα, ακολούθως συγκρίθηκαν σε αμινοξικό επίπεδο με ήδη γνωστές αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων. Όλοι οι κλώνοι εμφάνισαν στατιστικά σημαντική ομοιότητα με γνωστούς γονιδιακούς τόπους. Ένα από τα κλωνοποιημένα ενθέματα ταυτοποιήθηκε ως το γονίδιο που κωδικοποιεί την κιτρική συνθάση, ένζυμο που εντοπίζεται στα μιτοχόνδρια. Η προέλευσή του αυτή δεν δικαιολογεί την παρουσία του στη cDNA βιβλιοθήκη του εντόμου, αν και σε άλλες μελέτες έχει διαπιστωθεί ότι πάνω από το 40% των τυχαίων cDNA κλώνων αντιστοιχούσαν σε μιτοχονδριακές αλληλουχίες (Li et al, 1998).

Οι απομονωμένοι κλώνοι αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες οι οποίες, δυνητικά, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου. Για παράδειγμα, θα ήταν δυνατή η δημιουργία διαγονιδιακών εντόμων στα οποία η δράση των συγκεκριμένων πρωτεϊνών θα παρεμποδίζεται ή θα ενισχύεται ανάλογα, έτσι ώστε να περιοριστούν οι πληθυσμοί του εντόμου. Συγκεκριμένα, η υπερέκφραση της πρωτεΐνης CDK5 θα έχει σαν αποτέλεσμα τη συσσώρευση μορίων νευροδιαβιβαστών και τελικά τον θάνατο των ατόμων εξαιτίας νευρικού σοκ. Στην περίπτωση της *hsp70*, η

αναστολή της δράσης της είναι δυνατόν να οδηγήσει στη δημιουργία μη λειτουργικών πρωτεϊνών, επηρεάζοντας με τον τρόπο αυτό τη φυσιολογική ανάπτυξη του εντόμου. Όσον αφορά την τροπομοσίνη, ο παρεμποδισμός δράσης της σε εμβρυϊκό επίπεδο, θα έχει σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία μη βιώσιμων απογόνων λόγω αναπτυξιακών δυσμορφιών, ενώ η αναστολή της N-ακετυλογλυκοζαμίνης θα αποτρέψει τον σχηματισμό της χιτίνης και επομένως του εξωσκελετού του εντόμου επηρεάζοντας τη βιωσιμότητά του. Επιπλέον, σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ταυτοποίηση μιας πολυπρωτεΐνης του ιού *sacbrood* στη cDNA βιβλιοθήκη, καθώς οι πληροφορίες σχετικά με τους ιούς που προσβάλλουν το έντομο είναι περιορισμένες. Ο τύπος του νουκλεϊκού οξέος του ιού (RNA ιός) μπορεί να δικαιολογήσει τον εντοπισμό του γενετικού του υλικού, καθώς είναι πιθανό να απομονώθηκε μαζί με το mRNA του δάκου κατά τη δημιουργία της cDNA βιβλιοθήκης. Ωστόσο, από οικολογικής άποψης, δεν αποκλείεται και η περίπτωση της οριζόντιας μεταφοράς του γενετικού υλικού του ιού και ακολούθως η ενσωμάτωσή του στο γονιδίωμα του δάκου. Το ενδεχόμενο αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό στοιχείο στις μελέτες των φυλογενετικών σχέσεων των πληθυσμών του εντόμου αλλά και της εξελικτικής του πορείας, όπως τα μεταθετά στοιχεία *Minos* ή *mariner* στην *C. capitata* (Gomulski et al, 1997).

Ο προσδιορισμός της θέσης των γονιδίων που υποδηλώνουν οι κλώνοι που απομονώθηκαν, μέσω της *in situ* υβριδοποίησης στους βραχίονες των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του εντόμου, δίνουν νέες προοπτικές στις μελέτες φυσικής χαρτογράφησης του γονιδιώματός του. Γενετικές αναλύσεις στο γονιδίωμα της *C. capitata* (5.4×10^8 bp) είχαν σαν αποτέλεσμα τη δημιουργία γενετικού χάρτη, καθορίζοντας τη θέση 67 μικροδορυφορικών και 16 μορφολογικών δεικτών (Stratikoroulios *et al.*, submitted). Με βάση το μέγεθος του γονιδιώματος και της συχνότητας των ανασυνδυασμών που παρατηρούνται (>1200 cM), έγινε δυνατή η συσχέτιση μεταξύ φυσικής και γενετικής απόστασης, η οποία εκτιμήθηκε ίση με ~ 500 kb/cM. Αναλογικά με τα παραπάνω δεδομένα, για να επιτευχθεί ένας χάρτης μέτριας ανάλυσης (medium resolution map) στο γονιδίωμα του δάκου (5.4×10^8 bp), σύμφωνα με τον οποίο η σχετική απόσταση μεταξύ των δεικτών θα είναι ίση με 10 cM,

πρέπει να είναι διαθέσιμοι τουλάχιστον 108 δείκτες. Παρεμφερείς υπολογισμούς μπορούμε να κάνουμε βασισμένοι στη γενετική ανάλυση του γονιδιώματος του *Anopheles gambiae* (2.6×10^8 bp), όπου έχει καθοριστεί η θέση 131 μικροδορυφορικών δεικτών. Η γενετική απόσταση μεταξύ των δεικτών αυτών υπολογίστηκε ίση με 1.6 cM, η οποία σύμφωνα με απλούς υπολογισμούς αντιστοιχεί σε $\sim 2 \times 10^6$ bp (Zheng et al, 1996). Αναλογικά με τα παραπάνω δεδομένα, για να επιτευχθεί ένας χάρτης παρόμοιας ανάλυσης στο γονιδίωμα του δάκου (5.4×10^8 bp), πρέπει να είναι διαθέσιμοι τουλάχιστον 270 δείκτες. Σήμερα, στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρεται η χαρτογράφηση μόνο 10 δεικτών (Mavragani-Tsipidou et al, 2002) γεγονός που καθιστά επιτακτική τη βελτίωση των κυτταρογενετικών χαρτών μέσω του εμπλουτισμού τους με μορφολογικούς και άλλους μοριακούς δείκτες. Τα αποτελέσματά μας συνεισφέρουν προς την κατεύθυνση αυτή. Επιπλέον, ο μη εντοπισμός των EST δεικτών στα πολυταινικά χρωμοσώματα, πιθανόν να υποδηλώνει ότι τα αντίστοιχα γονίδια εδράζονται στα φυλετικά χρωμοσώματα, τα οποία δεν εμφανίζουν το φαινόμενο της πολυταινίας. Επόμενως, είναι δυνατόν να εξασφαλιστούν νέες πληροφορίες στα πλαίσια της μελέτης των γονιδίων φυλοκαθορισμού, η οποία αναμένεται να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στη δημιουργία γενετικά τροποποιημένων στελεχών, που θα χρησιμοποιηθούν σε νέες στρατηγικές βιολογικού ελέγχου ή ακόμα και στη βελτίωση της ήδη υπάρχουσας μεθόδου SIT.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Διάλυμα αντισωμάτων

- 1/1000 αραιώση (750 mU/ml) των Anti-dig αντισωμάτων σε Διάλυμα 2 (αναλογία: 1 μl αντισωμάτων / 1 ml Διαλύματος 2)

Διάλυμα *dig* υβριδισμού

- 5X SSC
- 1 % Blocking Reagent
- 0.1 % Sarcosyl
- 0.02 % SDS

Διάλυμα FSB

Για τελικό όγκο 1 L χρησιμοποιούνται:

- 10 ml Potassium acetate 1 M, pH 7.5 [Τελική συγκέντρωση (F_C) = 10 mM]
- 8.91 gr $MnCl_2 \times 4 H_2O$ [F_C = 45 mM]
- 1.47gr $Ca Cl_2 \times 2 H_2O$ [F_C = 10 mM]
- 7.46 gr KCl [F_C = 100 mM]
- 0.8 gr Hexammincobalt chloride [F_C = 3 mM]
- 100 ml Glycerol 10%.

Για τη συμπλήρωση του τελικού όγκου προσθέτονται 800 ml H_2O και το pH ρυθμίζεται στο 6.4.

Διάλυμα I

- 50 mM γλυκόζη
- 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 10 mM EDTA (pH 8.0)

Διάλυμα II

- 0.2 N NaOH
- 1% SDS

Διάλυμα III

- 60 ml 5M CH₃COOK
- 11.5 ml CH₃COOH
- 28.5 ml H₂O

LB Broth υγρό θρεπτικό μέσο

Για τελικό όγκο 1L με pH 7.2 χρησιμοποιούνται:

- 15gr LB Broth [10 gr/L Tryptone, 5 gr/L εκχύλισμα ζύμης]
- 10 gr NaCl
- απιονισμένο H₂O

Το διάλυμα αποστειρώνεται και σε θερμοκρασία 55°C προστίθεται το αντιβιοτικό σε αναλογία 100 μl/ 100 ml LB.

Loading buffer (Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων)

- 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης
- 0.25% xylene cyanol FF
- 15% Ficoll (type 400; Pharmacia)

Μονιμοποιητικό διάλυμα

- οξικό οξύ
- απιονισμένο H₂O
- γαλακτικό οξύ σε αναλογία v/v/v 4.5/ 3/ 2

Διάλυμα Ringer

Για τελικό όγκο 1L χρησιμοποιούνται:

- 6.5 gr NaCl
- 0.14 gr KCl
- 0.2 gr NaKCO₃
- 0.12 gr CaCl₂
- 0.01 gr NaH₂PO₄ (pH 6.8)

SOB υγρό θρεπτικό μέσο

Για τελικό όγκο 1 L) χρησιμοποιούνται:

- 20 gr Tryptone,
- 5 gr Εκχύλισμα ζύμης,
- 0.5 gr NaCl 1M,
- 10 ml KCl 250 mM,
- 950 ml ddH₂O.

Ακολουθεί αποστείρωση και στη συνέχεια προσθήκη 5 ml MgCl₂ 2M και συμπλήρωση με ddH₂O μέχρι τα 1000ml.

SOC υγρό θρεπτικό μέσο

Όμοια σύσταση με το υγρό θρεπτικό μέσο SOB για τελικό όγκο 1 L, με επιπλέον προσθήκη μετά την αποστείρωση 20 ml γλυκόζης 1M.

Διάλυμα SSC 20X

Για τελικό όγκο 1L με pH 7-8 χρησιμοποιούνται:

- 175.3 gr NaCl
- 88.2 gr κιτρικό νάτριο
- απιονισμένο H₂O

TBE Buffer (0.5X)

Για τελικό όγκο 1L χρησιμοποιούνται:

- 54gr Tris-base,
- 27.5gr βορικό οξύ
- 20ml EDTA 0.5M
- απιονισμένο H₂O

Ρύθμιση pH στο 8.0 με NaOH.

Διάλυμα TE-Rnase (20μg/ml)

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)
- 1mM EDTA (pH 8.0)
- 20 μg RNase

Διάλυμα χρώσης

- 35 μl X-phosphate (50 mg/ml)

35 μl NBT (100 mg/ml) σε 10 ml Διαλύματος αντισωμάτων

Διάλυμα 1

- 100 mM Tris-HCl (pH 7.5)
- 150 mM NaCl

Διάλυμα 2

- 0.5% Blocking Reagent μέσα σε Διάλυμα 1

Διάλυμα 3

- 100 mM Tris-HCl (pH 9.5)
- 100 mM NaCl
- 50 mM MgCl₂

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ashburner, M. & J.J. Bonner, 1979 The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. *Cell* 17: 241–254.
- Augustinos A.A., Stratikopoulos E.E., Zacharopoulou A., Mathiopoulos K.D. (2002) Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Molecular Ecology Notes*, 2: 278–280.
- Augustinos A.A., Mamuris Z., Stratikopoulos E.E., D'Amelio S., Zacharopoulou A. & K.D. Mathiopoulos (2005) Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*, 125: 231–241.
- Benos P., Tavernarakis N., Brogna S., Thireos G., Savakis C. (2000) Acquisition of a potential marker for insect transformation: isolation of a novel alcohol dehydrogenase gene from *Bactrocera oleae* by functional complementation in yeast. *Mol. Gen. Genet.*, 263 (1): 90-5.
- Bueno A.M., Jones O. (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC wprs Bulletin* Vol. 25.
- Casey D. (1992) Primer on molecular Genetics. Doe Human Genome 1991-92 Program Report.
- Clarke A.R., Armstrong K.F., Carmichael A.E. et al (2005) Invasive phytophagous pests arising through a recent tropical evolutionary radiation: the *Bactrocera dorsalis* complex of tropical fruit flies. *Annual Review of Entomology*, 50: 293–319.
- Denholm I. & Rowland M.W. (1992). Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 91–112. Powell. CRC Press.
- Frizzi G. & Springetti A., (1953) Prime ricerche citogenetiche sul "Dacus oleae Gmel". *Ric. Sci.*, 23: 1613–1620.
- Gariou-Papalexiou A., Gourzi P., Delprat A., Kritikou D., Rapti K., Chrysanthakopoulou B., Mintzas A. & Zacharopoulou A. (2002) Polytene chromosomes as tools in genetic analysis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genetica*, 116: 59-71.
- Gelehrter T.D., Collins F.S., Ginsburg D. (2003) Αρχές Ιατρικής Γενετικής. Ιατρικές Εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδης.

- Ghosh R.C., Ball B.V., Willcocks M.M., Carter M.J., (1999) The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-likevirus. *J. Gen. Virol.*, 80: 1541-9.
- Gomulski L.M., Torti C., Malacrida A.R., Gasperi G. (1997) *Ccmar*, a full-length *mariner* element from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Insect Molecular Biology*, 6 (3): 241-253.
- Gupta S.C., Siddique H.R., Saxena D.K., Chowdhuri D.K. (2005) Hazardous effect of organophosphate compound, dichlorvos in transgenic *Drosophila melanogaster* (hsp70-lacZ): Induction of hsp70, anti-oxidant enzymes and inhibition of acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1725: 81 – 92.
- Economopoulos A.P. (1972). Sexual competitiveness of g-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. *Environmental Entomology* 1: 490-497.
- Economopoulos P. & Loukas M. (1986) ADH allele frequency changes in olive fruit fly shift from olives to artificial larval food and vice versa, effect of temperature. *Entomol. Exp. Appl.*, 40: 215-221.
- Hellmich M.R., Kennisonb J.A., Hamptona L.L., Battey J.F. (1994) Cloning and characterization of the *Drosophila melanogaster* CDKS homolog. *FEBS Letters*, 356: 317-321.
- IAEA (1998) Genetic engineering technology for the improvement of the sterile technique. Proceedings of a final Research Co-ordination Meeting Food and Agriculture. Viena, 21-25 November 1994.
- Koukidou M., Klinakis A., Reboulakis C., Zagoraiou L., Tavernarakis N., Livadaras I., Economopoulos A., Savakis C. (2006) Germ line transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transgenesis marker. *Insect Molecular Biology*, 15 (1): 95–103.
- Krimbas .B., (1963) A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Trypetidae): the salivary gland and mitotic chromosomes. *Caryologia*, 16: 371–376.
- Lagos D., Ruizb M. F., Sanchez L., Komitopoulou K. (2005) Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining Sex-lethal and doublesex genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 348: 111 –121.

- Lewin B. (2004) *Genes VIII*, Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα.
- Li W. and Gao F.-B. (2003) Actin filament-stabilizing protein tropomyosin regulates the size of dendritic fields. *The Journal of Neuroscience*, 23 (15): 6171-6175.
- Li S., Liu N., Zadworny D., Kuhnlein (1998) Genetic variability in white Leghorns revealed by chicken liver Expressed Sequence Tags. *Poultry Science*, 77: 134-139.
- Matthews B.F., Devine T.E., Weisemann J.M., Beard H.S., Lewers K.S., MacDonald M.H., Park Y.B., Maiti R., Lin J.J., Kuo J., Pedroni M.J., Cregan P.B., Saunders J.A. (2001) Incorporation of sequenced cDNA and genomic markers into the Soybean genetic map. *Crop Sci.*, 41: 516–521.
- Mavragani-Tsipidou P., Karamanlidou G., Zacharopoulou A., Koliais S. & Kastritsis C.D., (1992). Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genome*, 35: 373–378.
- Mavragani-Tsipidou P., (2002) Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*, 116: 45– 57.
- Mazomenos B.E., 1989. Mating pheromones: *Dacus oleae*, pp. 169–177 in *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3B, edited by A.S. Robinson & G.H.S. Hooper. Elsevier, Amsterdam.
- Montiel Bueno A., Jones O. (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants West Palearctic Regional Section (IOBC/WPRS) Bulletin*, 25: 1–11.
- Nardi F., Carapelli A., Dallai R., Roderick G.K., Frati F. (2005) Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* (2005) 14: 2729–2738.
- Vossen P., Varela L. and Devarenne A. (2005) *Olive Fruit Fly*. University of California Cooperative Extension.
- Rice R.E. (1999) Olive fruit fly, *Bactrocera* (*Dacus*) *oleae*. *UC Plant Protection Quarterly*, 9: 2.
- Rice R.E., Phillips P.A., Stewart-Leslie J., Sibbett G.S. (2003) Olive fruitfly populations measured in central and southern California. *California Agriculture*, 57: 122–127.

- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stratikopoulos E.E., Augustinos A.A., Petalas Y.G., Vrachatis M.N., Mintzas A., Mathiopoulos K.D., Zacharopoulou A. (Submitted). A genetic map of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, based on microsatellite markers.
- Stryer L. (1997) Βιοχημεία. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.
- Tetzlaff M.T., Jackle H. and Pankratz M.J. (1996) Lack of *Drosophila* cytoskeletal tropomyosin affects head morphogenesis and the accumulation of oskar mRNA required for germ cell formation. *The EMBO Journal*, 15 (6): 1247-1254.
- Τριανταφυλλίδης Κ. (2001) Κλασσική και Μοριακή Γενετική. Εκδόσεις Αδελφών Κυριακίδη.
- Tzanakakis M.E. (1989) Small-scale Rearing. *Dacus oleae* (Gmelin), pp. 105–118 in *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3B, edited by A.S. Robinson & G.H.S. Hooper. Elsevier, Amsterdam.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2001) Fruit Fly Cooperative Control Program: Final Environmental Impact Statement, 2001. USDA Marketing and Regulatory Programs, Animal and Plant Health Inspection Service, Riverdale, Maryland.
- Vontas J.G, Hejazi M.J., Hawkes N.J., Cosmidis N., Loukas M. and Hemingway J. (2002) Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology*, 11(4): 329–336.
- Weems H.V. and Nation J.L. (2003) Olive Fruit Fly, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (Insecta:Diptera: Tephritidae) Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. <http://creatures.ifas.ufl.edu>.
- Wesierska-Gadek J., Gueorguieva M., Horky M. (2003) Dual action of cyclin-dependent kinase inhibitors: induction of cell cycle arrest and apoptosis. A comparison of the effects exerted by roscovitine and cisplatin. *Pol. J. Pharmacol.*, 55: 895-902.
- Zambetaki A., Kleanthous K. & Mavragani-Tsipidou P. (1995) Cytogenetic analysis of Malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of

Bactrocera oleae (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). *Genome*, 38: 1070–1081.

Zambetaki A., Zacharopoulou A., Scouras Z.G. & Mavragani-Tsipidou P. (1999) The genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: localization of molecular markers by in situ hybridization to salivary gland polytene chromosomes. *Genome*, 42: 740–751.

Zambetaki A., Mavragani-Tsipidou P. & Scouras Z.G. (2000). Heat shock response of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) genes and proteins. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 93: 648–652.

Zheng L., Benedict M. Q., Cornel A. J., Collins F. H., Kafatos F. C. (1996) An integrated genetic map of the african human malaria vector mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genetics*, 143: 941-952.

Zouros E. & Loukas M. (1989) Biochemical and colonization genetics of *Dacus oleae* (Gmelin), pp. 75–87 in *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*, Vol. 3B, edited by A.S. Robinson & G.H.S. Hooper. Elsevier, Amsterdam.

Δικτυακοί τόποι:

<http://www.elialadi.gr>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/mapping.html>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/est.html>