

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: Ι. Α. ΤΣΙΤΣΙΠΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ
& ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
Αριθ. Πρωτοκ. 162
Ημερομηνία 19-9-2001

Τίτλος : "Προκαταρτική μελέτη της εφαρμογής της μεθόδου RT-PCR
για την εκτίμηση της ενδοειδικής γενετικής παραλλακτικότητας
στο είδος *Myzus persicae* (Homoptera, Aphididae)."

ΚΑΤΣΑΡΟΥ ΦΩΤΕΙΝΗ
ΑΜ: 0496019

Ν. ΙΩΝΙΑ, ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ. 2001



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

Αριθ. Εισ.: 11/Δ

Ημερ. Εισ.: 02-08-2003

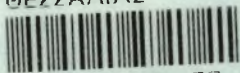
Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ

2001

ΚΑΤ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070077

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ι. Α. Τσιτσιπής : Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Π.Θ.

**Δ. Κουρέτας : Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος
Γεωπονίας Π.Θ.**

Π. Λόλας : Καθηγητής Τμήματος Γεωπονίας Π.Θ.

Αφιερωμένο στην μνήμη του Θωμά.

Πρόλογος

Αντικείμενο της παρούσας εργασίας είναι η εφαρμογή μιας τροποποιημένης μεθόδου, βασιζόμενη στη μέθοδο προσδιορισμού της γονιδιακής έκφρασης Differential Display RT-PCR, στο είδος της αφίδας *Myzus persicae* (Sulzer).

Η πτυχιακή διατριβή αποτελείται από δυο μέρη, το γενικό και το ειδικό. Στο γενικό μέρος, δίνονται πληροφορίες για το είδος *M. persicae* και τη μέθοδο Differential Display RT-PCR, σύμφωνα με την υπάρχουσα βιβλιογραφία. Στο ειδικό μέρος περιγράφονται αναλυτικά οι πειραματικές εργασίες που διεξήχθησαν εν μέρει στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας και εν μέρει στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Ζωικών Οργανισμών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, αναπτύσσονται τα αποτελέσματα και γίνεται συζήτηση αυτών.

Ευχαριστίες

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον επιβλέποντα Καθηγητή μου Ι. Α. Τσιτσιπή για τη βοήθεια και την πολύτιμη καθοδήγηση. Ευχαριστίες εκφράζονται στον διδάκτορα Ι. Μαργαριτόπουλο του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Φυτικής και Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη βοήθεια του κατά τη διάρκεια της εργασίας. Πολλές ευχαριστίες εκφράζονται στον Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Δ. Κουρέτα για την βοήθεια του και την προσφορά των επιστημονικών γνώσεων του. Επίσης, ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στη Γεωπόνο Κεφαλογιάννη Θηρεσία Μ. Sc, στον υποψήφιο διδάκτορα Κωνσταντίνο Ζάρπα, όπως και στους μεταπτυχιακούς φοιτητές Γουντουδάκη Σταυρούλα και Νικολακάκη Νικόλαο για τη βοήθεια και συμπαράσταση που μου προσέφεραν. Τέλος, ευχαριστώ πολύ την οικογένεια μου, τους φίλους μου και όσους με την αγάπη τους στήριξαν την προσπάθεια μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη.....	7
---------------	---

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή	9
2.Το είδος <i>myzus persicae</i> (sulzer).	10
3.Οι φυλές του είδους <i>myzus persicae</i> (sulzer).	14
4.Τα νουκλεϊκά οξέα	17
5.Το RNA	18
6.Το mRNA	23
7.Μεθοδοί μετρησης της γονιδιακής έκφρασης.....	25
8.Η μέθοδος Differential Display των mRNA.	27
9.PCR.....	29
10. Η αυτοραδιογραφία.	33
11. Σκοπος της εργασίας.	35

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.	37
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	38
2.1. Εκτροφη.....	38
2.2. Απομονωση.....	40
2.3. Επίδραση DNAase I στο ολικό RNA.	42
2.4. Συνθεση cDNA.....	43
2.5. PCR	44
2.6. Ηλεκτροφορηση.....	47
2.7. Χρωση νιτρικού αργυρου.....	47
3. Αποτελεσματα.....	49
4. Συζήτηση – συμπερασματα.	59
Βιβλιογραφία	63

Περίληψη

Το DNA αποτελεί το γενετικό κώδικα κάθε κυττάρου. Με τη διεργασία της μεταγραφής σε RNA, τα γονίδια εκφράζονται και ρυθμίζουν τις λειτουργίες των διαφόρων ιστών. Το mRNA είναι ο φορέας των γενετικών πληροφοριών από τον πυρήνα στο κυτόπλασμα, όπου αυτές εκφράζονται. Συχνά, μεταξύ κυτταρικών πληθυσμών προερχόμενα από διαφορετικά άτομα του ίδιου είδους παρατηρούνται διαφορές. Η μέθοδος Differential Display (DD) εκτιμά τη διαφορετική γονιδιακή έκφραση, ανιχνεύοντας και ταυτοποιώντας τα διαφορετικά εκφρασμένα mRNAs.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εφαρμογή της μεθόδου Differential Display και εφαρμογή της στο είδος *Myzus persicae*, λόγω της δυσκολίας διαχωρισμού με άλλη μέθοδο των αφίδων που τρέφονται στον καπνό από εκείνους που προέρχονται από άλλους ξενιστές.

Οι αφίδες είναι έντομα με μεγάλη οικονομική σημασία και εξαιρετική μορφολογική ποικιλομορφία. Η μορφολογική διάκριση της φυλής που αποικίζει τον καπνό από τη φυλή που αποικίζει άλλους ξενιστές είναι εξαιρετικά δύσκολη.

Τροποποιήσαμε την κλασσική μέθοδο DD-PCR μη χρησιμοποιώντας ραδιενέργεια αυξάνοντας την ευκολία χρήσης της, το κόστος και το χρόνο διεξαγωγής των πειραμάτων.

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Εισαγωγή

Οι αφίδες είναι γνωστές ως μια ομάδα εντόμων με εξαιρετική μορφολογική ποικιλομορφία.

Ανήκουν στην τάξη Homoptera και στην οικογένεια Aphididae. Είναι μικρόσωμα έντομα, με μαλακό σώμα συνολικού μήκους 1-10 mm. Τα πόδια τους είναι λεπτά με διάρθρους ταρσούς. Οι κεραίες έχουν 3-6 άρθρα. Στα νώτα του πέμπτου κοιλιακού δακτυλίου, φέρουν ένα ζεύγος εξαρτημάτων, των σιφωνίων που αποτελούν τον εκφορητικό αγωγό φερομόνης συναγερμού. Στο τέλος του σώματος τους, υπάρχει μια απόφυση γνωστή ως ουρίτσα ή ουρά (cauda), (Τζανακάκης 1998).

Είναι πολυμορφικοί οργανισμοί, παράγοντας εντός του είδους πολλές διαφορετικές μορφες με διαφορετικούς ρόλους στο βιολογικό τους κύκλο. Η διαμόρφωση της μορφολογίας τους επηρεάζεται σε αξιοσημείωτο βαθμό από περιβαλλοντικούς παράγοντες, (Blackman & Eastop, 1985).

Ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης των αφίδων είναι οι μέτριες θερμοκρασίες και η υψηλή σχετική υγρασία.

Οι αφίδες αποτελούν έναν από τους σοβαρότερους εχθρούς των περισσότερων καλλιεργούμενων φυτών. Διατρέφονται με τρυφερούς βλαστούς και φύλλα μυζώντας μεγάλη ποσότητα χυμού. Δημιουργούν πυκνές αποικίες παρθενογενετικά. Ο αριθμό γενεών αυτού του εντόμου, ανά έτος, μπορεί να ξεπεράσει τις 10. Μεταφέρουν και μεταδίδουν φυτοπαθογόνους ιούς με έμμοно, ημιέμμοно και μη έμμοно τρόπο. Ρυπαίνουν το φυτό και ευνοούν την ανάπτυξη των μυκήτων της καπνιάς απεκκρίνοντας μελιτώδεις ουσίες.

Τα κοινά ονόματα των εντόμων αυτών είναι αφίδες, μελίγκρες, ψύλλοι, ψείρες, φυτοφθείρες, μέλερη (Τζανακάκης 1998).

Οι σημαντικότεροι φυσικοί εχθροί των αφίδων είναι αρπακτικά των οικογενειών Chrysopidae και Hemerobiidae της τάξης Νευρόπτερα, Coccinellidae της τάξης Κολεόπτερα, Syrphidae της τάξης Δίπτερα και παρασιτοειδή των οικογενειών Braconidae, Proctotrypidae, Aphidiidae της τάξης Υμενόπτερα.

2. Το είδος *Myzus persicae* (Sulzer).

Ταξινομική θέση: Το είδος *Myzus persicae* ανήκει στην τάξη Homoptera, στην υπεροικογένεια Aphidoidea, στην οικογένεια Aphididae, στην υποοικογένεια Aphidinae (Blackman & Eastop 1985). Στο βιβλίο “Catalogue des Aphididae du monde”(Georges & Marc Remaudière 1997) καταγράφονται περισσότερα από 30 συνώνυμα ονόματα του είδους. Στον Πίνακα 1 παραθέτονται ορισμένα από αυτά.

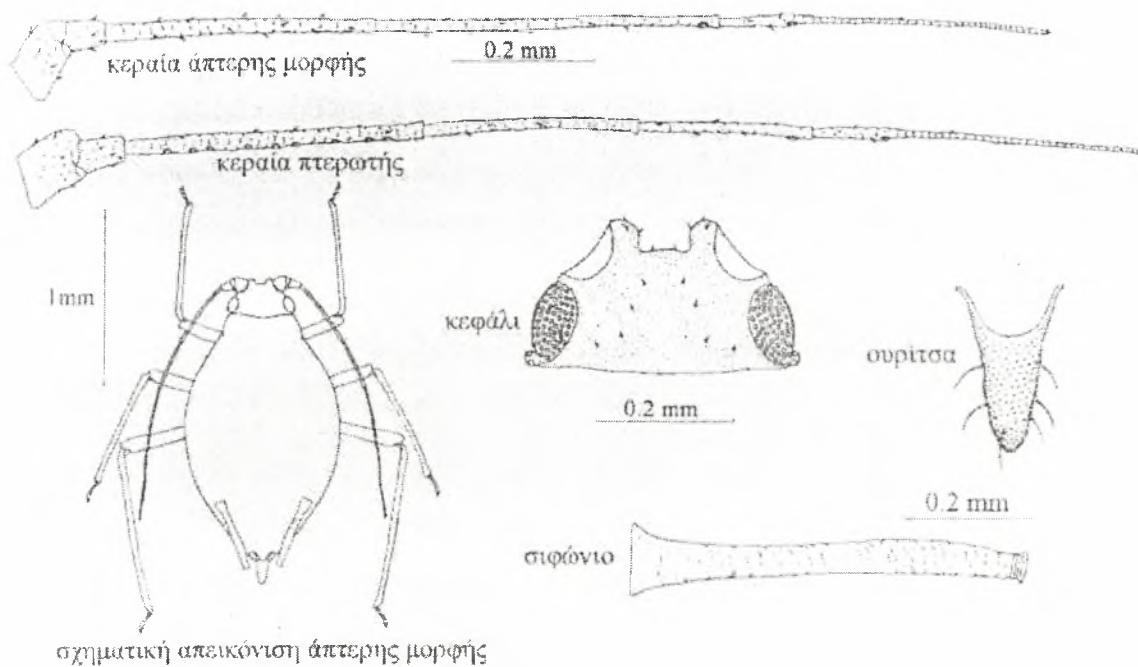
Πίνακας 1. Συνώνυμα ονόματα του είδους *M. persicae* (Georges & Marc Remaudière 1997).

<i>Siphonophora achyrantes</i> Monell in Riley & Monell (1879)
<i>Rhopalosiphum betae</i> Theobald (1913)
<i>Myzus callae</i> Koch (1854)
<i>Siphonophora calendulella</i> Monell in Riley & Monell (1879)
<i>Aphis consors</i> Walker (1848)
<i>Aphis cymbalariae</i> Schouteden (1900)
<i>Aphis cynoglossi</i> Williams (1911)
<i>Aphis deposita</i> Walker (1848)
<i>Aphis derelicta</i> Walker (1849)
<i>Aphis dianthi</i> Schrank (1801)
<i>Aphis dubia</i> Curtis (1842)
<i>Aphis egressa</i> Walker (1849)
<i>Rhopalosiphum galeactitis</i> Macchiati (1883)
<i>Rhopalosiphum lactucellum</i> Theobald (1914)
<i>Macrisiphum lophospermum</i> Theobald (1914)
<i>Macrisiphum lycopersicella</i> Theobald (1914)
<i>Myzus malvae</i> Oestlund (1886)
<i>Myzus nicotianae</i> Blackman (1987)

<i>Siphonophora nasturtii</i> Koch (1855)
<i>Myzus pergandii</i> Sanderson (1901)
<i>Myzus persicae</i> subsp. <i>Dyslycialis</i> F. P. Müller (1955)
<i>Myzus persicae</i> var. <i>potrulacella</i> Theobald (1926)
<i>Myzus persicae</i> var. <i>sanguisorbiella</i> Theobald (1926)
<i>Myzus persicae</i> var. <i>tuberoscellae</i> Theobald (1926)
<i>Aphis particeps</i> Walker (1845)
<i>Aphis persicae</i> Morren (1836)
<i>Aphis persicophila</i> Rondani (1860)
<i>Aphis persola</i> Walker (1848)
<i>Aphis rapae</i> Curtis (1842)
<i>Aphis rebundans</i> Walker (1849)
<i>Aphis vastator</i> Smee (1846)
<i>Aphis vulgaris</i> Kyber (1815)
<i>Rhopalosiphum trilineatum</i> Guercio (1920)
<i>Rhopalosiphum tulipae</i> Thomas (1879)
<i>Myzodes tabaci</i> Mordvilko (1914)

Περιγραφή: Τα ενήλικα άπτερα άτομα είναι μικρού έως μεσαίου μεγέθους, χρώματος θαμπού ομοιόμορφου υπόλευκου πράσινου, ωχρού κιτρινοπράσινου, γκρι-πράσινου, μεσαίου πράσινου, ροζ ή κόκκινου, πολύστικτου βαθύ πράσινου ή βαθύ κόκκινου έως πορφυρού, σε κρύες συνθήκες. Το μήκος του σώματος άπτερων και πτερωτών μορφών κυμαίνεται από 1,2-2,3 mm. Τα σιφώνια είναι μακριά και λεπτά μήκους 0,4 mm χωρίς να ξεπερνούν την άκρη της κοιλιάς. Η ουρίτσα είναι στενόμακρη μήκους 0,2 mm και με τρία ζεύγη τριχών (Blackman & Eastop, 1984). Οι πτερωτές μορφές στο κέντρο της ράχης τους φέρουν μια μαύρη κηλίδα (Τζανακάκης 1998).

Σχηματική απεικόνιση της άπτερης μορφής του είδους αποτελεί η Εικόνα 1.



Εικόνα 1. Σχηματική απεικόνιση του είδους *M. persicae*.

Ξενιστές: Ο κύριος ξενιστής είναι κυρίως η ροδακινιά *Prunus persicae* L, κάποιες φορές τα είδη *Prunus nigra*, *Prunus tanella*, και ενδεχομένως το είδος *Prunus serotina* και υβρίδια ροδακινιάς – αμυγδαλιάς (Blackman & Eastop 1985). Δευτερεύοντες ξενιστές αποτελούν πάνω από 40 διαφορετικές οικογένειες φυτών και περισσότερα από 400 είδη φυτών. Ενδεικτικά ορισμένες οικογένειες είναι : *Rosaceae*, *Rutaceae*, *Solanaceae*, *Malvaceae*, *Compositae*, *Chenopodiaceae*, *Umbelliferae* και *Cruciferae*.

Γεωγραφική κατανομή: Η εξάπλωση του είδους είναι παγκόσμια. Πιθανή περιοχή καταγωγής του η Ασία όπως και ο κύριος ξενιστής, η ροδακινιά, (Blackman & Eastop 1985).

Βιολογία: Ετερόοικο ολοκυκλικό είδος μεταξύ των *Prunus* και των δευτερευόντων ξενιστών, αλλά ανολοκυκλικό σε πολλά μέρη του κόσμου όπου η ροδακινιά είναι απύσα ή οι κλιματικές συνθήκες του χειμώνα επιτρέπουν

την επιβίωση των εντόμων (Blackman & Eastop 1985). Είναι ετερόζυγο είδος σε όλο τον κόσμο (Blackman et al. 1978), με αριθμό χρωμοσωμάτων $2n = 12$.

Οι ολοκυκλικοί πληθυσμοί διαχειμάζουν ως χειμερινά ωά, 4-6 ανά θηλυκό, στους οφθαλμούς, σε εσοχές και γενικά σε προστατευόμενα μέρη του φλοιού των κύριων ξενιστών, της ροδακινιάς και των άλλων πυρηνοκάρπων, (Τζανακάκης 1998). Την άνοιξη, η εκκόλαψη των αυγών δίνει άπτερα παρθενογενετικά άτομα, τα λεγόμενα θεμελιωτικά (fundatrices). Οι δυο επόμενες γενεές ολοκληρώνουν την ανάπτυξή τους στον ίδιο ξενιστή και έπειτα, μεταναστεύουν σε ποώδη φυτά, τους δευτερεύοντες ξενιστές. Στη διάρκεια της βλαστικής περιόδου παράγονται διαδοχικές παρθενογενετικές γενεές. Το φθινόπωρο ή αρχές του χειμώνα παράγονται πτερωτά θηλυκά άτομα, τα θηλυτόκα (gynoparae) και αρσενικά άτομα που μεταναστεύουν στον πρωτεύοντα ξενιστή, τη ροδακινιά ή τα αλλά πυρηνόκαρπα. Από τα θηλυτόκα θα προέλθουν θηλυκά άτομα (Ωτοτόκα ή oniparae) ικανά να συζευχθούν με τα αρσενικά άτομα και θα εναποθέσουν τα διαπαύοντα ωά.

Οι ανολοκυκλικοί πληθυσμοί αναπαράγονται παρθενογενετικά όλες τις εποχές του έτους χωρίς να χρειάζεται να γεννηθούν χειμερινά ωά. Σε ψυχρές περιοχές δύναται να αναπτυχθούν ανολοκυκλικοί κλώνοι σε προστατευμένους χώρους, όπως τα θερμοκήπια (Müller 1954, 1958, Waldhauer 1953, 1957, Uan Emben et al. 1969, Blackman 1971).

Το είδος *M. persicae* είναι ανθεκτικό στο κρύο. Μπορεί να αναπτυχθεί σε θερμοκρασίες από 5°C έως 30°C . Τα θηλυκά, στους 25°C , ζουν κατά μέσο όρο 25 ημέρες και γενούν 60 προνύμφες (Rinpay 1962).

Ζημιές: Οι τρυφεροί βλαστοί και τα νεαρά φύλλα είναι τα κυρίως προσβαλλόμενα όργανα του φυτού. Εξαιτίας της νύξης τα προσβεβλημένα φύλλα συστρέφονται. Επίσης, τα άφθονα μελιτώδη απεκκρίματα τους ρυπαίνουν φύλλα και καρπούς. Σημαντικότερη όμως, είναι η έμμεση ζημία που προκαλεί καθώς μεταδίδει αποτελεσματικά περισσότερες από 100 ιούς φυτών (Kennedy et al. 1962). Οι σημαντικότεροι ιοί που μεταδίδονται με έμμονο τρόπο είναι οι ακόλουθοι: ο ιός του ήπιου κιτρινίσματος των τεύτλων

(BMV), ο ιός της παραμόρφωσης των νεύρων του καπνού (TVDV), ο ιός του καρουλιάσματος των φύλλων μπιζελιού (PLRV), ο ιός του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας (PLRV) (Blackman & Eastop 1984). Επίσης, ιδιαίτερα σημαντικοί είναι και οι μη έμμονοι ιοί του κίτρινου μωσαϊκού της κοινής κολοκυθιάς (ZYMV), του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), της κίτρινης στιγματώσεως της κολοκυθιάς (ZYFV), του Y της πατάτας (PVY) και του A της πατάτας (PVA), (Brunt et al.), που μεταδίδονται από το είδος *M. persicae* (Sulzer).

3. Οι φυλές του είδους *Myzus persicae* (Sulzer).

Στο είδος *M. persicae* ανήκουν δυο φυλές. Η φυλή που τρέφεται στον καπνό και η φυλή που έχει περισσότερους από έναν ξενιστή. Η μορφολογική διάκριση των ατόμων των δυο φυλών είναι δύσκολη, αλλά η οικονομική σημασία τους είναι εξίσου σημαντική.

Το 1987 ο Blackman διεξήγαγε μορφολογικές μελέτες σε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων της αφίδας *M. persicae*. Τα δείγματα συλλέχθηκαν από διάφορα φυτά ξενιστές από τέσσερις ηπείρους. Παρατήρησε, πως τα δείγματα που προέρχονταν από τον καπνό *Nicotiana tabacum* L. παρουσίαζαν ορισμένα μορφολογικά γνωρίσματα ικανά να διακρίνουν την φυλή που τρεφόταν στον καπνό. Τα ιδιαίτερα αυτά γνωρίσματα θεωρήθηκαν σταθερά και ότι ελέγχονται από μια σειρά γονιδιακών θέσεων. Οι πληθυσμοί που τρέφονται στον καπνό, θεωρήθηκαν ότι ήταν ανολοκυκλικοί. Συνεπώς, δεν μπορούν να συζευχθούν με άτομα του είδους *M. persicae*. Με βάση τα παραπάνω στοιχεία, οι τρεφόμενες στον καπνό μορφές περιγράφηκαν ως ένα νέο είδος, το *Myzus nicotianae* Blackman (Blackman 1987). Στην ίδια μελέτη, παραθέτονται αποδείξεις που εδραιώνουν την γενετική απομόνωση των δυο φυλών.

Ο βιολογικός κύκλος του νέου είδους, φαίνεται να παρουσιάζει αξιόλογη ποικιλομορφία. Σε πολλές περιοχές, όπου καλλιεργείται ο καπνός, η φυλετική αναπαραγωγή του είδους είναι πιθανώς εξ' ολοκλήρου ανύπαρκτη (Blackman

& Spence 1992). Σε άλλες όμως περιοχές, όπως η Ιαπωνία και η Κεντρική Ασία απαντώνται τόσο ολοκυκλικοί όσο και ανολοκυκλικοί πληθυσμοί της αφίδας *M. persicae* που τρέφονται σε καπνό (Zagoronskii 1947, Kolesova et al. 1980, Takada 1986). Στην Ελλάδα, κλώνοι που συλλέχθηκαν από καπνό βρέθηκαν ότι μετανάστευσαν από τη ροδακινιά *P. persicae* (Blackman & Spence 1992). Παράλληλα, στη Βόρεια Ελλάδα, όπου καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά, βρέθηκε υψηλό ποσοστό ολοκυκλικών κλώνων του *M. persicae* σε καπνό και άλλους ξενιστές, (Μαργαριτόπουλος και Τσιτσιπής, αδημοσίευτα δεδομένα).

Το 1992 οι Blackman & Spence διεξάγοντας έρευνα στα είδη *M. persicae* και *M. nicotiana* μελέτησαν το ένζυμο GOT-1 (glutamate oxoacetate transaminase). Βρήκαν πως το *M. persicae* είναι μονομορφικό, ενώ το *M. nicotiana* είναι πολυμορφικό, με δυο μορφές ελαφρώς διαφορετικής κινητικότητας. Ο πολυμορφισμός αυτός αποδεικνύει κατά 90% την διάκριση των ειδών.

Το 1994 τα αποτελέσματα της έρευνας των Field et al. (1994) φέρονται αντικρουόμενα με αυτά της έρευνας των Blackman & Spence (1992). Οι Field et al. (1994) μελέτησαν την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα των δυο φυλών. Διερεύνησαν το μηχανισμό των εστερικών βάσεων και βρήκαν ότι οφείλεται σε δυο γονίδια τα E4 και FE4. Τα δυο αυτά γονίδια υπάρχουν στο γονιδίωμα τόσο στο *M. persicae* όσο και στο *M. nicotiana*.

Επίσης, τα αποτελέσματα της εργασίας των Margaritopoulos et al. (1998) παραθέτουν στοιχεία ομοιότητας των δυο φυλών. Οι Margaritopoulos et al. (1998) έκαναν RAPD ανάλυση σε ένα μεγάλο αριθμό κλώνων των δυο φυλών. Τα αποτελέσματα της μελέτης των RAPD ζωνών του μοντέλου ανάλυσης, δείχνουν πως δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ *M. persicae* και *M. nicotiana*.

Απεναντίας, μορφολογικές μελέτες από τους Margaritopoulos et al. (2000) στο είδος *M. persicae* αποκαλύπτουν στοιχεία ικανά να διακρίνουν τις δυο φυλές με κάποια σχετική ακρίβεια. Συγκεκριμένα, διεξήχθησαν μορφολογικές μελέτες σε εννέα χαρακτηριστικά 157 κλώνων του είδους *M. persicae* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και την Ιταλία. Πραγματοποίησαν αναλύσεις

πολλαπλών μεταβλητών (canonical variate analysis) για να εξετάσουν την επίδραση του φυτού ξενιστή στη μορφολογία της αφίδας. Διαπίστωσαν πως οι μορφές που τρέφονται στον καπνό είναι γενικά ευδιάκριτες από εκείνες που προέρχονται από άλλους ξενιστές, υποδηλώνοντας πως οι διαφορές είχαν γενετική βάση. Οι Clement et al. (2000) εφαρμόζοντας την μέθοδο RAPD-PCR σύγκριναν τη *M. persicae* και *M. nicotianae* με τρία άλλα είδη του γένους *Myzus* (*M. cerasi* F., *M. hemerocallis* Takahashi και *M. varians* Davinson.). Ο πολυμορφισμός που παρατηρήθηκε δεν ήταν ικανός να διαχωρίσει του πληθυσμούς των *M. persicae* και *M. nicotianae* ούτε ανάλογα με την περιοχή προέλευσης (ΗΠΑ, Ευρώπη, Ιαπωνία) ούτε με το φυτό ξενιστή (καπνός ή άλλος φυτό). Στην ίδια μελέτη, η έμμεση μέθοδος (GC-MS) ανάλυση των υδρογονανθράκων του δερματίου (cuticular analysis), αποκάλυψε ενδοειδικές διαφορές εντός του συμπλόκου *M. persicae*, που δεν διαχωρίζουν τους πληθυσμούς από καπνό ή άλλο ξενιστή. Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε πως και οι δυο αφίδες παρουσιάζουν παγκόσμια διάδοση και μεγάλη ποικιλία στο χρώμα του σώματός τους (Takada 1979, Lampert & Dennis 1987). Ακόμη, η έρευνα των Blackman & Spence (1992) έδειξε πως σε συνθήκες εργαστηρίου οι δυο φυλές είναι δυνατόν να διασταυρωθούν. Επίσης, διερευνήθηκε το rDNA (rDNA fingerprinting) (Fenton et al. 1998b) και η διάσπαση των γονιδίων του είδους *M. persicae* (Field et al. 1994, Fenton et al. 1998a, Clement et al. 2000) αποκαλύπτοντας διαφορές σε επίπεδο πληθυσμού στο σύμπλοκο *M. persicae* όχι όμως διαφορές μεταξύ των ειδών. Συνεπώς, το *M. nicotianae* δεν μπορεί να θεωρείται ως νέο είδος, αλλά ως φυλή προσαρμοσμένη στον καπνό. Την άποψη προωθεί ο Blackman πρόσφατα (Ι. Τσιτσιπής, προσωπική επικοινωνία).

Το νουκλειικό οξύ RNA σε αντίθεση με το DNA μεταφέρει γενετικές πληροφορίες που εκφράζονται σε πρωτεΐνες. Προηγούμενες μελέτες του DNA των δυο φυλών του είδους *M. persicae* δεν κατάφεραν να βρουν αδιάσειστα στοιχεία διαχωρισμού τους. Δεδομένου ότι, το RNA είναι φορέας γενετικών πληροφοριών που άμεσα εκφράζονται σε πρωτεΐνες θεωρήθηκε πως η διερεύνησή του θα μπορούσε να διασαφηνίσει πιθανόν υπάρχουσες διαφορές.

4. Τα Νουκλεϊκά Οξέα

Τα νουκλεϊκά οξέα είναι φορείς γενετικών πληροφοριών. Υπάρχουν δυο κατηγορίες νουκλεϊκών οξέων το ριβοζονουκλεϊκό οξύ ή (RNA) και το δεοξυριβοζονουκλεϊκό οξύ ή (DNA). Το DNA περιλαμβάνει το κληρονομικό υλικό των κυττάρων, στα οποία περιέχονται όλες οι απαραίτητες οδηγίες για τη λειτουργία του κυττάρου. Το πρώτο γενετικό υλικό των οργανισμών πιθανολογείται ότι ήταν το RNA. Το DNA είναι σταθερότερη μορφή μορίου και πιθανότατα προήλθε από το RNA σαν ένα είδος αποθηκευτικής μορφής των γενετικών πληροφοριών από το οποίο παράγεται η πιο ασταθής μορφή, το RNA, όταν χρειάζεται να παραχθούν πρωτεΐνες, (Γούναρης 2000).

Τα νουκλεϊκά οξέα απομονώθηκαν για πρώτη φορά από τον Miescher 1870 από τον πυρήνα ενός πύδους κυττάρου, (from the nuclei of pus cell). Το όνομα τους οφείλεται στη χημική του σύνθεση, είναι οξέα, και στο ότι προσδιορίστηκαν αρχικά στον πυρήνα. Τα νουκλεϊκά οξέα είναι μακρομοριακές αλυσίδες μεγάλου μήκους. Δομικές μονάδες των αλυσίδων είναι τα νουκλεοτίδια, μοριακές ενώσεις αποτελούμενες από μια πεντόζη, ριβόζη ή δεοξυριβόζη, μια φωσφορική ομάδα και μια αζωτούχο βάση, πουρίνη ή πυριμιδίνη. Στο σχηματισμό ενός νουκλεϊκού οξέος λαμβάνουν μέρος συνήθως τέσσερα νουκλεοτίδια, (Villev et al 1989).

Στη σύνθεση του DNA λαμβάνουν μέρος η δεοξυριβόζη, οι πουρίνες αδενίνη (A) και γουανίνη (G), οι πυριμιδίνες κυτοσίνη (C) και θυμίνη (T) και η φωσφορική ομάδα. Το RNA δομείται από την ριβόζη, τις πουρίνες αδενίνη (A) και γουανίνη (G), τις πυριμιδίνες κυτοσίνη (C) και ουρακίλη (U) και την φωσφορική ομάδα. Εκτός αυτών των κυριότερων βάσεων, σε σπάνιες περιπτώσεις απαντώνται και άλλες, όπως για παράδειγμα η υποξανθίνη στο RNA και η 5-μεθυλοκυτοσίνη στο DNA.

Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων σχηματίζουν μια γραμμική αλυσίδα νουκλεοτιδίων συνδεδεμένα με ομοιοπολικούς δεσμούς μεταξύ της φωσφορικής ομάδας του ενός μορίου με το νουκλεοζίτη του άλλου μορίου. Οι δεσμοί αυτοί ονομάζονται φωσφοδιεστερικοί. Νουκλεοζίτης ονομάζεται η

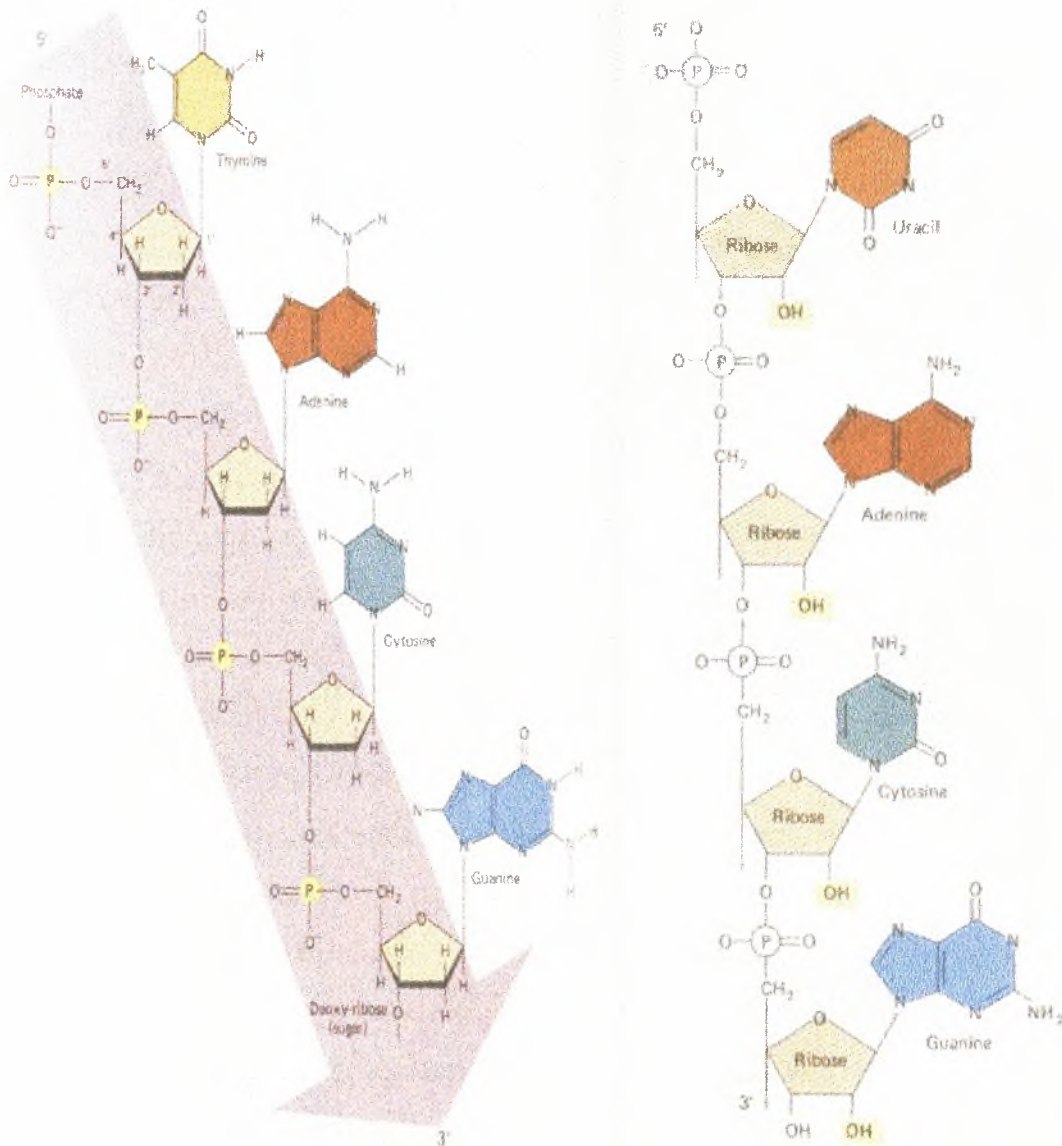
ένωση της βάσης με την πεντόζη. Δεοξυριβονουκλεοζίτης ονομάζεται η ένωση στην περίπτωση που η πεντόζη είναι δεοξυριβόζη, ενώ ριβονουκλεοζίτης όταν είναι ριβόζη. Οι αζωτούχες βάσεις σχηματίζουν μεταξύ τους δεσμούς υδρογόνου, (Γούναρης 2000,).

Το DNA είναι μόριο διπλής αλυσίδας σπανίως και παροδικώς συναντώμενο σαν μόριο απλής αλυσίδας. Η αλυσίδα λαμβάνει μορφή δεξιόστροφης Β-έλικας, (Γούναρης 2000). Οι δυο αλυσίδες έχουν αντιπαράλληλη κατεύθυνση και περιελίσσονται η μια γύρω από την άλλη, σχηματίζοντας μια δίκλωνη έλικα (Αρσενάκης 1990).

5.Το RNA

Η γοητεία του RNA είναι ότι μπορεί να πάρει μυριάδες διαφορετικές δομές και να παίξει εξαιρετικά διαφορετικούς ρόλους μέσα στο κύτταρο (Gesteland and Atkins 1993). Παρά του ότι, δομείται μόνο από τέσσερα όμοια νουκλεοτίδια, το RNA είναι ιδιαίτερα σημαντικό μόριο, μεταφέροντας γενετικές πληροφορίες από το DNA, τις οποίες μεταφράζει σε βιολογικές λειτουργίες.

Η πρωτοταγής δομή του μονόκλωνου RNA είναι σχεδόν όμοια με του DNA. Δυο βασικά στοιχεία διαφοροποιούν τα δυο μόρια. Η δομική πεντόζη είναι ριβόζη αντί δεοξυριβόζη και η οργανική βάση ουρακίλη, αντικαθίσταται από μια διαφορετική πυριμιδίνη, την 5- μεθυλιωμένη ουρακίλη, που ονομάζεται θυμίνη, (Γούναρης 2000). Η χημική δομή των δυο μορίων φαίνεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα. 1. Σχηματική απεικόνιση των δυο μορίων. Η χημική δομή του DNA (αριστερά) και η χημική δομή του RNA (δεξιά). (Τροποποιημένο από Vilee et al 1989, Biology).

Σε μερικούς ιούς το RNA παίζει διπλό ρόλο, του αγγελιοφόρου και του φορέα των γενετικών πληροφοριών. Στις περιπτώσεις αυτές το RNA είναι δίκλωνο ή μονόκλωνο. Είναι σημαντικό να σημειωθεί, πως η απλή έλικα του RNA μπορεί να ενωθεί με την συμπληρωματική απλή έλικα του DNA και να δημιουργηθεί μια διπλή έλικα DNA:RNA, (Αρσενάκης 1990, Μοριακή Βιολογία).

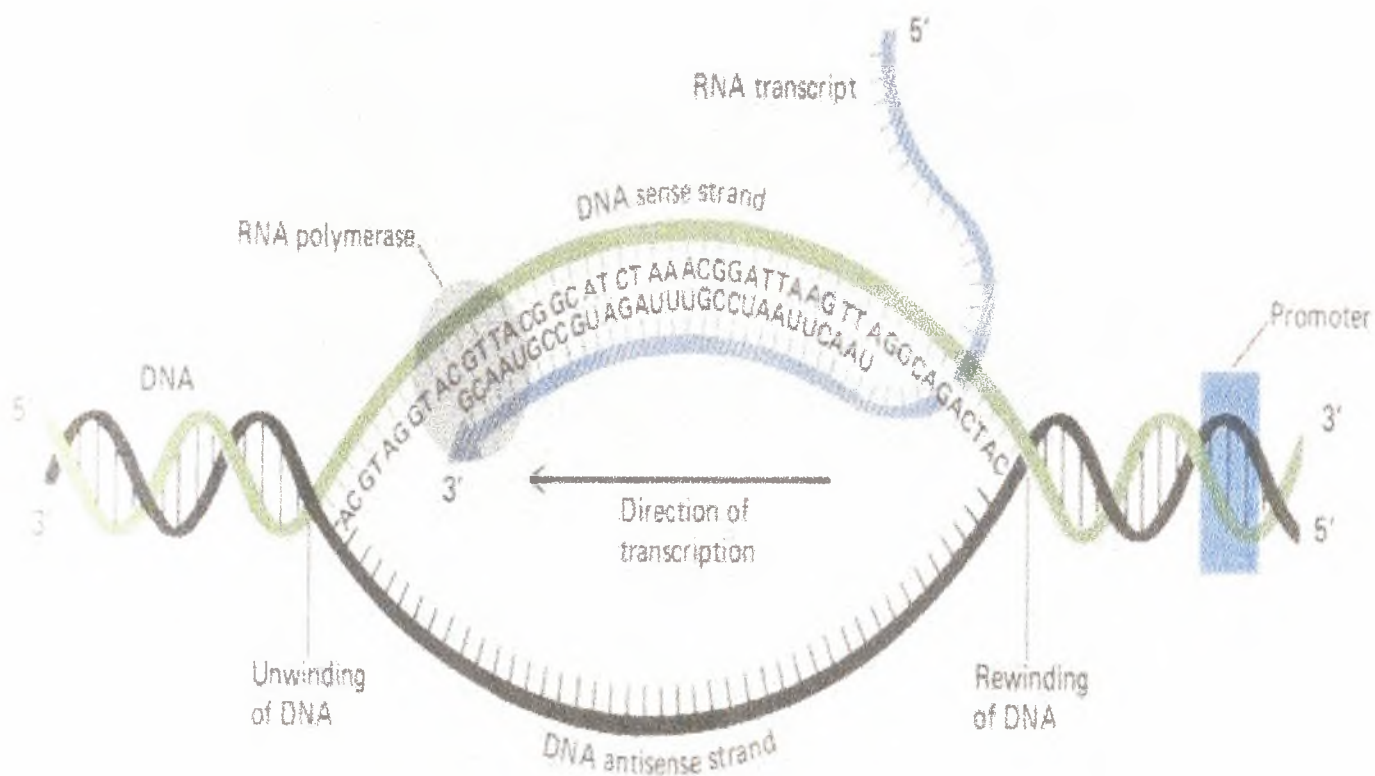
RNA μπορεί να ενωθεί με την συμπληρωματική απλή έλικα του DNA και να δημιουργηθεί μια διπλή έλικα DNA:RNA, (Αρσενάκης 1990).

Στο περισσότερο μήκος της η αλυσίδα του RNA είναι διπλή. Αναδίπλωση του μορίου μπορεί να φέρει απέναντι από κάθε αδενίνη μια ουρακίλη και απέναντι από κάθε γουανίνη μια κυτοσίνη. Τα ζεύγη αυτά είναι στερεομορφής cis και ονομάζονται ζεύγη Watson-Crick. Στα σχηματιζόμενα ζεύγη αδενίνης-ουρακίλης (AU), οι δυο βάσεις συγκρατούνται με δυο δεσμούς υδρογόνου και ονομάζονται συμπληρωματικές βάσεις. Τα ζεύγη συμπληρωματικών βάσεων γουανίνη - κυτοσίνη (GC) έχουν τρεις δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων και συγκρατούνται ισχυρότερα. Αν αρκετά τέτοια ζεύγη σχηματίζονται σε μια περιοχή του μορίου του RNA και ιδιαίτερα αν είναι διαδοχικά χωρίς διακοπές από μη συμπληρωματικές βάσεις, τότε η περιοχή αυτή παραμένει σαν διπλή αλυσίδα (ds RNA). Οι περιοχές διπλής αλυσίδας είναι ελικοειδείς και ονομάζονται A-έλικες, (Γούναρης 2000).

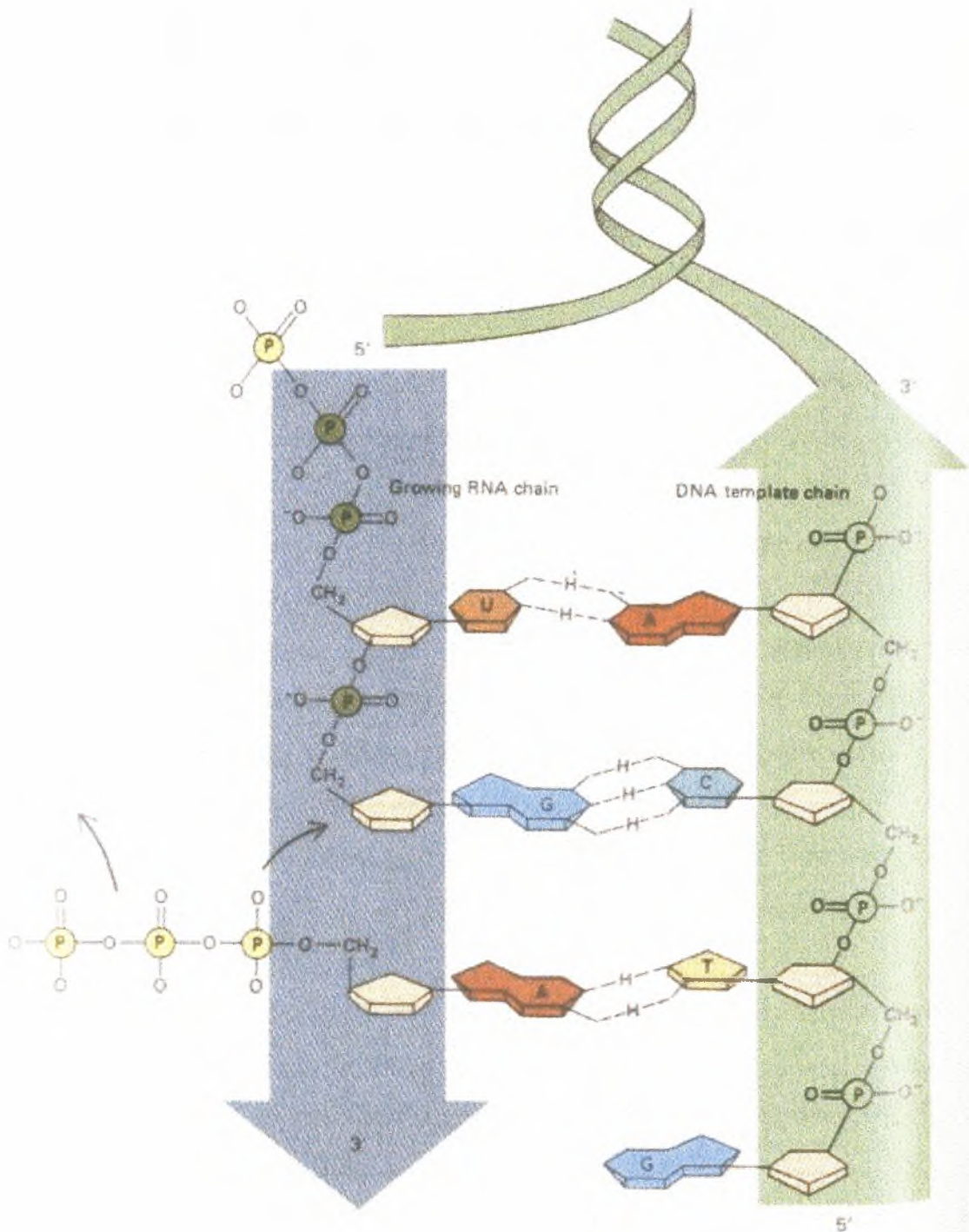
Το RNA παράγεται από το DNA με τη διαδικασία που ονομάζεται μεταγραφή. Η σύνθεση των μορίων του RNA γίνεται από το ένζυμο RNA πολυμεράση χρησιμοποιώντας το DNA ως εκμαγείο. Γίνεται σε ειδικές περιοχές ονομαζόμενες προαγωγείς και απαιτεί αρκετές βοηθητικές πρωτεΐνες ονομαζόμενες παράγοντες μεταγραφής (transcription factors, TF). Αν το DNA είναι διπλή αλυσίδα ανοίγει σε μια περιοχή 10-12 βάσεων και η μια από τις αλυσίδες, ονομαζόμενη κωδικοποιούσα ή + αλυσίδα, χρησιμεύει σαν εκμαγείο καθορίζοντας τη σειρά προσθήκης νουκλεοτιδίων για σύνθεση RNA. Αφού διατρέξει όλη την κωδικοποιούσα περιοχή η πολυμεράση, συναντά την ακολουθία λήξεως μεταγραφής, συχνά περιέχουσα παλινδρομικές ακολουθίες, όπου εγκαταλείπει το DNA πολλές φορές με τη βοήθεια και πάλι ειδικών πρωτεϊνικών παραγόντων. Το RNA συντίθεται πάντα με κατεύθυνση από το 5' προς το 3' άκρο.

Οι πληροφορίες για τη σύνθεση των πρωτεϊνών υπάρχουν σε ένα τμήμα της μιας μόνο έλικας του DNA (Σχήματα 2 - 3).

πληροφορίες στα ριβοσώματα όπου κυριαρχεί το ριβοσωμικό RNA, rRNA ως δομικό συστατικό. Εδώ το μεταφορικό (ή κωδικό) RNA, tRNA μεταγράφει τα νουκλεοτιδια σχηματίζοντας πολυπεπτιδική αλυσίδα.



Σχήμα 2. Η μεταγραφή του RNA γίνεται πάντα με κατεύθυνση 5'-3'.
(Τροποποιημένο από Villee et al 1989, Biology).



Σχήμα 3. Διάγραμμα της μεταγραφής του RNA. (Τροποποιημένο από Villee et al 1989, Biology)

6. Το mRNA

Η ακολουθία των διαφόρων άμινο-οξέων σε μια πρωτεΐνη καθορίζεται από την ακολουθία των βάσεων σε ένα RNA που είναι το mRNA για την πρωτεΐνη αυτή. Το ποσοστό του RNA, που είναι mRNA, είναι 1-5%. Η αλυσίδα ενός mRNA προσδέεται στο ριβόσωμα και εκεί κάθε τριάδα βάσεων " διαβάζεται " στην σειρά και καθορίζει ποιο θα είναι το επόμενο αμινοξύ που θα ενσωματωθεί στην επιμηκυνόμενη αλυσίδα της πρωτεΐνης, (Γούναρης 2000). Τέσσερα κοινά σημεία χαρακτηρίζουν τα mRNA των ευκαριωτικών κυττάρων.

- Το 5' άκρο τους έχει μια μεθυλιωμένη χημική ομάδα.
- Το 3' άκρο τους έχει μια σειρά αδερινών που ονομάζεται ουρά πολύ -A, με εξαίρεση τα mRNA των ιστονών.
- Τα περισσότερα mRNA είναι μικρότερα από τα πρωτογενή τους hnRNA. Τα mRNA αυτά ονομάζονται συρραμμένα ή διασυνδεόμενα (spliced) mRNA, λόγω της απουσίας αλληλουχιών του hnRNA στο mRNA.
- Συχνά κωδικοποιούν μια πρωτεϊνική αλυσίδα, είναι μονοκιστρονικά mRNA.

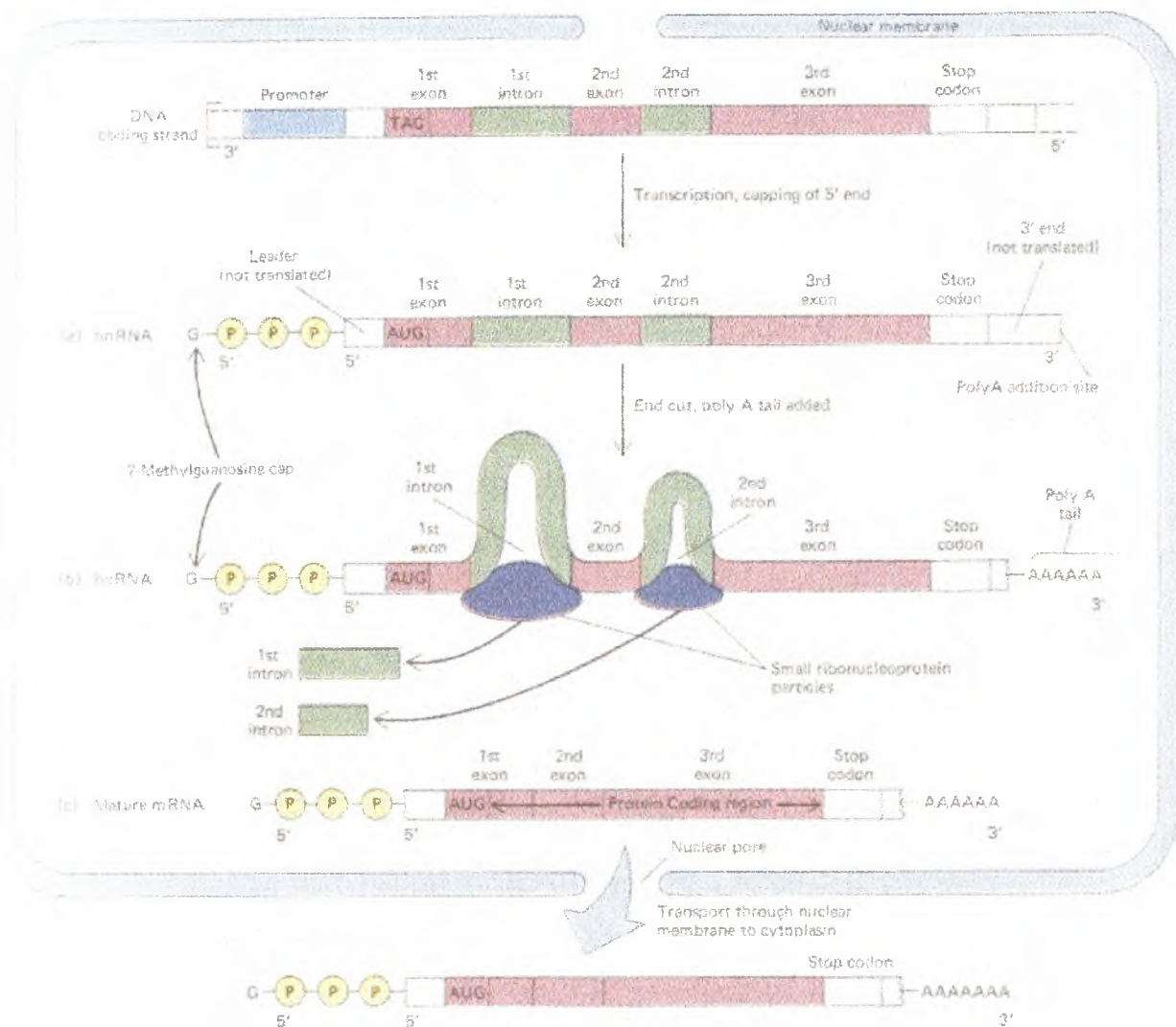
Η μεταγραφή του RNA από την RNA πολυμεράση II, αρχίζει από το νουκλεοτίδιο στο οποίο έχει προστεθεί το κάλυμμα μεθυλιωμένης γουανίνης (cap). Η γουανίνη έχει μια μεθυλική ομάδα στο άζωτο 7 της γουανίνης. Είναι συνδεδεμένη με κατεύθυνση 5' προς 3' στο πρώτο νουκλεοτίδιο του RNA. Ο πιο πιθανός λόγος ένωσης του σε αυτό το άκρο, είναι για να προστατεύσει το μήνυμα από κάθε είδους εκφυλισμό ή καταστροφή, που μπορεί να συμβεί, όμοια με τα μη προστατευμένα βακτηριακά μηνύματα. Αριστερά από το κάλυμμα μεθυλιωμένης γουανίνης, στην περιοχή -25 έως -30, βρίσκεται μια σειρά 25 έως 30 βάσεων με μορφή TATA, ονομαζόμενη κουτί TATA και καθορίζει το σημείο έναρξης της μεταγραφής, (Αρσενάκης 1990).

Η διαδικασία της μεταγραφής τερματίζεται στο κωδικόνιο λήξης. Η περιοχή μετά το κωδικόνιο λήξης είναι η 3' μη μεταγραφόμενη περιοχή

(3' ΜΜΠ). Στο 3' άκρο της έχει μια ουρά από αδερίνες. Οι ουρές αυτές από πολύ(A) δεν συναντώνται στα mRNA που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες ιστόνες στα μετάζωα. Κάθε πολυαδεϊκή ουρά αποτελείται από 100-250 βάσεις αδερίνης. Το κάλυμμα μεθυλιωμένης γουανίνης και η ουρά πολύ(A) προστίθεται στο mRNA εκ των υστέρων, (Γούναρης 2000).

Σε μερικές περιπτώσεις έχει ανιχνευθεί η παρουσία αλληλουχιών που επηρεάζουν τη μεταγραφή ποσοτικά. Οι αλληλουχίες αυτές ονομάζονται ενισχυτές και αυξάνουν την ποσότητα του παραγόμενου RNA. Η παρουσία τους δεν είναι απόλυτη σε όλες τις ευκαρυωτικές μονάδες μεταγραφής. Η δράση τους εξαρτάται από το κύτταρο ξενιστή, ενώ είναι ανεξάρτητο από τη θέση τους, την απόσταση και τη φορά τους.

Σε ορισμένα γονίδια έχουν παρατηρηθεί περιοχές που δεν κωδικοποιούνται. Οι περιοχές αυτές ονομάζονται ενδόνια *introns* (*intervening sequences*) και παρεμβάλλονται μεταξύ των περιοχών που εκφράζονται, εξώνια *exons* (*expressed sequences*). Όταν ένα γονίδιο περιέχει *introns* μεταγράφεται σε hnRNA. Το πρωτογενές hnRNA υποβάλλεται σε διαδικασία ωρίμανσης κατά την οποία «κόβονται», απομακρύνονται τα *introns* και «συρράπτονται», ενώνονται, τα *exons*. Η διαδικασία αυτή της διασύνδεσης μπορεί να γίνει με διάφορους μηχανισμούς. Στις περισσότερες περιπτώσεις, ως σύνδεσμοι χρησιμοποιούνται μικρά πυρηνικά ριβονουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα (snRNPs), τα οποία ενώνονται με τα *introns* καταλύοντας την αποκοπή και τη διασύνδεση των *exons* (Σχήμα 4).



Σχήμα 4. Η ωρίμανση του mRNA με αποκοπή των *introns* και την διασύνδεση των *exons*, (Τροποποιημένο από Vilee et al 1989, Biology).

Τα mRNA των προκαριωτικών κύτταρων είναι πιο ευσταθή από των προκαρυωτικών, με μέση διάρκεια ζωής να κυμαίνεται από 30 λεπτά έως 24 ώρες

7. Μέθοδοι μέτρησης της γονιδιακής έκφρασης.

Το DNA αποτελεί το γενετικό κώδικα κάθε κυττάρου. Η ακριβής γνώση της αλληλουχίας των βάσεων του όμως, δεν αρκεί στην κατανόηση της έκφρασης των γονιδίων και της ρύθμισης των λειτουργιών στους διάφορους ιστούς. Οι κυτταρικές λειτουργίες ουσιαστικά κατευθύνονται από τα

εκφρασμένα γονίδια. Συγκεκριμένα, από τα επίπεδα και το χρονοδιάγραμμα έκφρασής τους. Φορέας των εκφρασμένων γονιδίων είναι το mRNA.

Για την άμεση και παράλληλη παρακολούθηση του συνολικού αριθμού των mRNA ενός κυττάρου έχουν αναπτυχθεί διάφορες πειραματικές προσεγγίσεις (Church 1996). Ο προσδιορισμός αλληλουχίας cDNA βιβλιοθηκών (Adams et al. 1991, Okubo et al. 1992) είναι μια πρώτη προσέγγιση. Το μειονέκτημα αυτής έγκειται στην απουσία ευαισθησίας ταυτοποίησης σπάνιων mRNAs. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν μέθοδοι που εφαρμόζουν την τοποθέτηση πολλαπλών cDNAs σε μεμβράνες νάυλον (Meier-Ewert et al. 1993, Takahashi et al. 1995) ή σε τροποποιημένες υάλινες αντικειμενοφόρους πλάκες μικροσκοπίου (Schema et al. 1995). Άλλη πρόσφατη μέθοδος, βασίζεται στην υβριδοποίηση μικρών αλληλουχιών υψηλής πυκνότητας, τα οποία περιέχουν εκατοντάδες χιλιάδων συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων. Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων επιλέγεται με βάση ήδη γνωστές αλληλουχίες και η σύνθεσή τους επιτυγχάνεται με συνδυαστική χημεία. Ανιχνεύονται με βεβαιότητα RNAs, τα οποία απαντώνται με συχνότητα μέχρι 1:300.000, και επιτυγχάνεται η ταυτόχρονη και ποσοτική ανίχνευση δεκάδων χιλιάδων γονιδίων (Lockhart et al. 1996).

Οι μέθοδοι όμως που χρησιμοποιούνται συχνότερα για την ταυτοποίηση και κλωνοποίηση όλων των διαφορετικά εκφρασμένων mRNAs (differential expression cloning) είναι η Subtractive Hybridization (SH) (Lee et al. 1991), η Differential Display (DD) (Liang et al. 1992, Liang et al. 1993) και οι παραλλαγές της, η Electronic Subtraction (ES) (Okubo et al. 1992, Adams et al. 1993), η οποία περιλαμβάνει και τη μέθοδο Serial Analysis of Gene Expression (SAGE) (Velculescu et al. 1995).

Η Electronic Subtraction (ES) είναι ποσοτική μέθοδος και προσφέρει επαναληπτικότητα, αλλά ταυτοποιεί μόνον τα συχνά απαντώμενα mRNAs, δηλαδή ένα μικρό μέρος από τα μοναδικά mRNAs σε κάθε κυτταρικό τύπο.

Η Subtractive Hybridization (SH) ταυτοποιεί τόσο σπάνια όσο και συχνά mRNAs, με επαναληπτικότητα που εξαρτάται από τον πλεονασμό των

mRNAs. Επίσης, ταυτοποιεί είτε αυξήσεις, είτε μειώσεις στο mRNA. Απαιτεί μεγάλες ποσότητες RNA και είναι τεχνικά δύσκολη.

Η μέθοδος Differential Display (DD) ποσοτικά συγκρινόμενη με τις άλλες μεθόδους, αποδεικνύεται ως η πιο αποτελεσματική μέθοδος για τη μέτρηση της διαφορικής γονιδικής έκφρασης (Σωτηροπούλου 1997). Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτής της μεθόδου είναι ότι ταυτοποιεί σπάνια και συχνά απαντώμενα mRNAs με επαναληπτικότητα που εξαρτάται από τους εκκινητές. Απαιτεί ελάχιστες ποσότητες RNA για την παράθεση περισσοτέρων από 10.000 cDNAs. Μπορεί να ταυτοποιεί ταυτόχρονα αυξήσεις και μειώσεις στα επίπεδα mRNA σταθερής κατάστασης και τέλος, είναι σύντομη, αποδοτική και προσφέρει μεγαλύτερη ευαισθησία

8.Η μέθοδος Differential Display των mRNA.

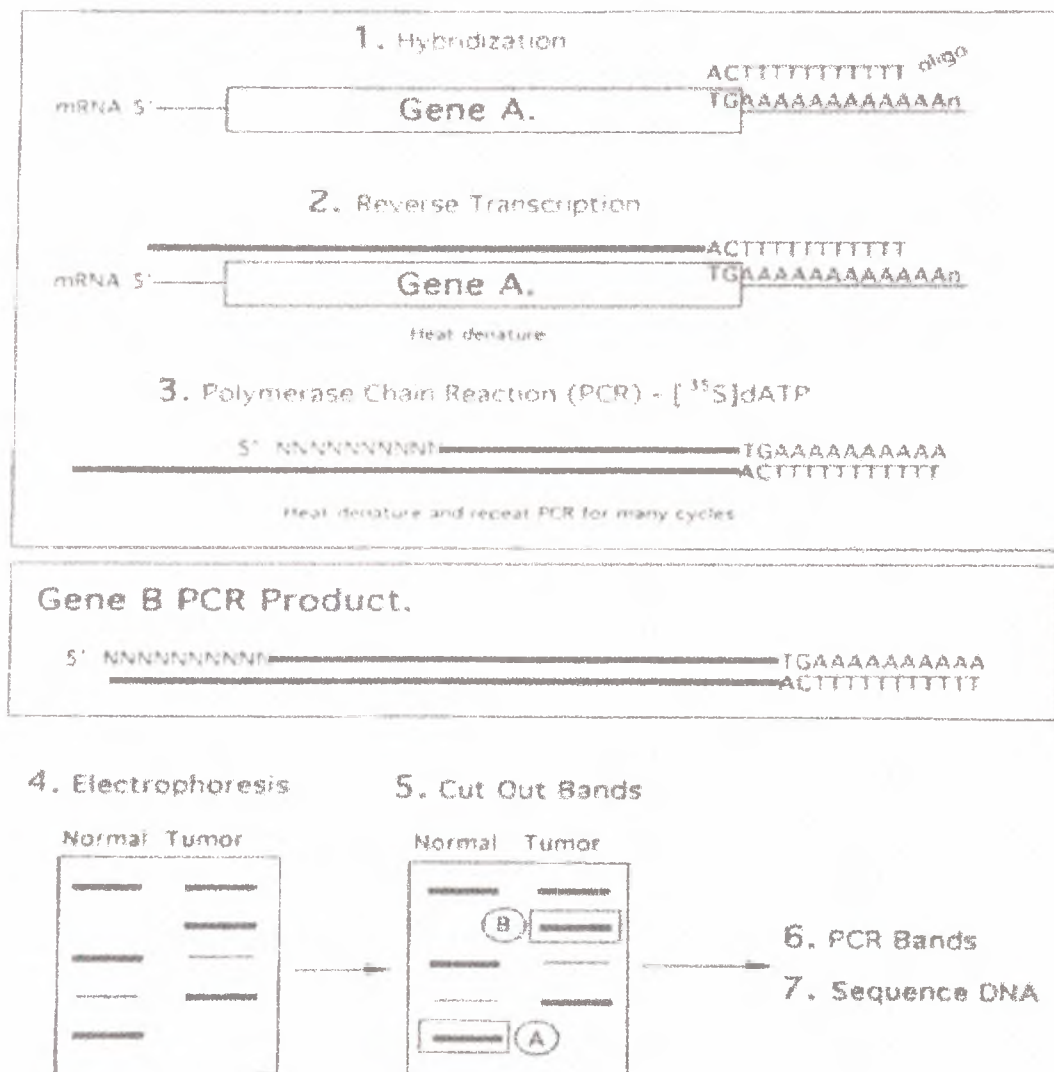
Η μέθοδος Differential Display PCR περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Liang και Pardee (1992) ως ένας τρόπος προσδιορισμού διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων.

Η βασική αρχή της μεθόδου είναι η ανίχνευση μόνον των εκφρασμένων γονιδίων, που αποτελούν το 10-15 % του συνολικού αριθμού των γονιδίων του γονιδιώματος, αξιοποιώντας την ουρά poly(A) που φέρει κάθε mRNA. Η μέθοδος στηρίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR) η οποία επιτρέπει την παράθεση σε πηκτική όλων των mRNAs ενός κυττάρου σαν κλάσματα cDNAs μήκους 200-1000 bp, τα οποία αντιστοιχούν στο 3'-ακρο του μεταγραφήματος.

Η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα να παρατεθούν τα mRNAs δυο ή περισσοτέρων κυτταρικών πληθυσμών δίπλα-δίπλα σε ένα πήκτωμα, να συγκριθούν και να ταυτοποιηθούν τα διαφορετικά εκφρασμένα cDNAs.

Η μέθοδος Differential Display (DD) μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τέσσερα στάδια. Στο πρώτο στάδιο, το ολικό RNA μετά από αντίδραση με DNAase, μεταγράφεται αντίστροφα σε τέσσερις παράλληλες αντιδράσεις με εκκινητές oligo dT (T₁₂MA, T₁₂MC, T₁₂MG, T₁₂MT, όπου M ένα εκφυλισμένο μείγμα

dA, dC, dG). Οι εκκινητές ανασυνδέονται στο 3'- άκρο των mRNAs και μοιράζουν τα 10.000 – 15.000 μοναδικά mRNAs σε τέσσερις ομάδες. Ακολούθως, τα cDNAs που προκύπτουν ενισχύονται με PCR παρουσία [³⁵S] dATP, με του ίδιους oligo dT εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστροφη μεταγραφή. Για το 5'- άκρο χρησιμοποιούνται δεκαμερής εκκινητές με τυχαία αλληλουχία. Στο τρίτο στάδιο, τα cDNAs αντιγράφονται πολλαπλώς σε 40 κύκλους PCR παρουσία [³⁵S] dATP. Τέλος, τα προϊόντα της PCR αναλύονται σε πήκτωμα προσδιορισμού αλληλουχίας DNA και παρατηρούνται με αυτοραδιογραφία. Κάθε ζώνη στην πηκτή περιέχει 50-100 cDNAs, τα οποία αντιστοιχούν σε αλληλουχίες mRNAs (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Σχηματική περιγραφή της μεθόδου Differential Display των mRNAs. (Τροποποιημένο από Σωτηροπούλου 1997)

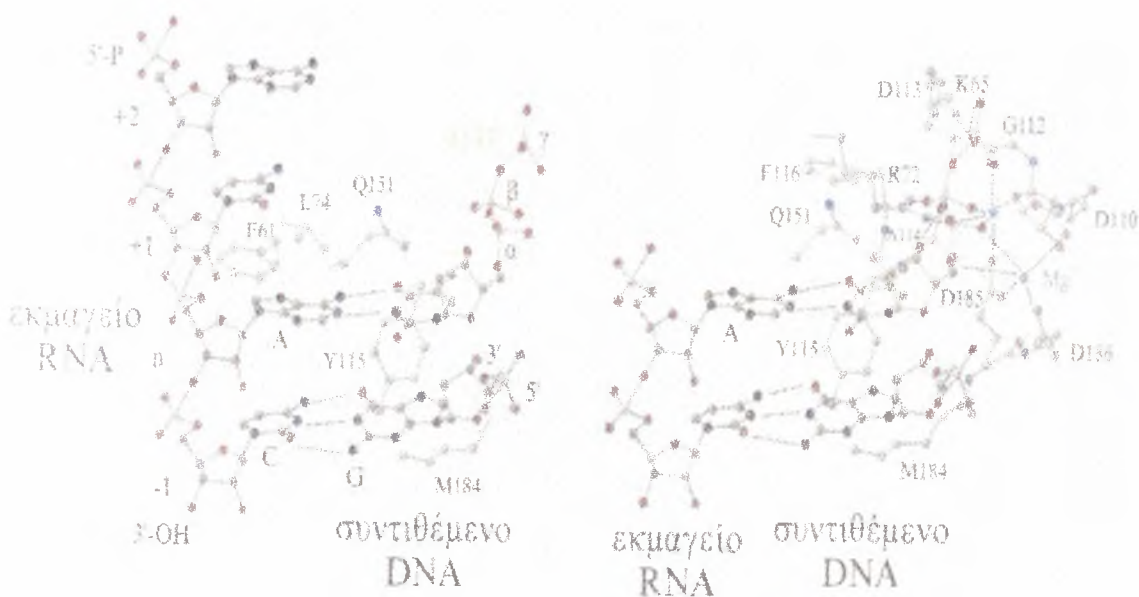
Με την ολοκλήρωση της μεθόδου Differential Display (DD), τα διάφορα cDNAs παραθέτονται απομονωμένα μέσα στο πήκτωμα. Μπορούμε εφαρμόζοντας τη μέθοδο *Northern* να ανακτήσουμε τα διαφορετικά εκφρασμένα cDNAs από το πήκτωμα, να τα κλωνοποιήσουμε και να προσδιορίσουμε την αλληλουχία τους. Έτσι επιβεβαιώνεται η διαφορετική έκφραση των cDNAs στα ίδια και σε άλλα κύτταρα. Το ολικό cDNA αγνώστων γονιδίων μπορεί να απομονωθεί από βιβλιοθήκες cDNA, να προβλεφθεί η πρωτοταγή αλληλουχία της κωδικής περιοχής της πρωτεΐνης και να ταυτοποιηθούν πιθανά λειτουργικά μοτίβα. Επίσης, μπορεί να παραχθεί η πρωτεΐνη ή αντισώματα έναντι αυτής, τα οποία να χρησιμοποιηθούν για τον υποκυτταρικό εντοπισμό, την απομόνωση και λειτουργική μελέτη της πρωτεΐνης. Ακόμη, μπορεί να απομονωθεί γενωμικό DNA για τη χρωμοσωμική χαρτογράφηση του γονιδίου.

Πρέπει να τονιστεί ότι, σημαντική προϋπόθεση για την επιτυχία της μεθόδου DD, είναι η σύγκριση κυττάρων του ίδιου τύπου, τα οποία έχουν αναπτυχθεί σε ίδιες συνθήκες. Έτσι, αποφεύγονται διαφορές στη γονιδιακή έκφραση που οφείλονται στις συνθήκες ανάπτυξης, σε πολυμορφισμούς και σε άλλες μη ειδικές διαφορές, (Σωτηροπούλου 1997).

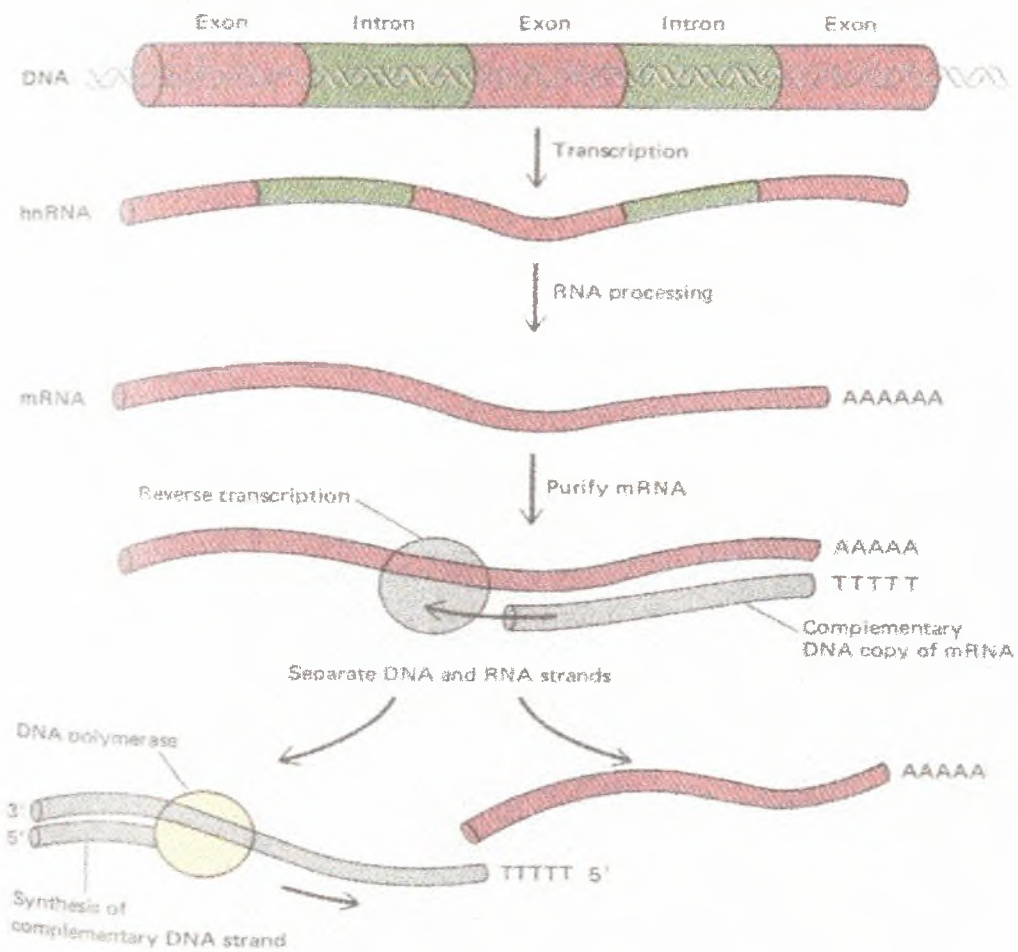
9.PCR.

Όπως προαναφέρθηκε, η μέθοδος στηρίζεται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR), η οποία επιτρέπει την παράθεση σε πηκτή όλων των mRNAs ενός κυττάρου σαν κλάσματα cDNAs. Η σύνθεση μιας αλληλουχίας συμπληρωματικού DNA (complementary DNA), cDNA γίνεται παρουσία του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση (reverse transcriptase, RT). Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί απλές αλυσίδες RNA για σύνθεση συμπληρωματικού DNA. Απέναντι από κάθε νουκλεοτίδιο του RNA τοποθετεί το συμπληρωματικό τριφωσφορικά δεοξυνουκλεοτίδιο. Τα δεοξυνουκλεοτίδια ενώνονται με φωσφοδιεστερικές γέφυρες παράγοντας το DNA. Το RNA δρα σαν εκμαγείο. Η σειρά των βάσεων του καθορίζει τη σειρά με την οποία θα προστεθούν τα δεοξυνουκλεοτίδια στην επιμηκυνόμενη

αποβάλλουν την γ - και β -φωσφορική ομάδα σαν πυροφωσφορικό οξύ (PPi), ενώ η α -φωσφορική ομάδα τους σχηματίζει την φωσφοδιεστερική γέφυρα με το προηγούμενο δεοξυνουκλεοτίδιο στο 3' άκρο του DNA, (Γούναρης 2000, Μοριακή Γενετική). (Σχήματα 6 - 7).

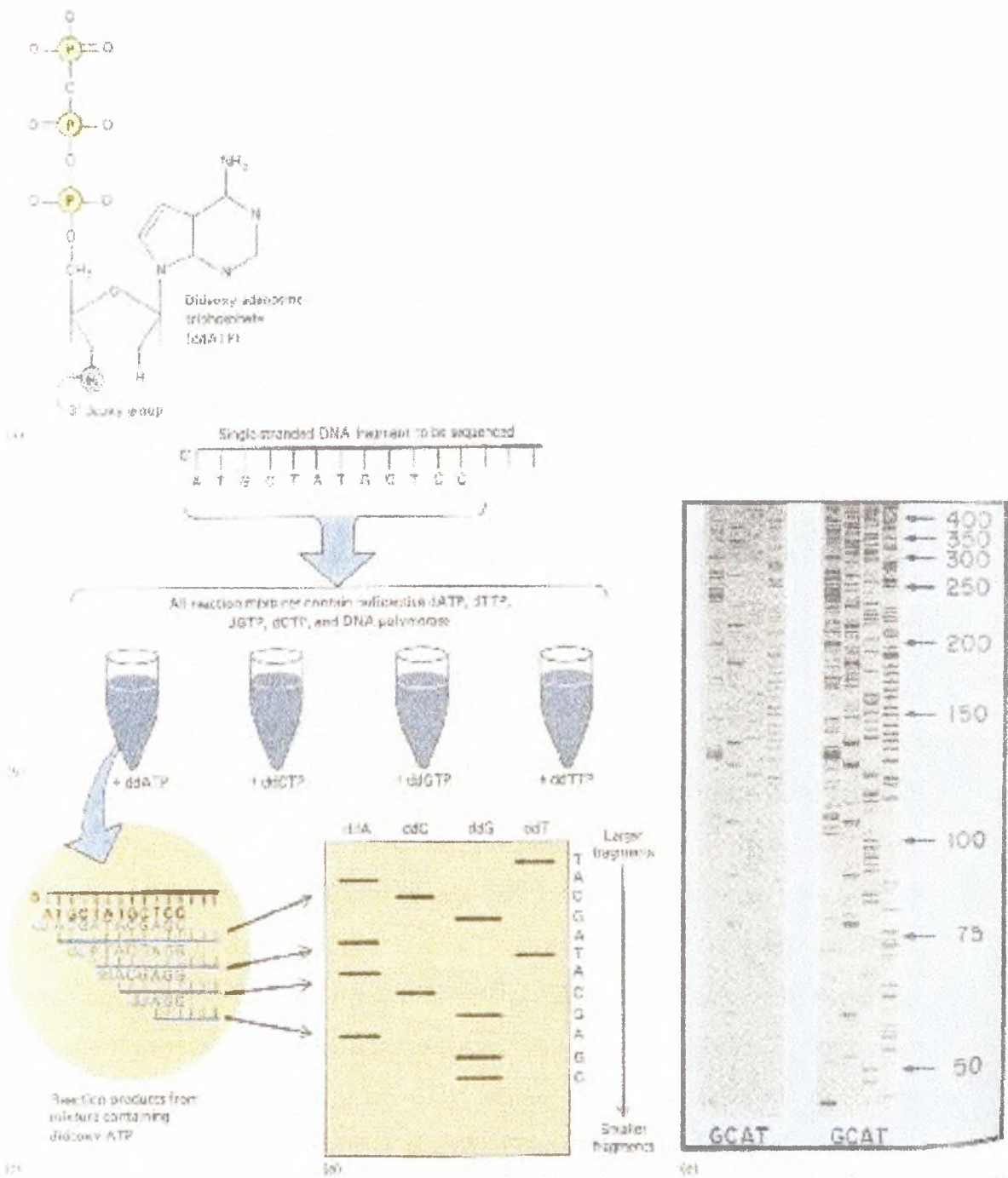


Σχήμα 6. Ενεργή θέση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Δεικνύονται οι δεσμοί μεταξύ παράπλευρων αλυσίδων αμινοξέων του ενζύμου και των νουκλεϊκών οξέων καθώς και του νεοεισερχόμενου νουκλεοτιδίου dTTP. (Γούναρης 2000, Μοριακή Γενετική).



Σχήμα 7. Η ωρίμανση του mRNA και η σύνθεση του cDNA, του συμπληρωματικού του DNA, (Τροποποιημένο από Vilee et al 1989, Biology).

Ακολούθως, η αλληλουχία του cDNA ενισχύεται με την PCR. Στην πράξη, η αλυσίδα του cDNA κλωνοποιείται με τη χρήση μια τροποποιημένης DNA πολυμερασης μέσα σε τέσσερα διαφορετικά μείγματα αντίδρασης. Τα αντίγραφα συνθέτονται με τέτοιο τρόπο ώστε οι νέες αλυσίδες του DNA να σπάζουν τυχαία σε θέσεις αντίστοιχες με κάθε μια βάση του μείγματος αντίδρασης, (Σχήμα 8)



Σχήμα 8. Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction) PCR (με χρήση ραδιενεργών dNTPs) και η πηκτική ηλεκτροφόρησης, (Τροποποιημένο από Vilee et al 1989, Biology).

Το μήκος των αλληλουχιών που σχηματίζονται καθορίζεται από την πηκτή της ηλεκτροφόρησης (gel electrophoresis). Η πηκτή μπορεί να παρασκευαστεί από αгарόζη ή από πολυακρυλαμίδη. Τα δείγματα του DNA τοποθετούνται στη μια άκρη της πηκτής. Τα μόρια του DNA είναι αρνητικά φορτισμένα. Λόγω ηλεκτρισμού τα μόρια κινούνται από τη μια άκρη στην άλλη κατευθυνόμενα προς το θετικό πόλο. Το μήκος που θα διανύσουν εξαρτάται από το μοριακό του βάρος. Συνεπώς, το μικρότερα μόρια διανύουν μεγαλύτερες αποστάσεις.

Η ηλεκτροφόρηση είναι μια μέθοδος απεικόνισης των αλληλουχιών του DNA. Είμαστε έτσι σε θέση να γνωρίζουμε κάθε τμήμα του μορίου του DNA. Η απεικόνιση των αλληλουχιών των DNA δίπλα-δίπλα επιτρέπει τον εντοπισμό διαφορών στην αλληλουχία του DNA διαφορετικών κυτταρικών πληθυσμών.

10. Η αυτοραδιογραφία.

Πρόσφατα έχουν περιγραφεί τεχνικές βελτίωσης της αρχικής μεθόδου DD, οι οποίες εισήγαγαν τη χρήση μεγαλύτερων εκκινητών και αντίδραση PCR σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Zhao et al., 1995) για την επιτυχή μείωση των ψευδοθετικών, που αποτελούσαν σχετικό μειονέκτημα της αρχικής μεθόδου, (Σωτηροπούλου 1997). Εκκινητές oligo dT με μια βάση δίπλα στην ουρά των Ts έδωσαν μεγαλύτερη εξειδίκευση (Averboukh et al. 1996). Η εισαγωγή αλληλουχιών που αναγνωρίζονται από ένζυμα περιορισμού στους εκκινητες διευκολύνει την κλωνοποίηση των cDNAs (Zhao et al. 1995, Averboukh et al. 1996). Τέλος, μεγαλύτερη ευκρίνεια επιτεύχθηκε με τη χρήση μακρύτερων πηκτωμάτων (Liang et al. 1994). Μια διαφορετική στρατηγική χρησιμοποιεί ειδικούς εκκινητές (nested primers) για τη δημιουργία ομοιογενών μερικών cDNAs (gene tags) από τα προϊόντα DD και απ' ευθείας προσδιορισμό της αλληλουχίας τους στο μείγμα αντίδρασης PCR, χωρίς προηγούμενη κλωνοποίηση (Martin et al. 1997).

Ένα σημαντικό μειονέκτημα της αρχικής μεθόδου, τη χρησιμοποίηση ραδιενέργειας οι Ito et al. (1994), και Motlik et al. (1998), προσπάθησαν να εξαλείψουν χρησιμοποιώντας φθοριούχους εκκινητές (fluorophore - labelled primers). Επίσης, για τον ίδιο σκοπό οι An et al, 1996, χρησιμοποίησαν χημειοφωταύγεια (chemiluminescence).

Αναμφίβολα, τέτοιες αλλαγές προσφέρουν το πλεονέκτημα της απλοποίησης της μεθόδου και μείωσης του απαιτούμενου χρόνου. Επίσης, μειώνουν το κόστος εφαρμογής της μεθόδου. Το πιο σημαντικό είναι ότι παρακάμπτουν τις περίπλοκες συνθήκες χειρισμού του υλικού και προφυλάξεις ασφάλειας που απαιτούνται κατά την εργαστηριακή άσκηση.

11. Σκοπός της εργασίας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η τροποποίηση της αρχικής μεθόδου Differential Display, χρησιμοποιώντας απλό oligo (dT) εκκινητή στην αντίστροφη μεταγραφή (RT), τυχαίοι εικοσιπενταμερείς και εικοσιεξαμερείς εκκινητες σε συνδυασμό με τριαντακονταμερείς εκκινητες στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμερασης (PCR). Επίσης, η αύξηση των κύκλων της PCR και χρώσης της πηκτής με νιτρικό άργυρο αντί χρησιμοποίησης ραδιενέργειας.

Η παραπάνω μέθοδος μας δίνει τη δυνατότητα χρησιμοποίησης απλού oligo (dT) εκκινητή αντί ποικίλων oligo(dT)NM εκκινητών, οι οποίοι υποδιαίρουν το σύνολο των mRNA. Επιπρόσθετα, μπορούμε να ενισχύσουμε το cDNA με αύξηση των κύκλων της PCR και να διαχωρίσουμε τα προϊόντα της PCR σε πηκτή πολυακρυλαμίδης χωρίς τη χρήση ραδιενέργειας, η οποία κάνει τη μέθοδο εξειδικευμένη και ιδιαίτερα δαπανηρή.

Η τροποποιημένη αυτή μέθοδος εφαρμόστηκε για στις αφίδες στο είδος *M. persicae*, λόγω της δυσκολίας διαχωρισμού των φυλών που τρέφονται στον καπνό από εκείνες που προέρχονται από άλλους ξενιστές με άλλες μεθόδους, όπως η ανάλυση GC-MS, η μελέτη του DNA, οι μορφολογικές μελέτες και η μελέτη του ενζύμου GOT-1.

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.

Μορφολογικές μελέτες σε ένα μεγάλο αριθμό δειγμάτων αφίδων του είδους *Myzus persicae*, από τον Blackman (1987), οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι οι αφίδες που τρέφονται στον καπνό, μπορούν να θεωρηθούν ως ένα νέο είδος, το *Myzus nicotianae* Blackman (Blackman, 1987).

Σε πειραματικές εργασίες που ακολούθησαν διερευνήθηκε η μορφολογική διάκριση των δυο εντόμων, διεξήχθησαν ενζυμικές μελέτες και μελετήθηκε το γενετικό υλικό τους, με διάφορες μεθόδους. Τα συμπεράσματα των μελετών όμως παραθέτουν αντικρουόμενα στοιχεία για το διαχωρισμό των δυο αφίδων.

Οι Blackman & Spence (1992), με τη μελέτη του ένζυμου GOT-1 (glutamate oxoacetate transaminase), αποδεικνύουν τη διάκριση των ειδών κατά 90 %. Απεναντίας, τα αποτελέσματα της έρευνας των Field et al. (1994) φέρονται αντικρουόμενα με αυτά της έρευνας των Blackman & Spence (1992). Στην εργασία αυτή διερευνήθηκε ο μηχανισμός των εστερικών βάσεων και διαπιστώθηκε πως οφείλεται σε δυο γονίδια, κοινά στις δυο φυλές. Επίσης, οι Margaritopoulos et al. (1998) με RAPD ανάλυση, σε ένα μεγάλο αριθμό κλώνων των δυο φυλών, συμπέραναν πως δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ *M. persicae* και *M. nicotianae*. Τουναντίον, οι μορφολογικές μελέτες από τους Margaritopoulos et al. (2000) στο είδος *M. persicae* αποκάλυψαν στοιχεία ικανά να διακρίνουν τις δυο φυλές με κάποια σχετική ακρίβεια. Επίσης, έρευνες στο rDNA (rDNA fingerprinting) (Fenton et al. 1998b) και στη διάσπαση των γονιδίων του είδους *M. persicae* (Field et al. 1994, Fenton et al. 1998a, Clement et al. 2000) αποκάλυψαν διαφορές σε επίπεδο πληθυσμού στο σύμπλοκο *M. persicae* όχι όμως διαφορές μεταξύ των ειδών. Συνεπώς, περαιτέρω διερεύνηση της φυλής που τρέφεται με καπνό είναι απαραίτητη για τον εντοπισμό αδιάσειστων στοιχείων κατάταξής της.

Στην παρούσα εργασία εφαρμόζεται μια τροποποίηση της μεθόδου Differential Display ώστε να γίνει περισσότερο προσιτή, ακόμη και σε μη εξειδικευμένα εργαστήρια, η μελέτη του RNA διαφόρων ευκαριωτικών οργανισμών. Το RNA σε αντίθεση με το DNA μεταφέρει γενετικές

πληροφορίες που εκφράζονται στο κυτόπλασμα, σε πρωτεΐνες και θεωρήθηκε πως η διερεύνησή του θα μπορούσε να διασαφηνίσει πιθανόν υπάρχουσες διαφορές μεταξύ των φυλών που τρέφονται στον καπνό και σε εκείνους που τρέφονται και σε άλλους ξενιστές.

2.Υλικά και Μέθοδοι.

2.1. Εκτροφή.

Για την εκπόνηση την παρούσας εργασίας μελετήθηκαν εικοσιπέντε κλώνοι του είδους *M. persicae*. Κλώνοι, αποτελούν τα άτομα μιας αποικίας που έχουν προέλθει από ένα παρθενογενετικό άτομο. Οι κλώνοι δημιουργήθηκαν από δείγματα που συλλέχθηκαν από οχτώ περιοχές από τη Βόρεια και Κεντρική Ελλάδα από τέσσερις διαφορετικούς ξενιστές, τις καλλιέργειες καπνού, πιπεριάς, πατάτας και ροδακινιάς τα έτη 1999- 2000, (Πίνακας 2).

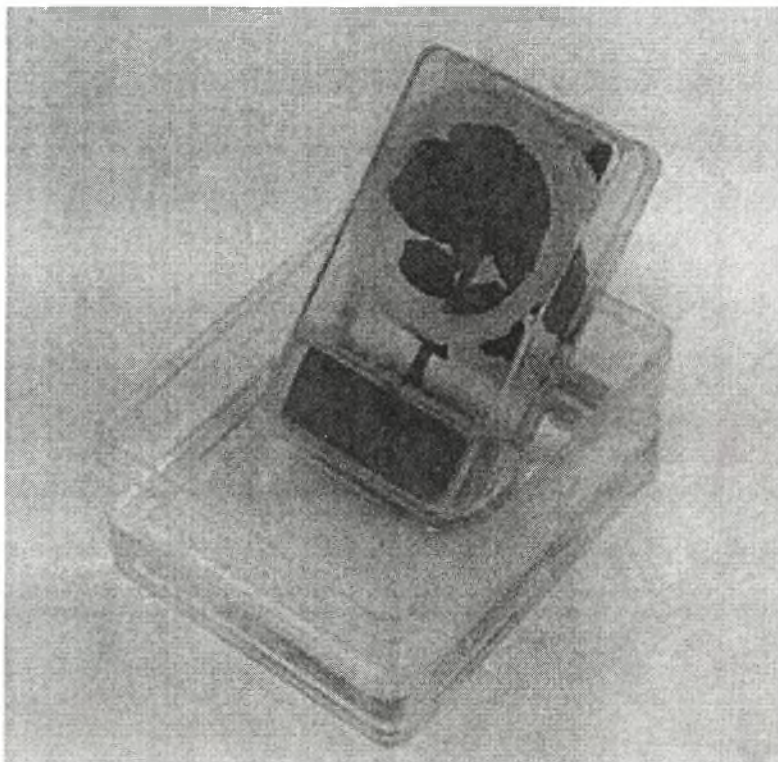
Πίνακας 2. Οι κλώνοι του είδους *M. persicae* που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

α/α	Κλώνος	Περιοχή συλλογής	Ξενιστής
1	99 MI tob 14	Μελίκη Ημαθίας	Καπνός
2	99 MI tob 25	Μελίκη Ημαθίας	Καπνός
3	99 MI tob 31	Μελίκη Ημαθίας	Καπνός
4	99 L pep 1	Λεχώνια Μαγνησίας	Πιπεριά
5	99 L pep 5	Λεχώνια Μαγνησίας	Πιπεριά
6	99 L pep 6	Λεχώνια Μαγνησίας	Πιπεριά
7	99 L pep 14	Λεχώνια Μαγνησίας	Πιπεριά
8	99 L pep 21	Λεχώνια Μαγνησίας	Πιπεριά
9	99 L pep 23	Λεχώνια Μαγνησίας	Πιπεριά
10	Vela 5	Βελεστίνο Μαγνησίας	Καπνός

11	99 Ml pot 17	Μελίκη Ημαθίας	Πατάτα
12	00 Lp 11	Λεχώνια Μαγνησίας	Ροδακινιά
13	00 Lp 12	Λεχώνια Μαγνησίας	Ροδακινιά
14	00 Lp 17	Λεχώνια Μαγνησίας	Ροδακινιά
15	00 Lp32	Λεχώνια Μαγνησίας	Ροδακινιά
16	99 Na tob 2	Λεχώνια Μαγνησίας	Καπνός
17	99 Kar tob31	Καρδίτσα	Καπνός
18	99 Kar tob 33	Καρδίτσα	Καπνός
19	99 Kar tob 34	Καρδίτσα	Καπνός
20	Amf tob 1/14	Αμφίκλεια Φθιώτιδας	Καπνός
21	Xam tob22	Ξάνθη	Καπνός
22	LHA5	Λεχώνια Μαγνησίας	Ροδακινιά
23	LHA3	Λεχώνια Μαγνησίας	Ροδακινιά
24	A1	Αλεξάνδρεια Ημαθίας	Καπνός
25	An25	Ανάβρα Καρδίτσας	Καπνός
26	An 21	Ανάβρα Καρδίτσας	Καπνός

Οι κλώνοι διατηρήθηκαν σε όλη τη διάρκεια του πειράματος σε θάλαμο με φωτοπερίοδο L16 : D8 (ώρες φωτός : ώρες σκότους, L=Light, D=Darkness) και θερμοκρασία $17^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Τα άτομα του κάθε κλώνου αναπτύσσονταν σε ειδικά κουτιά εκτροφής αφίδων. Τα κουτιά έχουν διαστάσεις 7.7cm x 4.5 cm x 2 cm. Στη βάση τους υπάρχει ένα κομμάτι σφουγγαριού που βρέχεται από νερό, πάνω στο οποίο τοποθετείτε φύλλο πατάτας (*Solanum tuberosum* L.) στο οποίο τρέφονται οι αφίδες (Blackman 1971). Τα κουτιά εκτροφής τοποθετήθηκαν σε μεγαλύτερα κουτιά διαστάσεων 14.5 cm x 8.5 cm, που περιείχαν μικρή ποσότητα νερού, με μια μικρή κλίση ώστε το φύλλο να βρίσκεται σε μια φυσική θέση και το σφουγγάρι να εμποτίζεται με νερό για την καλύτερη διατήρηση του φύλλου (Εικόνα 2).

Εικόνα 2. Κουτί εκτροφής αφίδων.



Για τη διατήρηση των κλώνων χρησιμοποιήθηκαν φύλλα πατάτας της ποικιλίας Spunta. Η επιλογή της πατάτας οφείλεται κατά κύριο λόγο στο ότι αποτελεί πολύ καλό ξενιστή για το είδος *M. persicae*. Επίσης, η ανάπτυξη του φυτού στο θερμοκήπιο είναι εύκολη δίνοντας μεγάλη παραγωγή σε φύλλα κατάλληλα για την εκτροφή των αφίδων. Για την καλύτερη θρέψη των εντόμων τα φύλλα αντικαθίστανταν κάθε δυο ημέρες.

Από κάθε κλώνο, συλλέχθηκαν περισσότερα από 200 νεαρά ενήλικα άπτερα παρθενογενετικά άτομα της ίδιας ηλικίας σε σωληνάκια και καταψύχθηκαν στους -20°C ώστε να διατηρηθούν αναλλοίωτοι οι ιστοί των εντόμων.



2.2. Απομόνωση.

Η απομόνωση των RNAs από τους ιστούς των αφίδων έγινε ακολουθώντας δυο

πρωτόκολλα, το TRIZOL Reagent, Total RNA Isolation Reagent της LIFE TECHNOLOGIES και το E.Z.N.A. Total RNA Isolation Protocol της Omega Biotek, Inc. P.O. Box.50835, New Orleans, LA 70150, USA.

i. TRIZOL[®] Reagent, Total RNA Isolation Reagent.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο TRIZOL[®] Reagent, Total RNA Isolation Reagent η απομόνωση των RNAs έγινε από ιστούς 10 νεαρών ενηλίκων, απτέρων παρθενογενετικών ατόμων, που ανήκαν στον ίδιο κλώνο. Οι ιστοί των εντόμων λειοτριβήθηκαν και ομογενοποιήθηκαν με προσθήκη 800μl Trizol (Life technologies) και 2μl γλυκογόνο (glycogen) (5μg/μl). Το ομογενοποιημένο δείγμα επώασε σε θερμοκρασία 15-30⁰C, για πέντε λεπτά, ώστε να διαχωριστούν πλήρως τα νουκλεοπρωτεϊνικά σύμπλοκα. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 160μl χλωροφόρμιο, οι περιέκτες (tubes) κλείστηκαν πολύ καλά, ανακινήθηκαν ισχυρά με κίνηση του χεριού για 15 δευτερόλεπτα και αφέθηκαν να επωασθούν για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία 15-30⁰C. Ακολούθως, τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν σε 12.000rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 2-8⁰C. Με τη φυγοκέντρηση το μείγμα διαχωρίστηκε σε μια υποκείμενη κόκκινη φάση, φαινόλης-χλωροφορμίου και μια υπερκείμενη άχρωμη υδατική φάση. Ο όγκος της υδατικής φάσης είναι περίπου ίσος με το 60% του όγκου του αντιδραστηρίου Tricol που χρησιμοποιήθηκε. Η υπερκείμενη φάση, στην οποία περιέχεται το RNA, μεταφέρθηκε σε καθαρό περιέκτη, προστέθηκαν 400μl ισοπροπυλικής αλκοόλης και το δείγμα αφέθηκε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 15-30⁰C. Το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για δεύτερη φορά σε 12.000rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία 2-8⁰C και το RNA κατακρημνίσθηκε με τη μορφή ιζήματος. Η υγρή φάση απομακρύνθηκε προσεκτικά και το ίζημα ξεπλύθηκε με 800μl αιθανόλης 75%. Το δείγμα αναδεύτηκε και φυγοκεντρήθηκε σε 7.500rpm για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 2-8⁰C. Το ίζημα του RNA εκτέθηκε στον αέρα για 5-10 λεπτά για να στεγνώσει και στη συνέχεια διαλύθηκε με 26μl νερό χωρίς RNAase (RNAase -free). Τέλος, αποθηκεύθηκε στους -70⁰C.

ii. E.Z.N.A.® Total RNA Isolation Protocol.

Σύμφωνα με το πρωτόκολλο E.Z.N.A.® Total RNA Isolation Protocol η απομόνωση των RNAs έγινε από ιστούς 100 νεαρών ενήλικων, άπτερων παρθενογενετικών ατόμων, που ανήκαν στον ίδιο κλώνο. Οι ιστοί των εντόμων λειοτριβήθηκαν και ομογενοποιήθηκαν με προσθήκη 400μl TRK Lysis Buffer και 8μl mercaptoethanol. Ακολούθως, προστέθηκαν 400μl αιθανόλης 70% και το μείγμα αφού αναμείχθηκε με ισχυρή ανάδευση (vortex), τοποθετήθηκε σε στήλη HiBind® RNA spin column. Η στήλη τοποθετήθηκε σε περιέκτη συλλογής 2ml και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε σε 10.000rpm για 15 δευτερόλεπτα σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνθηκε το διάλυμα που φυγοκεντρήθηκε και η στήλη ξεπλύθηκε με εφαρμογή 750μl RNA Wash Buffer I. Επαναλήφθηκε η φυγοκέντρηση και έπειτα απομακρύνθηκε ο περιέκτης συλλογής. τοποθετήθηκε νέος περιέκτης συλλογής, προστέθηκαν 500μl RNA Wash Buffer II και το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για τρίτη φορά. Επαναπομακρύνθηκε το διάλυμα που φυγοκεντρήθηκε και η στήλη ξεπλύθηκε με εφαρμογή 500μl RNA Wash Buffer II. Ακολούθησε επαναφυγοκέντρηση και απομάκρυνση του διαλύματος που φυγοκεντρήθηκε. Προκειμένου να στεγνώσει πολύ καλά η στήλη επαναφυγοκεντρήθηκε σε 13.000rpm για 1 λεπτό ενώ ο περιέκτης συλλογής ήταν άδειος. Στη συνέχεια, η στήλη μεταφέρθηκε σε περιέκτη 1.5ml. Το RNA εξήχθη με προσθήκη 100μl DEPC-treated water και φυγοκέντρηση σε 13.000rpm για 1 λεπτό. Το τελικό RNA λαμβάνεται με πλύση με 50μl DEPC-treated water και φυγοκέντρηση σε 13.000rpm για 1 λεπτό.

2.3. Επίδραση DNAase I στο ολικό RNA.

Η επίδραση DNAase I στο ολικό RNA γίνεται στην περίπτωση που τα δείγματα του RNA έχουν μολυνθεί από πυρηνικό DNA (genomic DNA).

Αρχικά, παρασκευάστηκε ένα μείγμα ίσου όγκου DNAase με το δείγμα RNA, σύμφωνα με τις οδηγίες του Delta Kit της εταιρίας Clontech

Laboratories Inc.(1020 East Meadow Circle, Palo Alto, USA). Για 25μl δείγματος RNA παρασκευάστηκε μείγμα όγκου 25μl αποτελούμενο από: 1μl 0.5M Tris-HCl (pH 7.5), 1μl 0.5M MgCl₂, 1μl RNase-free DNase (1unit/μl) και 22μl αποστειρωμένο (sterile) νερό. Σε αποστειρωμένο περιεκτική 0.5ml προστέθηκε το δείγμα του RNA και το μείγμα DNAase I. Το νέο μείγμα αφέθηκε να επωασθεί για 30 λεπτά σε θερμοκρασία 37⁰C. Ακολούθως, στον περιέκτη προστέθηκαν 2.5μl 0.2M EDTA και 2μl 3M NaOAc. Στη συνέχεια προστέθηκε μείγμα φαινόλης : χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης σε αναλογία 25 : 24 : 1 όγκου 54.5μl, ίσου με τον όγκο του αντιδρώντος μείγματος. Ο όγκος του νέου μείγματος ανήλθε στα 109μl. Ο περιέκτης αναδεύτηκε ισχυρά και φυγοκεντρήθηκε σε 14.000rpm για 10 λεπτά για να ξεχωρίσουν οι δυο φάσεις. Η υπερκείμενη φάση μεταφέρθηκε σε καθαρό περιέκτη 1.5ml και προστέθηκε 60μl μείγματος χλωροφορμίου : ισοαμυλικής αλκοόλης (24 : 1) όγκου ίσου με τον όγκο της υπερκείμενης φάσης. Ο περιέκτης αναδεύτηκε ισχυρά και ακολούθως, φυγοκεντρήθηκε σε 14.000rpm για 10 λεπτά για να ξεχωρίσουν οι δυο φάσεις. Επαναλήφθηκε η μετάγγιση της υπερκείμενης φάσης σε καθαρό περιέκτη και προστέθηκε NaOAc (3M) όγκου ίσου με το 1/10 του όγκου της υπερκείμενης φάσης και αιθανόλη 95% όγκου 2,5 φορές τον όγκου του μείγματος στο οποίο θα προσθέτονταν. Στη συνέχεια ο περιέκτης αναδεύτηκε ισχυρά και έπειτα φυγοκεντρήθηκε σε 14,000 rpm για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Απομακρύνθηκε η υδάτινη φάση και στο ίζημα προστέθηκαν προσεκτικά 200μl αιθανόλη 80%. Ακολούθησε φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 14.000rpm. Απομακρύνθηκε η υδάτινη φάση, και το ίζημα αφέθηκε στον αέρα για 5-10 λεπτά. Το ίζημα διαλύθηκε με 1.5μl απεσταγμένο νερό για κάθε 2 μg αρχικό RNA και αποθηκεύτηκε στους -20⁰C.

2.4. Σύνθεση cDNA.

Ακολούθως, με τις οδηγίες του Delta Kit της Clontech, συντέθηκε cDNA από το RNA. Αρχικά επισημαίνονται με A και B δυο αποστειρωμένοι περιέκτες 0.5ml. Στον περιέκτη A προστέθηκαν 2μl δείγματος RNA, 1μl cDNA synthesis primer (dT)₉, 1μM και 2 μl αποστειρωμένο νερό. Το μείγμα

αφού αναδεύτηκε με μια ελαφρά περιστροφή στη φυγόκεντρο, αφέθηκε να επωασθεί για 3 λεπτά στους 70⁰C και στη συνέχεια ψύχθηκε σε πάγο για 2 λεπτά. Στο μείγμα αφού αναδεύτηκε με μια ελαφρά περιστροφή στη φυγόκεντρο προστέθηκαν 5μl Master Mix αποτελούμενο από 2μl 5X First-stand buffer, 2μl dNTP mix (5mM), 1μl Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase (200 units/μl) και αναδεύεται ελαφρά με τη βοήθεια της πιπέτας. Το μείγμα επώασθηκε για μια ώρα στους 42⁰C. Η αντίδραση τελείωσε με επώαση του μείγματος για 10 λεπτά στους 75⁰C και ακόλουθη τοποθέτησή του στον πάγο. Το μείγμα αναδεύτηκε με μια ελαφρά περιστροφή στη φυγόκεντρο. Στον περιέκτη B μεταφέρθηκαν 2μl του αντιδρώντος μείγματος και προστέθηκαν 78μl αποστειρωμένο νερό. Στον περιέκτη A που είχαν απομείνει 8μl ss cDNA, προστέθηκαν 72μl αποστειρωμένο νερό. Οι δυο περιέκτες αποθηκεύονται στους -20⁰C.

2.5. PCR.

Οι αντιδράσεις της RT-PCR πραγματοποιήθηκαν σε τελικό όγκο 25 μl. Χρησιμοποιήθηκαν δεκατρία ζεύγη εκκινητών. Τα ζεύγη απαρτίζονται από έναν εικοσιπενταμερή ή εικοσιεξαμερή εκκινητή (25-mers, 26-mers P primer) και από έναν τριανταμερή εκκινητή (30-mers T primer) με γενική μορφή 5'-anchor-(dT₉)N₁N₁-3' όπου N₁= A, G, ή C, ικανοί να παράγουν μεγάλο αριθμό αντιγράφων cDNA λόγω της 5' ουράς τους. Οι εκκινητές είχαν προμηθευθεί από το Delta Kit της Clontech. Στον Πίνακα 3 παραθέτονται τα ζεύγη των εκκινητών ως συντομογραφίες, ενώ οι αλληλουχίες των βάσεων των εκκινητών αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 4 .

Πίνακας 3. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα.

<i>α/α</i>	<i>P Primer</i>	<i>T Primer</i>
1	P ₁	T ₁
2	P ₂	T ₂
3	P ₃	T ₃
4	P ₄	T ₅
5	P ₄	T ₇
6	P ₅	T ₆
7	P ₆	T ₇
8	P ₇	T ₆
9	P ₇	T ₉
10	P ₈	T ₂
11	P ₈	T ₅
12	P ₉	T ₉
13	P ₁₀	T ₈

Πίνακας 4. Οι αλληλουχίες των βάσεων των εκκινητών του πειράματος.

Συντομογραφία	Αλληλουχία Βάσεων
P ₁	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGGA-3'
P ₂	5'-ATTAACCCTCACTAAATCGGTCATAG-3'
P ₃	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTGG-3'
P ₄	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGTAG-3'
P ₅	5'-ATTAACCCTCACTAAAGATCTGACTG-3'
P ₆	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGGGTG-3'
P ₇	5'-ATTAACCCTCACTAAATGCTGTATG-3'
P ₈	5'-ATTAACCCTCACTAAATGGAGCTGG-3'
P ₉	5'-ATTAACCCTCACTAAATGTGGCAGG-3'
P ₁₀	5'-ATTAACCCTCACTAAAGCACCGTCC-3'
T ₁	5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTAA-3'

T ₂	5'-CATTATGCTGAGTGATAATCTTTTTTTTTTAC-3'
T ₃	5'-CATTATGCTGAGTGATAATCTTTTTTTTTTAG-3'
T ₅	5'-CATTATGCTGAGTGATAATCTTTTTTTTTTCC-3'
T ₆	5'-CATTATGCTGAGTGATAATCTTTTTTTTTTCG-3'
T ₇	5'-CATTATGCTGAGTGATAATCTTTTTTTTTTGA-3'
T ₈	5'-CATTATGCTGAGTGATAATCTTTTTTTTTTGC-3'
T ₉	5'-CATTATGCTGAGTGATAATCTTTTTTTTTTGG-3'

Το αντιδρών μείγμα αποτελούνταν από 2μl διαλύματος cDNA, 1μl P primers 0.8μM, 1μl T primers 0.8μM, 1μl Taq polymerase 1u/l (Minotec, Ηράκλειο, Ελλάδα), 4μl dNTPs, 2μl 2mM MgCl₂, 2.5μl 1X PCR buffer (500mM KCL, 100mM Tris pH 9.0) και 11.5μl αποστειρωμένο νερό. Το cDNA ενισχύθηκε μέσα από μια διαδικασία 48 κύκλων. Οι τρεις πρώτοι κύκλοι πραγματοποιήθηκαν σε μη αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης. Ο πρώτος κύκλος ολοκληρώθηκε σε 15 λεπτά, 5 λεπτά στους 94⁰C, 5 λεπτά στους 40⁰C και 5 λεπτά στους 68⁰C. Οι δυο επόμενοι κύκλοι ήταν διάρκειας 12 λεπτών, 2 λεπτά στους 94⁰C, 5 λεπτά στους 40⁰C και 5 λεπτά στους 68⁰C. Οι 45 ακόλουθοι κύκλοι πραγματοποιήθηκαν σε αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης, με 1 λεπτό στους 94⁰C, 1 λεπτό στους 60⁰C, 2 λεπτά στους 68⁰C. Ακολούθησε μια περίοδος παράτασης 7 λεπτών στους 68⁰C.

Στη διάρκεια των τριών πρώτων κύκλων ο P εκκινητής (P primers) ενώνεται τυχαία σε διάφορα σημεία της αλυσίδας του cDNA και ξεκινά η συνθεση του DNA. Λόγω των μη αυστηρών συνθηκών υβριδισμού ο P εκκινητής ενώνεται με ατελής δεσμούς. Στη συνέχεια τα προϊόντα των πρώτων κύκλων ενισχύονται στους επόμενους κύκλους χρησιμοποιώντας τον P εκκινητή και τον downstream T εκκινητή σε αυστηρές συνθήκες υβριδισμού.

2.6. Ηλεκτροφόρηση.

Ο διαχωρισμός των προϊόντων της PCR έγινε με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

Η συσκευή της ηλεκτροφόρησης ήταν κάθετη της εταιρίας Techware Sigma-Aldrich.

Για την παρασκευή της πηκτής αναμείχθηκαν 10 ml μητρικό διάλυμα πολυακρυλαμίδης 30% (29 gr. Ακρυλαμίδης, 1 gr. Bis-ακρυλαμίδη), 4.8 gr. ουρία 1.5 M, 2.5 ml TBE 20X. Ακολούθως, το διάλυμα διηθήθηκε και συμπληρώθηκε απεσταγμένο νερό dH₂O μέχρι τελικού όγκου 50 ml. Στη συνέχεια, στο διάλυμα προστέθηκαν 50 μl TEMED και 300 μl διαλύματος 20% APS (Amonium Persulfate) για να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης. Αμέσως μετά το διάλυμα χύθηκε στη συσκευή πηκτής και τοποθετήθηκε η χτένα δημιουργίας πηγαδιών. Η χτένα είχε διαστάσεις 13 x 4 cm, το μήκος των πηγαδιών που δημιουργούνταν ήταν 1.8 cm x 2 mm. Η πηκτή καλύπτετε από διάφανο μεμβρανώδες κάλυμμα και αφήνετε να στερεοποιηθεί τουλάχιστον 4 ώρες.

Για την ηλεκτροφόρησης η πηκτή τοποθετήθηκε σε διάλυμα 1X TBE (0.89M Tris, 0.89M boric acid, 0.11M EDTA, pH= 8.3). Στην πηκτή φορτώθηκε μείγμα 2 μl loading buffer cDNA sequences και 7 μl cDNA. Για την παρασκευή 10ml Loading Buffer χρησιμοποιήθηκαν 5ml γλυκερόλης 50%, 250μl TBE, 1ml κυανού της βρωμοφαινόλης 1% και 3.75ml απεσταγμένο νερό.

Ο διαχωρισμός των τμημάτων των αλληλουχιών του cDNA ολοκληρώθηκε μετά από μια ώρα υπό την επίδραση τάσης 40 mA.

2.7. Χρώση νιτρικού αργύρου.

Μετά την ηλεκτροφόρηση η πηκτή παραλαμβάνετε από τη συσκευή πηκτής και τοποθετείτε για γυάλινο σκεύος διαστάσεων 21 x 21 cm και αναδεύεται συνεχώς, σε όλη τη διάρκεια της χρώσης σε σέικερ τύπου Roto Mix, Type

50800, Barnstead/Thermolyne. Ακολουθούν διαδοχικές πλύσεις με διάφορα διαλύματα. Αρχικά, ξεπλένετε με διάλυμα 2% αιθανόλης και 0.0025% οξικού οξέους δυο φορές επί 3 λεπτά. Στη συνέχεια, βάφεται με νιτρικό άργυρο 0.1 % για 10 λεπτά. Ακολούθως, ξεπλένετε δυο φορές με απεσταγμένο νερό. Τέλος, με την επίδραση διαλύματος 1.5% NaOH, 0.005% NaBH₄ και 0.4 % CH₂O, οι ζώνες γίνονται ορατές.

Η πηκτή παραλαμβάνετε από το γυάλινο σκεύος, καλύπτετε από διάφανο πλαστικό και τοποθετείτε στους 4-7⁰C.

3. Αποτελέσματα.

Η μέθοδος Differential Display (DD) ταυτοποιεί και κλωνοποιεί διαφορετικά εκφρασμένα mRNAs. Στην παρούσα εργασία τροποποιήθηκε η κλασική μέθοδος DD μη χρησιμοποιώντας ραδιενέργειας. Για την ανάλυση των προϊόντων της PCR χρησιμοποιήθηκε χρώση νιτρικού αργύρου αντί αυτοραδιογραφίας. Εφαρμόστηκε για πρώτη φορά σε έντομα αποκαλύπτοντας ζώνες σε ικανοποιητικό βαθμό.

Τα αποτελέσματα του πειράματος διαφαίνονται από τις ζώνες που αποκαλύφθηκαν στις πηκτές της πολυακρυλαμιδης μετά τη χρώση. Διαπιστώθηκε μια ποικιλομορφία εντός αλλά και μεταξύ των φυλών του είδους *M. persicae*, ενώ δεν διακρίθηκαν με σαφήνεια διαφορετικές ζώνες που να μπορούν να ξεχωρίσουν τις δυο φυλές του είδους.

Συγκεκριμένα από τη μελέτη των πηκτών διαπιστώθηκε πως από τους εικοσιέξι κλώνους (Πίνακας 2) που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία μόνο οι δεκαέξι έδωσαν ευδιάκριτες ζώνες. Στον Πίνακα 5 δίδονται οι δεκαέξι κλώνοι.

Πίνακας 5. Οι κλώνοι που έδωσαν ευδιάκριτες ζώνες στις πηκτές της πολυακρυλαμιδης

α/α	Κλώνος
1	99 Na tob 2
2	99 MI tob 14
3	99 MI tob 25
4	99 MI tob 31
5	99 Kar tob 31
6	An21
7	Λn25
8	A1
9	LHA5

10	Vela 5
11	00 Lp 11
12	00 Lp 12
13	99 L pep 14
14	99 L pep 23
15	99 L pep 21
16	99 Ml pot 17

Για τη ενίσχυση των cDNAs όλων των κλώνων του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δεκατρία ζεύγη εκκινητών, ενώ για την ενίσχυση των δεκαέξι κλώνων χρησιμοποιήθηκαν μόνο επτά από τα παραπάνω ζεύγη εκκινητών. Στον πίνακα 6 παραθέτονται τα ζεύγη και η χρησιμοποιούμενη ποσότητα (μl) από τον κάθε εκκινητή ανάλογα.

Πίνακας 6. Τα ζεύγη των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

	Ζεύγος	Αναλογία εκκινητών (μl)
1	P₄ - T₅	3-3
2	P₅ - T₆	1-1 , 3-3
3	P₆ - T₇	3-3
4	P₇ - T₉	3-3
5	P₇ - T₆	1-1
6	P₄ - T₇	1-1 , 2-2 , 3-3
7	P₉ - T₉	1-1

Οι ζώνες των παραπάνω κλώνων που αποκαλύπτονται ευκρινώς στις πηκτές της πολυακρυλαμίδης προήλθαν από σαρανταενέα διαφορετικούς συνδυασμούς τεσσάρων διαφορετικών συγκεντρώσεων του cDNA και τριών

αναλογιών των επτά ζευγών εκκινητών. Συνολικά διερευνήθηκαν περίπου 250 διαφορετικοί συνδυασμοί. Στον πίνακα 7 φαίνονται αναλυτικά οι κλώνοι που μελετήθηκαν, οι ποσότητες του cDNA (μl) που ενισχύθηκε, τα ζεύγη και οι ποσότητες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

Πίνακας 7. Οι κλώνοι, οι ποσότητες του cDNA (μl), τα ζεύγη και οι ποσότητες των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν.

α/α	Κλώνος	Ποσότητα		Αναλογία εκκινητών (μl)
		cDNA (μl)	Ζεύγος εκκινητών	
1	99 Na tob 2	2	P ₅ - T ₆	1-1
2	99 Ml tob 31	2	P ₅ - T ₆	1-1
3	99 Ml tob 14	2	P ₇ - T ₉	1-1
4	99 Ml tob 14	2	P ₅ - T ₆	1-1
5	99 Ml tob 14	2	P ₉ - T ₉	1-1
6	99 Ml tob 25	2	P ₉ - T ₉	1-1
7	99 Ml tob 25	2	P ₅ - T ₆	1-1
8	99 Kar tob 31	2	P ₅ - T ₆	1-1
9	99 Kar tob 31	1	P ₅ - T ₆	1-1
10	Vela 5	2	P ₅ - T ₆	1-1
11	Vela 5	2	P ₇ - T ₉	1-1
12	00 Lp 11	2	P ₅ - T ₆	1-1
13	00 Lp 12	2	P ₅ - T ₆	1-1
14	99 L pep 14	2	P ₅ - T ₆	1-1
15	99 L pep 23	2	P ₅ - T ₆	1-1
16	99 L pep 21	2	P ₅ - T ₆	1-1
17	99 L pep5	2	P ₉ - T ₉	1-1
18	99 L pep 5	2	P ₅ - T ₆	1-1

19	99 L pep 5	2	P ₇ - T ₉	1-1
20	99 Ml pot 17	2	P ₅ - T ₆	1-1
21	99 Ml pot 17	2	P ₇ - T ₉	1-1
22	A1	2	P ₅ - T ₆	1-1
23	A1	2	P ₇ - T ₉	1-1
24	An21	2	P ₅ - T ₆	1-1
25	An25	1	P ₄ - T ₇	1-1
26	An25	2	P ₅ - T ₆	1-1
27	An25	2	P ₇ - T ₉	1-1
28	An25	2	P ₄ - T ₇	1-1
29	An25	2	P ₄ - T ₇	2-2
30	An25	3	P ₄ - T ₇	1-1
31	An25	3	P ₄ - T ₇	2-2
32	An25	5	P ₅ - T ₆	3-3
33	An25	5	P ₆ - T ₇	3-3
34	An25	5	P ₇ - T ₆	3-3
35	An25	5	P ₄ - T ₇	3-3
36	LHA5	1	P ₄ - T ₇	1-1
37	LHA5	1	P ₄ - T ₇	2-2
38	LHA5	2	P ₄ - T ₇	1-1
39	LHA5	2	P ₉ - T ₉	1-1
40	LHA5	2	P ₅ - T ₆	1-1
41	LHA5	2	P ₇ - T ₆	1-1
42	LHA5	2	P ₄ - T ₇	2-2
43	LHA5	3	P ₄ - T ₇	2-2
44	LHA5	3	P ₄ - T ₇	1-1
45	LHA5	5	P ₇ - T ₉	3-3
46	LHA5	5	P ₆ - T ₇	3-3

47	LHA5	5	P ₄ - T ₇	3-3
48	LHA5	5	P ₅ - T ₆	3-3
49	LHA5	5	P ₄ - T ₅	3-3

Συγκρίνοντας τις πηκτές των δεκαέξι κλώνων διαπιστώθηκε πως σε δυο πηκτές δέκα κλώνων διακρίνονται ευκρινώς διαφορές στις ζώνες. Στον πίνακα 8 δίδονται οι κλώνοι που έδωσαν διαφορετικές ζώνες και για την ενίσχυση των cDNAs χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών με τις συντομογραφίες P₅-T₆. Στον πίνακα 9 δίδονται οι ίδιοι κλώνοι, και οι ζώνες που αποκαλύφθηκαν με τη χρησιμοποίηση του ζεύγους των εκκινητών P₇-T₉.

Πίνακας 8. Οι κλώνοι που αποκάλυψαν διαφορετικές ζώνες με τη χρησιμοποίηση του ζεύγους P₅- T₆. Οι κλώνοι 99 Na tob 2, An 21, 99 Ml tob 14, 99 Ml tob 31, 99 Kar tob 31 προέρχονται από καπνό. Οι κλώνοι 00 Lp 11, 00 Lp 12 προέρχονται από ροδακινιά. Οι κλώνοι 99 L pep 14, 99 L pep 21, 99 L pep 23 προέρχονται από πιπεριά.

<i>Κλώνος</i>		
99 Na tob 2	+	-
An 21	+	+
99 Ml tob 14	+	-
99 Ml tob 31	+	-
99 Kar tob 31	+	+
00 Lp 11	+	+
00 Lp 12	-	+
99 L pep 14	-	+
99 L pep 21	-	+
99 L pep 23	-	+

Πίνακας 9 .Οι κλώνοι που αποκάλυψαν διαφορετικές ζώνες με τη χρησιμοποίηση του ζεύγους P₇ - T₉. Οι κλώνοι 99 Na tob 2, An 21, 99 MI tob 14, 99 MI tob 31, 99 Kar tob 31 προέρχονται από καπνό. Οι κλώνοι 00 Lp 11, 00 Lp 12 προέρχονται από ροδακινιά. Ο κλώνος 99 L rep 14 προέρχεται από πιπεριά.

Κλώνος				
99 Na tob 2	-	-	-	+
An 21	-	-	-	+
99 MI tob 14	+	+	+	+
99 MI tob 31	+	+	+	+
99 Kar tob 31	-	-	+	+
00 Lp 11	-	+	-	-
00 Lp 12	-	+	-	-
99 L rep 14	-	-	-	+

Πρέπει να σημειωθεί πως το cDNA των κλώνων 99 L rep 23, 99 L rep 21 δεν ενισχύθηκε με το ζεύγος των εκκινήτων P₇ - T₉ και έτσι δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες με τη χρώση νιτρικού αργύρου.

Μελετώντας τον πίνακα 8 συμπεραίνεται πως όλοι οι κλώνοι του καπνού και μόνο ένας από τη ροδακινιά αποκάλυψαν ζώνη στα 200 bp, ενώ κανένας από τους κλώνους των άλλων ξενιστών δεν έδωσαν ζώνη στα 200 bp αλλά στα 180 bp. Επίσης, από τους κλώνους του καπνού δυο μόνο έδωσαν ζώνη στα 180 bp. Επιπλέον, τρεις κλώνοι έδωσαν ζώνη στα 200 bp και στα 180 bp. Είναι οι κλώνοι του καπνού, An 21 και 99 Kar tob 31 και ο κλώνος της ροδακινιάς, 00 Lp 11.

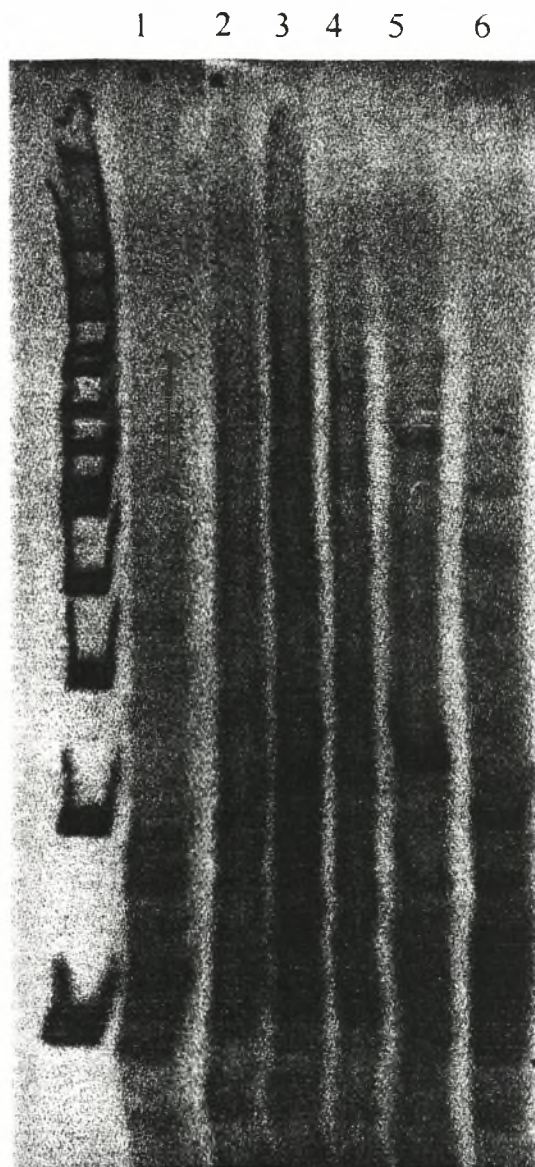
Αναλύοντας τη δεύτερη πηκτή διαπιστώνεται πως οι δυο κλώνοι του καπνού από τη Μελίκη Ημαθίας, 99 MI tob 14 και 99 MI tob 31, έδωσαν

ζώνες στα 380 bp, 190 bp, 150 bp και 170 bp. Οι άλλοι δυο κλώνοι του καπνού, 99 Na tob 2 και An 21 έδωσαν ζώνες μόνο στα 150bp, ενώ ο πέμπτος κλώνος του καπνού, 99 Kar tob 31 έδωσε ζώνες στα 150bp και 170bp. Όλοι οι κλώνοι όμως του καπνού έδωσαν ζώνη στα 150bp. Από τους κλώνους του μη καπνού κοινό στοιχείο είναι ότι δεν έδωσαν ζώνη όλοι στα 380bp και 170bp. Οι κλώνοι 99 L pep21 και 99 L pep 23 δεν έδωσαν ζώνες σε κανένα από παραπάνω μήκη, ο κλώνος 99 L pep 14 έδωσε μόνο στα 150bp, ενώ οι κλώνοι 00 Lp 11 και 00 Lp 12 έδωσαν ζώνη μόνο στα 190bp.

Ένα σημαντικό στοιχείο που προκύπτει από την παρατήρηση όλων των πηκτών είναι ότι μπορούν να προσδιοριστούν ακόμη και ζώνες μεγάλου μοριακού βάρους.

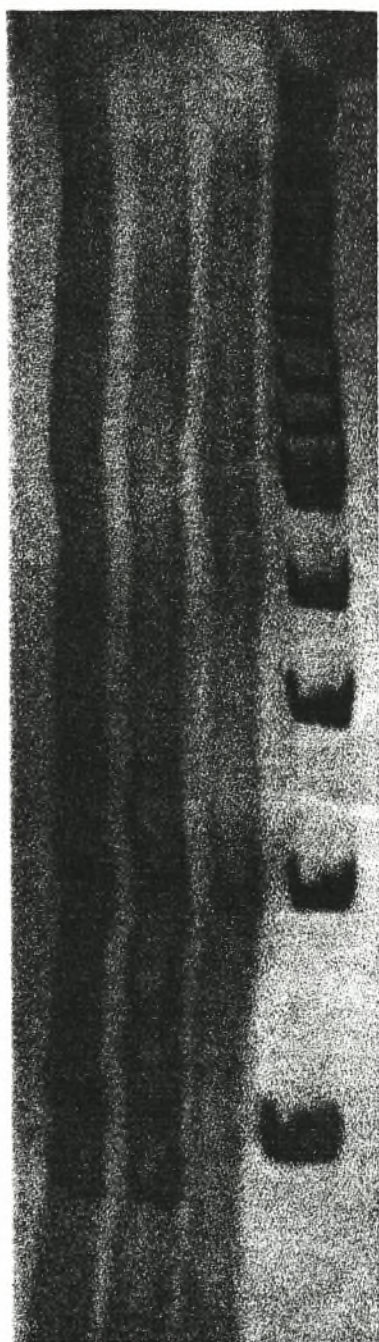
Φωτογραφίες πηκτών πολυακρυλαμιδης αποτελούν οι Εικόνες 3, 4 και 5.

Εικόνα 3. Πηκτή πολυακρυλαμίδης στην οποία αποκαλύπτονται ζώνες του κλώνου 99 Kar tob 31 του είδους *M. persicae*. Η ενίσχυση των προϊόντων της PCR έγινε με το ζεύγος των εκκινητών με συντομογραφία P₇-T₆. (Οι ζώνες 1, 3, 5, 6, αποκαλύφθηκαν από τους κλώνους του καπνού 99 Ml tob 14, Vela 5, A1, An 25. Η ζώνη 2 αποκαλύφθηκε από τον κλώνο της πιπεριάς 99 L pep 5. Η ζώνη αποκαλύφθηκε από τον κλώνο της πατάτας 99 Ml rot 17).



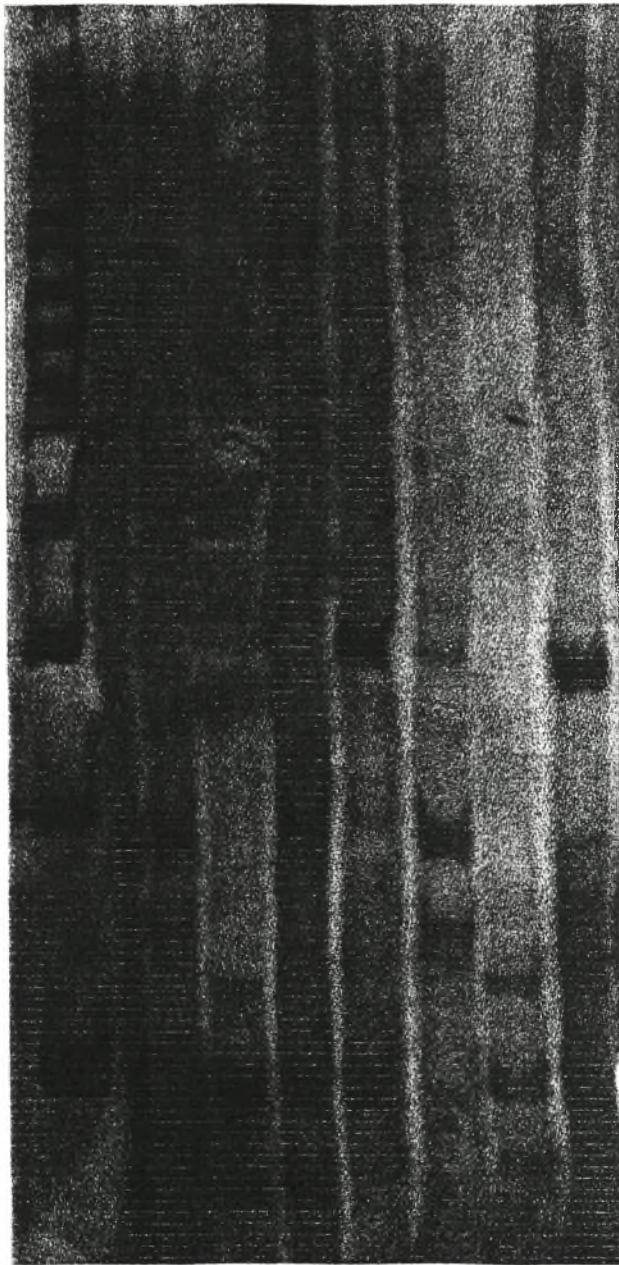
Εικόνα 4. Πηκτή πολυακρυλαμίδης στην οποία αποκαλύπτονται ζώνες του κλώνου του καπνού 99 Kar tob 31, του είδους *M. persicae*. Η ενίσχυση των προϊόντων της PCR έγινε με το ζεύγος των εκκινητών με συντομογραφία P₅-T₆.

1 1 1



Εικόνα 5. Πηκτή πολυακρυλαμίδης στην οποία αποκαλύπτονται ζώνες τεσσάρων κλώνων του είδους *M. persicae*. Η ενίσχυση των προϊόντων της PCR έγινε με το ζεύγος των εκκινήτων με συντομογραφία P₅-T₆. (Οι ζώνες 1, 2, 3, 5, 6, αποκαλύφθηκαν από τους κλώνους του καπνού 99 MI tob 31, 99 MI tob 14, 99 Kar tob 31, 99 MI tob 31, 99 MI tob 14. Οι ζώνες 4, 7 αποκαλύφθηκαν από τον κλώνο της ροδακινιάς 00 Lp 11).

1 2 3 4 5 6 7



4. Συζήτηση – Συμπεράσματα.

Τα θεμελιώδη χαρακτηριστικά της κλασσικής μεθόδου Differential Display RT-PCR είναι η χρήση ραδιενεργών νουκλεοτιδίων στην PCR (Liang & Pardee 1992), ο διαχωρισμός των cDNAs με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6% (Tohda et al. 1997), η αφύγρανση της πηκτής σε απορροφητικό χαρτί σε συνθήκες χαμηλής πίεσης και υψηλής θερμοκρασίας (Rivas et al., 1997), ο προσδιορισμός των προϊόντων της PCR με αυτοραδιογραφία (Munz et al., 1997) και η απόσπαση επιθυμητού DNA και επανενίσχυση του με PCR (Rutberg et al., 1997).

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε μια μη ραδιενεργός εναλλακτική μέθοδος ταυτοποίησης διαφορετικά εκφρασμένων mRNAs. Η διαφοροποίηση της μεθόδου έγκειται στα παρακάτω πέντε σημεία. Επιτρέπει την αποτελεσματική ενίσχυση του cDNA αυξάνοντας τον αριθμό των κύκλων της PCR σε 48. Χρησιμοποιεί ζεύγη εκκινητών, αποτελούμενα από έναν τυχαίο εικοσιπενταμερή ή εικοσιεξαμερή εκκινητή με γενική δομή 5'-ATTAACCCTCACTAAAN₁N₁N₁N₁N₁N₁N₁N₁N₁N₁-3' όπου N₁ = G, T, C ή A, και έναν τριαντακονταμερή εκκινητή με γενική δομή 5'-CATTATGCTGAGTGATATCTTTTTTTTTTN₁N₁-3' όπου N₁= G, C ή A. Επίσης, παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού των προϊόντων της PCR με κάθετη ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 6%, μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα περίπου μιας ώρας. Επιπλέον, πλεονεκτεί λόγω της χρήσης μη ραδιενεργών νουκλεοτιδίων στην ενίσχυση του cDNA στην PCR. Τέλος, για την αποκάλυψη των ζωνών της πηκτής χρησιμοποιείται χρώση με νιτρικό άργυρο έναντι αυτοραδιογραφίας.

Εξετάζοντας τα αποτελέσματα της εργασίας διαπιστώνουμε πως μελετήθηκαν εικοσιέξι κλώνοι του είδους *M. persicae* αλλά μόνο δεκαέξι έδωσαν ευδιάκριτες ζώνες στις πηκτές της πολυακρυλαμίδης, (Πίνακας 5). Η αδυναμία αυτή αποκάλυψης ζωνών από όλους τους κλώνους οφείλεται στη δομή του mRNA, η οποία διαφοροποιείται ανάλογα με τις ανάγκες του κύτταρου.

Η απομόνωση των mRNA πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας δύο διαφορετικά πρωτόκολλα, (TRIZOL[®] Reagent, Total RNA Isolation Reagent και E.Z.N.A.[®] Total RNA Isolation Protocol). Η ποσότητα του mRNA που απομονώθηκε και με τα δύο πρωτόκολλα είναι ικανοποιητική. Το γεγονός όμως ότι με το πρώτο πρωτόκολλο είναι δυνατόν να αποσπαστεί επαρκής ποσότητα mRNA από μικρότερο αριθμό ατόμων, (10), καθιστά αποτελεσματικότερη και πιο οικονομική την εφαρμογή του πρώτου πρωτοκόλλου σε σχέση με το δεύτερο, που απαιτεί δεκαπλάσιο αριθμό ατόμων, (100).

Το cDNA που συντέθηκε από το mRNA ενισχύθηκε με τη διαδικασία της PCR. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις cDNA, 1μl, 2μl, 3μl και 5μl. Η ενίσχυση του cDNA στην PCR έγινε με τη χρήση δεκατριών ζευγών εικοσιπενταμερών ή εικοσιεξαμερών και τριαντακονταμερών εκκινητών, (Πίνακας 3), σε τρεις διαφορετικές αναλογίες των δύο εκκινητών, 1 μl - 1 μl, 2 μl - 2 μl, 3 μl - 3 μl, (Πίνακας 6).

Από τα δεκατρία ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν μόνο επτά έδωσαν ζώνες μετά τη χρώση, (πίνακας 6). Συνολικά, οι συνδυασμοί των κλώνων, του cDNA, του ζεύγους των εκκινητών και της αναλογίας των εκκινητών που αποκάλυψαν ζώνες στις πηκτές είναι σαρανταεννέα, (πίνακα 7).

Συμπερασματικά, για να δώσει αποτέλεσμα η μέθοδος που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία θα πρέπει να υπάρχει κατάλληλος συνδυασμός της ποσότητας του cDNA, των εικοσιεξαμερών ή εικοσιπενταμερών και των τριαντακονταμερών εκκινητών και της χρησιμοποιούμενης ποσότητας αυτών.

Μελετώντας τις πηκτές πολυακρυλαμιδης στις οποίες αποκαλύφθηκαν ζώνες με τη χρώση νιτρικού αργύρου διαπιστώθηκε πως σε δυο πηκτές διακρίνονται ευκρινής διαφορές στις ζώνες. Στις πηκτές είχαν αναλυθεί τα προϊόντα της PCR απομόνωσης δέκα κλώνων. Συγκεκριμένα, από τους κλώνους που έδωσαν διαφορετικές ζώνες πέντε προέρχονται από τον καπνό, δυο από τη ροδακινιά και τρεις από πιπεριά. Για την ενίσχυση των cDNAs χρησιμοποιήθηκαν τα ζεύγη των εκκινητών με τις συντομογραφίες P₅ - T₆ και P₇ - T₉. Η δομή των εκκινητών δίδεται στον πίνακα 4.

Τα διαφορετικά αποτελέσματα που αποκαλύφθηκαν στην πηκτή που χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών P₅ - T₆, δίδονται στον πίνακα 8. Είναι σαφές πως όλοι οι κλώνοι του καπνού αποκάλυψαν ζώνη στα 200bp και μόνο δυο έδωσαν ζώνη και στα 180bp. Όλοι οι κλώνοι του μη καπνού έδωσαν ζώνη στα 180bp και ένας μόνο έδωσε ζώνη και στα 200bp.

Οι ζώνες που αποκαλύφθηκαν στην πηκτή που χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος των εκκινητών P₇ - T₉, δίδονται στον πίνακα 9. Όλοι οι κλώνοι του καπνού έδωσαν ζώνη στα 150bp, δυο έδωσαν ζώνες και στα τέσσερα μήκη, 380bp, 190bp, 150bp και 170bp, ενώ ένας άλλος έδωσε ζώνες στα δυο από τα τέσσερα μήκη, στα 150bp και στα 170bp. Από τους κλώνους του μη καπνού κοινό στοιχείο είναι ότι δεν έδωσαν ζώνη όλοι στα 380bp και 170bp. Ένας κλώνος έδωσε ζώνη μόνο στα 150bp, ενώ δυο έδωσαν ζώνη μόνο στα 190bp. Πρέπει να σημειωθεί πως το cDNA δυο κλώνων δεν ενισχύθηκε με το ζεύγος των εκκινητών P₇ - T₉ και έτσι δεν αποκαλύφθηκαν ζώνες με τη χρώση νιτρικού αργύρου.

Γενικά, κατά μέσο όρο οι κλώνοι του καπνού δίδουν ζώνη στα 200bp και όχι στα 180bp που δίδουν οι κλώνοι του μη καπνού. Επίσης, όλοι οι κλώνοι του καπνού και μόνο ένας του μη καπνού δίδουν ζώνη στα 150bp. Επιπλέον, στα 170bp και 380bp δίδουν ζώνη μόνο οι κλώνοι του καπνού και όχι του μη καπνού, ενώ στα 190bp δίδουν ζώνη δυο κλώνοι του καπνού και δυο του μη καπνού. Τα παραπάνω στοιχεία δίδονται με τη μορφή πίνακα παρακάτω.

Πίνακας 10. Συμπερασματικά στοιχεία.

Μήκος	
380bp	Μόνο κλώνοι του καπνού
170bp	Μόνο κλώνοι του καπνού
200bp	Κατά μέσο όρο κλώνοι του καπνού
180bp	Κατά μέσο όρο κλώνοι του μη καπνού
190bp	Δυο κλώνοι του καπνού και δυο κλώνοι του μη καπνού.
150bp	Όλοι κλώνοι του καπνού και ένας του μη καπνού

Γίνεται έτσι αντιληπτό πως έχουμε μια διαφοροποίηση των κλώνων του καπνού και των κλώνων του μη καπνού ως προς την αποκάλυψη ζωνών στις πηκτές της πολυακρυλαμιδης. Τα στοιχεία όμως που προκύπτουν, δεν είναι ικανά να εδραιώσουν με σαφήνεια τη διάκριση των φυλών του καπνού από τις φυλές του μη καπνού.

Η τροποποίηση της αρχικής μεθόδου Differential Display RT-PCR που εφαρμόστηκε στην παρούσα εργασία αποτελεί μια εναλλακτική μη ραδιενεργός μέθοδος προσδιορισμού διαφορετικά εκφρασμένων γονιδίων σε κύτταρα ζωικών οργανισμών. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση διαφορετικά εκφρασμένων mRNA στον άνθρωπο και σε επίμυες. Η μέθοδος αυτή μπορεί να συγκαταλεχθεί στις τεχνικές εξέτασης της ενδοειδικής και διαειδικής γενετικής παραλλακτικότητας των αφίδων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, M. D., Kelley, J. M., Gocayne, J.D., Dubnick, M., Polymeroloulos, M.H., Xiao, H., et al. (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*, 252 : 1651-1656.
- Adams, M. D., Soares, M.B., Kerlavage, A.R., Fields, C., and Venter, J. C. (1993) Rapid cDNA sequencing (expressed sequence tags) from a directionally cloned human infant brain cDNA library. *Nature Genet.s* 4 : 373-380.
- Al-Aboodi, A. & R. H. ffrench-Constant, (1995) RAPD-PCR confirm absence of genetic variation between insecticide resistant variants of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homopreta : Aphididae). *The Great Lakes Entomologist* 28 : 127-133.
- An, G., Luo, G., Veltri, R. W., O' Hara, S. M. (1996) Sensitive, nonradioactive differential display method using chemiluminescent detection. *Bio techniques* 20: 342-346.
- Averboukh, L., Douglas, S. A., Zhao, S., Lowe, K., Maher, J., and Pardee, A. B. (1996) Better gel resolution and longer cDNAs increase the precision of differential display. *Bio Techniques* 20 : 918-921.
- Black, W. C. (1993) PCR with arbitrary primers : approach with care, *Insect Molecular Biology* 2(1) : 1-6.
- Blackman, R. L. & Spence, J. M. (1994) The effects of temperature on aphid morphology, using a multivariate approach. *European Journal of Entomology* 91 : 7-22.
- Blackman, R. L. and Eastop, V. F. (1985) Aphid on the World's crops, An Identification Guide, Wiley Interscience Publication, U.K., pp.1-10, 314-315.

- Blackman, R. L., (1971) Variation in the photoperiodic response within natural population of *Myzus persicae* (Sulz.) *Bull. of Entomological Research* 60 : 533-546.
- Blackman, R. L., (1987) Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera : Aphididae), and a key to New World *Myzus* (*Nectarosiphon*) species. *Bulletin of Entomological Research* 77:713-730.
- Böckelmann, R., Bonnekoh, B., Gollnick, H. (1999) Optimized Visualization and PCR Reamplification of Differentially Displayed cDNA Bands Detected by Silver Staining in Polyacrylamide Gels as Established in the Model of Dithranol- Treated Keratinocytes, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 12 : 54-63.
- Brookes, C. P. & D. Loxdate, 1987. Survey of enzyme variation in British populations of *Myzus persicae* (Homoptera : Aphididae) on crops and weed hosts. *Bulletin of Entomological Research* 77: 83-89.
- Campbell, R. K. and Eikenbary, R. D., (1990) Aphid-Plant Genotype Interactions. Elsevier Science Publishers B.V., U.S.A., pp.37-39.
- Cennis, J. L., P. Perez & A. Fereres, (1993) identification of aphid (Homoptera : Aphididae) species and clones by random amplified polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society America* 86 : 545-550.
- Church, G. M. (1996) Databases for gene expression. *Nat Biotechnol.*, 4 : 828.
- Clements, K. M., B. M. Wiegmann, C. E. Sorenson, C. F. Smith, P. A. Neese & R. M. Roe, (2000) Genetic variation in the *Myzus persicae* complex (Homoptera : Aphididae) : evidence for a single species. *Annals of the Entomological Society America* 90 : 31-46.
- Doss, R. P.(1996) Differential display with out radioactivity- A modified procedure. *Biotechniques* 21: 408-410.

- Eggleston, D. S., Prescott, C. D. and Pearson, N. D. (1998) The many faces of RNA, Academic Press Limited, UK, pp.20-22.
- Fenton, B., J. A. Woodford & G. Malloch, (1998b) Analysis of clonal diversity of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in Scotland, UK and evidence for the existence of a predominant clone. *Molecular Ecology* 7 : 1475-1487.
- Field, L. M., N. Javed, M. F. Stribley & A. L. Devonshire, (1994) The peach-potato aphid *Myzus persicae* and the potato aphid *Myzus nicotianae* have the same esterase-based mechanisms of insecticide resistance. *Insect molecular Biology* 3 : 143-148.
- Footit, R. C. and L. Bonen (1990) Analysis of aphid species using mitochondrial DNA techniques, p. 285 *In* D. C. Peters, J. A. Webster, and C. S. Chlouber [eds.], Proceedings, aphid- plan interactions: populations to molecules. Oklahoma State University, Stillwater.
- Gorogh, T., Folz, B. J., Lippert, B. M., Gottschlich, S., Externbrink, J., Niemann, A. M., Werner, J. A. (1997) Reproducibility of nonradioactive DD RT-PCR method for detection of gene expression in squamous epithelial carcinoma cells of the upper aerodigestive tract. *Laryngorhinootologie* 76: 42-45.
- Gottschlich, S., Goeroegh, T., Folz, B. J., Lippert, B. M., Werner, J. A. (1997) Optimized differential display and reamplification parameters for silver staining. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 97:237-240.
- Ito, T., Kito, k., Adati, N., Mitsui, Y., Hagiwara, h., Sakaki, Y. (1994) Fluorescent differential display : Arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Lett* 351: 231-236.

- Kim, H. J., K. S. Boo & K. H. Cho, (1996) Absence of DNA poly-morphisms in *Myzus persicae* (Homoptera : Aphididae) in relation to their host plants. *Korean Journ.f Appl. Entom.* 35 : 209-215.
- Kociok, N., Unfried, K., Esser, P., Krott, R., Schraermeyer, U., Heimann, K. (1998) The nonradioisotopic representation of differentially expressed mRNA by a combination of RNA fingerprinting and differential display. *Mol Biotechnol* 9:25-33.
- Kolesova, D. A., Kuznetova, V. G. & Shaposhnikov, G. K. (1980) Clonal variability in peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) [in Russian]. *Entomologicheskoe Obozrenie* 59: 514-528.[English translation in *Ent. Rev. Wash.* 59: 21-34.
- Lampert, E. P. & C. A. Dennis, (1987) Life history of two color morphs of the green peach aphid (Homoptera : Aphididae) on flue-cured tobacco. *Tobacco Science* 31 : 91-93.
- Lee, S., Tomasetto, C., and Sager, R. (1991) Positive selection of candidate tumor suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc. Natl. Acad.Sci.USA* 88 : 2825-2829.
- Liang, L., Averboukh, L., and Pardee, A. B. (1993) Distribution of eukaryotic mRNAs as 2-D arrays by means of differential display : refinements and optimization. *Nucleic Acids Res.* 21: 3267-3275.
- Liang, P., and Pardee, A. B. (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257 : 967-970.
- Liang, P., Zhu, W., Zhang, X., Guo, Z., O'Connell, R. p., Averboukh, L., Wang, F., and Pardee, A. B. (1994) differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res.* 22 : 5763-5764.
- Llewellyn, k. S., S. P. Brookes, R. Harrington, H. D. Loxdale, P. Sunnucks, and K. Edwards. (1997) Using microsatellite DNA to study aphid

- genetic heterogeneity in UK (abstr.) volume. Fifth International Symposium of Aphids. Leon University, Leon, Spain.
- Lockhart, D. J., Dong, H., Byrne, M. C., Follettie, M.T., Gallo, M.V., Chee, M. S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., and Brown, E.L. (1996) Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 14 : 1675-1680.
- Lohmann, L., Schickle, H., Bosch, TCG (1995) REN display, a rapid and efficient method for nonradioactive differential display and mRNA isolation. *Bio Techniques* 18 : 200-202.
- Margaritopoulos, J. T., Mamuris, Z., Tsitsipis, J. A. (1998) Attempted Discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Homoptera : Aphididae) by Random Amplified Polymorphic DNA Polymerase Chain Reaction Technique. Entomological Society of America.
- Margaritopoulos, J. T., Z. Mamuris & J. A. Tsitsipis, (1998) Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Homopreta : Aphididae) by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique. *Annals of the Entomological Society America* 91 : 602-607.
- Marshall, G. and Walters, D. (1994) Molecular biology in crop protection, Chapman & Hall, UK, pp.10-20.
- Martin, K., Kwan, C.-P., and sager, R. (1997) Direct-sequencing-based strategy for identifying and cloning cDNAs from differential display gels. *In Methods in molecular Biology. Differential Display : methods and Applications* (Pardee, A. B. and Liang, P.) Humana, Totorea, N. J. (in press).
- May, B. & F. R. Holbrook, (1978) Absence of genetic variability in the green peach aphid *Myzus persicae* (Hemipreta : Aphididae). *Annals of the Entomological Society America* 71: 809-812.

- Meier-Ewert, S., Maier, E., Ahmadi, A., Curtis, J., and Lehrach, H. (1993) An automated approach to generating expressed sequence catalogues. *Nature* 361 : 375-376.
- Motlik, J., Carnwath, J. W., Herrmann, D., Terletski, V., Anger, M., Niemann, H. (1998) Automated recording of RNA differential display patterns from pig granulose cells. *Bio techniques* 24: 148-153.
- Okubo, K. et al. (1992) Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat. Genet.* 2 : 173-179.
- Okubo, K., Hori, N., Matoba, R., Niiyama, T., Fukushima, A., Kojima, Y., et al. (1992) Large scale cDNA sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat Genet.* 2 : 173-179.
- Pienta, K. J., Schwad, E. D. (2000) Modified Differential Display Technique that Eliminates Radioactivity and Decreases Screening Time. *Bio Techniques* 28 : 272-277.
- Pietzsch, A., Büchler, C., Aslanidis, C., Schmitz, G. (1997) Identification and characterization of a novel monocyte/macrophage differentiation – dependent gene that is responsive to lipo-polysaccharide, ceramide, and lyso-phosphatidylcholine. *Biochem Biophys Res Commun* 235:4-9.
- Rayani, H. H., Wert, J. J., Floros, J. (1998) Expression and cDNA sequence of helix destabilizing protein (HDP) in rat lung, *Experimental Lung Research*, 24 : 101-118.
- Sager, R., Anisowicz, A., Neveu, M., Liang, P., and Sotiropoulou, G. (1993) Identification by differential display of alpha 6 integrin as a candidate tumor suppressor gene. *FASEB J.* 7 : 964-970
- Schema, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270 : 467-470.

- Singh, R. P. (1998) Reverse-transcription polymerase chain reaction for the detection of viruses from plants and aphids, *Journal of Virological Methods*, 74 : 125-138.
- Takada, H. (1979) Esterase variation in Japanese population *Myzus persicae*(Sulzer) (Homoptera:Aphididae), with special reference to resistance to organophosphorus insecticides. *Applied Entomology and Zoology* 14: 245-255.
- Takada, H. (1986) Genotype composition and insecticide resistance of Japanese population of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* 100 : 451-458.
- Takahashi, N., Hashida, H., Zhao, N., Misumi, Y., and Sasaki, Y. (1995) High-density cDNA filter analysis of the expression profiles of the genes preferentially expressed in human brain. *Gene* 164 : 219-227.
- Villee, C. A., Solomon, E. P., Martin, C. W., Martin, D. W., Berg, L. R. and Davis, W. P., (1989) Biology, Saunders College Publishing, U.S.A., pp.77-79, 317-340, 370-372.
- Wan, J. S., sharp, S. J., Poirier, G. M.-C., Wagaman, P. C., Chambers, J. C., Pyati, J., Hom, Y.-L., Galindo, J. E., Huvar, A., Peterson, Per A., Javkson, M. R., and Erlander, M. G. (1996) Cloning differentially expressed mRNAs. *Nat. Biotechnol.* 14 : 1685-1691.
- Welsh, J. et al. (1992) Arbitrarly primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucleic Acids Res.* 20 : 4965-4970.
- Xinkang, W., Xiang, L., Feuerstein, G. Z. (1998) Use of Novel Downstream Primers for Differential Display RT-PCR. *Bio Techniques* 24 : 382-386.
- Zagorovskii, A. V. (1947) Leaf peach aphid (*Myzodes persicae* Sulzer) as a tobacco pest in Uzbekistan and measures for its control [in Russian]. 45 pp. Frunze Zos, Vsesoyuzny Institute Tabaka and Makhorki [cited in Kolesova *et al.*, 1980].

- Zhao, S., Ooi, S. L., and Pardee, A. B. (1995) New primer strategy improves precision of differential display. *Bio Techniques* 20 : 842-850.
- Zhu, Y. C., Dowdy, A. K., Baker, J. E. (1999) Differential mRNA expression levels and gene sequences of a carboxylesterase-like enzyme from two strains of the parasitoid *Anisopteromalus calandrae* (Hymenoptera : Pteromalidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 : 417-425.
- Αρσενάκης, Μ. (1999) Μοριακή βιολογία, Σημειώσεις από τις παραδόσεις του μαθήματος, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Γούναρης, Ι. (2000) Μοριακή Γενετική, Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο Ιωαννίνων, Βόλος.
- Σωτηροπούλου, Γ. (1997) Ταυτοποίηση και κλωνοποίηση καρκινικών γονιδίων με τη μέθοδο Differential Display, Σύγχρονες απόψεις στη βιοχημεία, Πρακτικά ημερίδας, Θεσσαλονίκη.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. (1995) Εντομολογία, University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Τζανακάκης, Μ. Ε. και Κατσόγιαννος, Β. Ι. (1998) Έντομα καρποφόρων δέντρων και αμπέλου, Αγρότυπος, Αθήνα.

