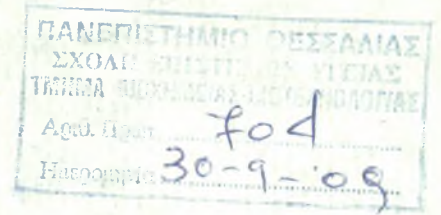




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**"Μοριακή Ανίχνευση του Φύλου στο σημαντικότερο παράσιτο της ελιάς,
Bactrocera oleae."**



**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΧΡΟΝΗ ΑΝΤΩΝΙΑ**



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

Αριθ. Εισ.: 7648/1
Ημερ. Εισ.: 03-11-2009
Δωρεά: Π.Θ.
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2009
ΧΡΟ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087177

Στη μνήμη των ανθρώπων που έφυγαν.

Και στους ανθρώπους που έχουν μάθει ακόμη να ονειρεύονται, να επιμένουν και να
πραγματοποιούν τα όνειρα τους.
Σε αυτούς που ταξιδεύουν σε κάθε ευκαιρία και με κάθε "μεταφορικό" μέσο.

Η εμπειρία αυτή μου δίδαξε τι σημαίνει να προσπαθείς και να παλεύεις για αυτό που πιστεύεις
και στο τέλος να έρχεται η ικανοποίηση της επιβράβευσης.
Τίποτα δεν είναι ακατόρθωτο αρκεί να το πιστέψεις.

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Εντομολογίας του τμήματος Βιολογίας Ζώων του Πανεπιστημίου της Pavia στην Ιταλία (Laboratory of Molecular Biology and Insects, Department of Animal Biology, University Of Pavia, Italy), υπό την επίβλεψη του καθηγητή Gasperi Giuliano.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου που με στηρίζει ανελλιπώς σε κάθε μου επιλογή.




Νιώθω υποχρεωμένη να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μαθιόπουλο Κ. που μου έδωσε την ευκαιρία να πραγματοποιήσω το πρόγραμμα ευρωπαϊκών σπουδών Erasmus και με σύστησε σε μια υπέροχη ομάδα εργαστηρίου, όπου με βοήθησαν και με έκαναν μέλος της ομάδας τους πολύ γρήγορα. Θέλω να ευχαριστήσω τους καθηγητές Gasperi Giuliano, Malacrida Anna και Gomulski Ludvic για την εμπιστοσύνη που έδειξαν ως προς το πρόσωπο μου αναθέτοντας μου ένα ιδιαίτερα ενδιαφέρον ερευνητικό έργο.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο Διδάκτορα Gabrieli Paolo, που κατά την διεξαγωγή της διπλωματικής εργασίας, υπήρξε μέντορας μου. Με δίδαξε με αστείρευτη υπομονή, συμβουλεύοντας και βοηθώντας με σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα, μετατρέποντας τον άμεσα σε έναν απίστευτο άνθρωπο και φίλο.

Ευχαριστώ, επίσης, τον Καθηγητή κ. Αυγουστίνο Α. για τη βοήθεια του κατά τη συγγραφή της εργασίας καθώς και τους υποψήφιους Διδάκτορες Bonomi Angelica, Scolari Francesca, Siciliano Paolo και Τσουμάνη Κωνσταντίνα για την πολύτιμη βοήθεια και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

Τέλος, ευχαριστώ όλους τους ανθρώπους, που με άμεσο ή έμμεσο τρόπο, μου πρόσφεραν ηθική υποστήριξη και μου έδιναν δύναμη όλο αυτό το διάστημα..

Τριμελής Επιτροπή

- Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος
Επίκουρος Καθηγητής της Μοριακής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας 
- Gasperi Giuliano
Καθηγητής (Professore ordinario) του τμήματος Βιολογίας Ζώων του Πανεπιστημίου της Pavia (Department of Animal Biology, University Of Pavia, Italy) 
- Αυγουστίνος Αντώνιος
Διδάσκων ΠΔ407 του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας 

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Ο δάκος της ελιάς, <i>Bactrocera oleae</i>	2
1.1.a Μορφολογία.....	2
1.1.b Βιολογικός κύκλος.....	2
1.1.c Συμπτώματα και Ζημιές.....	4
1.1.d Αντιμετώπιση.....	5
1.2 Φυλοδιαχωρισμός στο δάκο, <i>Bactrocera oleae</i>	6
1.2.a Μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυλετικών χρωμοσωμάτων.....	7
1.2.b Τα Ys και ο λόγος εξέλιξης του Y χρωμοσώματος.....	8
1.2.c Βασικά χαρακτηριστικά των χρωμοσωμάτων "Y" τύπου.....	9
1.2.d Συστήματα Φυλοδιαχωρισμού	9
1.2.e Δομή του Y χρωμοσώματος.....	11
1.3 Ανάλυση Αντιπροσωπευτικής Πέψης.....	12
ΣΚΟΠΟΣ.....	15
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	16
2.1 Δείγματα του δάκου <i>Bactrocera oleae</i>	16
2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από <i>Bactrocera oleae</i> με τη χρήση φαινόλης: "Μέθοδος του Baruffi"	16
2.3 Απομόνωση RNA από θηλυκά άτομα <i>Ceratitidis capitata</i> (Trizol, Invitrogen).....	17
2.4 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	17
2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	17
2.6 Κατασκευή βιβλιοθήκης "Ανάλυσης Αντιπροσωπευτικής Πέψης"	18

2.6.I. Δημιουργία Αντιπροσωπευτικών πέψεων	18
2.6.II. DP1, Differential Product I.....	20
2.6.III. DP2, Differential Product II	20
2.6.IV. DP3, Differential Product III	21
2.7 Κλωνοποίηση.....	21
2.8 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA (Miniprep).....	22
2.9 Ανάλυση κατά Southern	22
2.10 PCR με τη χρήση primers C1Af και C1Ar	24
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	25
3.1 Ποσοτικοποίηση γονιδιωματικού DNA ατόμων <i>Bactrocera oleae</i>	25
3.2 Ποσοτικοποίηση RNA από θηλυκά άτομα <i>Ceratitis</i> <i>capitata</i>	25
3.3 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα	25
3.4 Κατασκευή βιβλιοθήκης "Ανάλυσης Αντιπροσωπευτικής Πέψης"	26
3.4.I. Δημιουργία Αντιπροσωπευτικών πέψεων.....	26
3.4.II. DP1, Differential Product I.....	28
3.4.III. DP2, Differential Product II.....	28
3.4.IV. DP3, Differential Product III.....	29
3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA για MseI-DP3	30
3.6 Αλληλούχιση του C1A.....	31
3.7 Ενίσχυση δειγμάτων του <i>Bactrocera oleae</i> από το Ισραήλ με τον primer C1A.....	34
3.8 Ανάλυση των αλληλουχιών που ενισχύθηκαν με τους primers C1A σε αρσενικά άτομα	34
3.9 Ανάλυση των αλληλουχιών C1A.....	35
3.10 Ενίσχυση σε διάφορα άτομα <i>Bactrocera oleae</i>	37

ΣΥΖΗΤΗΣΗ	39
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	43

Εισαγωγή

Εισαγωγή

Η ελιά, και το λάδι που παράγεται από τον καρπό της, αποτελούν τα σημαντικότερα προϊόντα παραγωγής της λεκάνης της Μεσογείου εδώ και μερικές χιλιάδες χρόνια. Ολόκληροι πολιτισμοί ήκμασαν στο παρελθόν χάρη στην εμπορία του λαδιού, στοιχείο που στιγματίσει την πολιτιστική και πολιτισμική παράδοση κάποιων λαών. Οι αρχαίοι Έλληνες είχαν την ελιά ως το ιερό τους δέντρο και αξίζει να αναφερθεί ότι στους Ολυμπιακούς αγώνες δινόταν ως έπαθλο και στόλιζε την Ακαδημία του Πλάτωνα.

Η καλλιέργεια της ελιάς συνεχίστηκε, τρέφοντας και εξασφαλίζοντας οικονομικά πολλές γενεές μέχρι σήμερα. Είναι ένα φυτό που προσαρμόζεται άριστα στις κλιματολογικές συνθήκες της Μεσογείου και μέχρι σήμερα αποτελεί το κύριο γεωργικό προϊόν που παράγεται αλλά και εξάγεται σε τρίτες χώρες. Η καλλιέργεια της ελιάς είναι αρκετά εύκολη και ο τρόπος παραλαβής και επεξεργασίας του καρπού για την παραγωγή ελαιολάδου παραμένει ο ίδιος εδώ και χιλιάδες χρόνια. Η Ελλάδα είναι τρίτη σε όγκο παραγωγής ελαιολάδου χώρα στον κόσμο (μετά την Ιταλία και την Ισπανία), καλύπτει δε το 20,6% της παραγωγής της ΕΕ. Όσον αφορά την παγκόσμια κατανάλωση ελαιολάδου, αυτή ανέρχεται σε 1.640×10^3 τόνους (Πετούσης, 2002).

Η ευρωστία και η παραγωγικότητα του δέντρου διαταράσσεται είτε λόγω της προσβολής του από πλήθος ασθενειών, κυρίως μυκητολογικής προελεύσεως είτε λόγω δράσης παρασίτων και εντόμων. Πρέπει να σημειωθεί ότι η μόνη βακτηριακή πάθηση είναι ο καρκίνος της ελιάς. Οι εχθροί της ελιάς είναι κυρίως έντομα, όπως ο πυρηνοτρήτης (*Prays oleae*), ο οποίος προκαλεί ζημιές στα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς, ο θρίπας (*Liothrips oleae*), ο οποίος προσβάλλει τους

βλαστούς και τα φύλλα και συνήθως προκαλεί ανθόρροια, παραμόρφωση των καρπών και πτώση τους ή η μαργαρόνια (*Palpita unionalis*), η οποία προσβάλλει τα φύλλα.



Εικόνα 1: "Το δέντρο της ελιάς"

Ο σημαντικότερος, όμως, εντομολογικός εχθρός της ελιάς είναι ο δάκος *Bactrocera oleae* (ο οποίος στο παρελθόν ονομαζόταν *Dacus oleae*), που εμφανίζεται στη λεκάνη της Μεσογείου, τη βόρεια, ανατολική και νότια Αφρική, Μέση Ανατολή, βόρεια Ινδία, βορειοδυτικό Πακιστάν και όπου αλλού υπάρχει ελαιόδεντρο στο Ανατολικό ημισφαίριο. Πρόσφατα εντοπίστηκε και στην Καλιφόρνια. Ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού του εντόμου εντείνεται στα σημεία της καλλιέργειας με μεγαλύτερη υγρασία, ενώ εντοπίζεται λιγότερο στις περιοχές που είναι ζεστές και ξηρές. Τόσο τα ενήλικα έντομα όσο και οι κάμπιες, είναι σε θέση να προκαλέσουν ζημιές. Η προνύμφη του δάκου τρέφεται μέσα στον καρπό, καταστρέφοντας το σαρκώδες μέρος του και επιτρέποντας την εισχώρηση δευτερευόντων βακτηρίων και μυκήτων που προκαλούν σήψη στον καρπό και υποβαθμίζουν την ποιότητα και τη γεύση της ελιάς. Η σίτιση του εντόμου από τον καρπό προκαλεί την πρόωρη πτώση του

καρπού και υποβαθμίζει την ποιότητα τόσο της επιτραπέζιας ελιάς όσο και την παραγωγή ελαιολάδου.

Η μεγάλη οικονομική σημασία της ελαιοκαλλιέργειας κάνει επιτακτική την ανάγκη ανεύρεσης μεθόδων αντιμετώπισης των ασθενειών και των εχθρών που επιβαρύνουν το δέντρο της ελιάς, που θα εμφανίζουν άμεσα αποτελέσματα στην παραγωγή και βελτίωση της ποιότητας του ελαιόλαδου, αλλά και στο χρόνο ζωής και την φυσική κατάσταση του δέντρου.

1.1 Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*

Ο δάκος της ελιάς ανήκει στα μικρά φτερωτά αρθρόποδα, και συγκεκριμένα στην οικογένεια Tephritidae των Δίπτερων και θεωρείται το καταστρεπτικότερο έντομο της ελαιοκομίας (Rodanakis and Alissandrakis).

1.1.a Μορφολογία

Το τέλειο έντομο έχει μήκος 4-5 mm και άνοιγμα πτερύγων 12 mm. Η κεφαλή είναι σφαιρική, χρώματος υποκίτρινου με μεγάλους σύνθετους οφθαλμούς με πράσινες μεταλλικές ανταύγειες. Ο θώρακας είναι κιτρινόφαιος και διακρίνονται σε αυτόν τρεις στενές φαιές και επιμήκεις ταινίες που μερικές φορές είναι διακεκομμένες. Ο θυρεός είναι κίτρινος ή καστανός με κίτρινη κορυφή. Έχει δύο ζεύγη μεμβρανοειδών πτερύγων με μία καστανή κηλίδα στην κορυφή. Τα πόδια είναι ανοικτού κίτρινου χρώματος και η κοιλιά καστανόκίτρινη με δύο έως οκτώ σκοτεινόχρωμες κηλίδες που μερικές φορές δεν είναι ορατές ή λείπουν. Η προνύμφη είναι σκληρόμορφη, άποδη και έχει μήκος 7-8 mm. Είναι λευκή με σώμα κυλινδρικό οξύληκτο προς το μέρος της κεφαλής και διανύει τρεις ηλικίες ως την νύμφωση. Η νύμφη είναι καστανή

βαρελοειδής με ελαφρά κατάτμηση και έχει μήκος 4-5mm. Το αυγό είναι λευκό ελλειψοειδές και έχει μήκος 7-8 mm.



Εικόνα 2: "Αρσενικό άτομο"

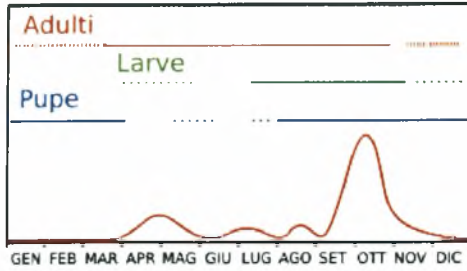
Τα θηλυκά έχουν μήκος 5 χιλ., άνοιγμα φτερών περίπου 10 χιλ. και διακρίνονται από τα αρσενικά από μια σκούρα σύνθεση στο άκρο του υπογαστρίου τους, που χρησιμεύει για να διατρυπούν τον ελαιόκαρπο και να εναποθέτουν εκεί τα αυγά. Συνήθως μόνο ένα αυγό εναποτίθεται ανά καρπό.



Εικόνα 3: "Θηλυκό άτομο"

1.1.b Βιολογικός Κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος του εντόμου ποικίλει ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες. Διαχειμάζει στο στάδιο της νύμφης στο έδαφος ή σε διάφορα καταφύγια. Τα πρώτα ενήλικα άτομα εμφανίζονται την περίοδο Απριλίου – Μαΐου και έχουν την τάση να κατευθύνονται και να παραμένουν στα πιο ηλιόλουστα μέρη του δέντρου. Τρέφονται με τις σακχαρούχες ουσίες των ανθέων ή τα μελιτώδη εκκρίματα άλλων εντόμων.



Εικόνα 4: "Δυναμική πληθυσμού"

Τα θηλυκά άτομα εναποθέτουν τα αυγά στον καρπό όταν αυτός έχει τουλάχιστον διάμετρο 7- 8 mm, περίπου την εποχή έναρξης σκλήρυνσης του πυρήνα. Το θηλυκό εναποθέτει ένα αυγό στον κάθε καρπό κάτω από το επικάρπιο ανοίγοντας μια οπή με τον ωσθέτη του. Τα νύγματα του δάκου στην επιφάνεια του καρπού εμφανίζονται καστανά με τριγωνικό σχήμα και στον ίδιο καρπό μπορούν αν εναποθέσουν τα αυγά τους και άλλα θηλυκά.



Εικόνα 5: "Ακμαίο άτομο δάκου σε πράσινο καρπό ελιάς"

Οι ώριμες προνύμφες των πρώτων γενεών που ζουν μέσα σε ανώριμους ακόμα καρπούς νυμφώνονται σε μία μικρή κοιλότητα σε επαφή με το επικάρπιο της ελιάς, ενώ εκείνες που βρίσκονται σε πιο ώριμους καρπούς, ανοίγουν μία οπή εξόδου από την οποία βγαίνουν και πέφτουν στο έδαφος όπου νυμφώνονται. Το έντομο πολλαπλασιάζεται ταχύτατα λόγω της μεγάλης γονιμότητας των θηλυκών και δίνει πολλές γενιές το χρόνο

(3 έως 6). Διαχειμάζει στο στάδιο της νύμφης στο έδαφος και ως προνύμφη ή ακμαίο σε καρπούς που παραμένουν το χειμώνα στα δέντρα της ελιάς. Έντονες εστίες προσβολής δάκου παραμένουν οι περιοχές όπου υπάρχουν αγριελιές καθώς και ποικιλίες που η συγκομιδή του καρπού συνεχίζεται μετά τα Χριστούγεννα ως την Άνοιξη.

Κάθε θηλυκός δάκος γεννά κατά μέσο όρο 150 αυγά. Οι προνύμφες, που προέρχονται από την εκκόλαψη των αυγών, ανοίγουν στοές και κατατρώγουν τη σάρκα του καρπού που πέφτει πριν ολοκληρωθεί η ελαιογένεση και η ωρίμανσή του. Κάθε προνύμφη περνά από το στάδιο της νύμφης και μεταμορφώνεται σε ακμαίο έντομο. Την προσβολή του καρπού από το δάκο ακολουθεί δευτερογενής προσβολή από μύκητες (*Macrophoma* sp.) που προκαλούν τη γνωστή «ξεροβούλα» της ελιάς και υποβαθμίζει την ποιότητα του καρπού, ιδιαίτερα στις βρώσιμες ελιές. Υποβαθμισμένη είναι επίσης και η ποιότητα του λαδιού (μεγάλη οξύτητα) που παράγεται από λαδολιές με προσβολή δάκου (Ροδανάκης και Αλυσσανδράκης).



Εικόνα 6: "Προνύμφη της 3^{ης} γενιάς"



Εικόνα 7: "Πληγή του επικαρπίου ως ένδειξη προσβολής του ελαιοκάρπου από ενήλικα άτομα"

Το κλίμα επηρεάζει τον κύκλο ζωής του δάκου κυρίως επειδή απαιτείται μια συγκεκριμένη θερμοκρασία και ένα ελάχιστο επίπεδο υγρασίας (πίνακας 1).

Στάδιο	Περίοδος	Φθινόπωρο-Χειμώνας
Αυγό	2-3 μέρες	10 μέρες (φθινόπωρο)
Προνύμφη	10-13 μέρες	20 μέρες ή περισσότερο
Νύμφη	10 μέρες	Μέχρι τους 4 μήνες (νύμφες που διαχειμάζουν)
Ενήλικο	Μέχρι μερικούς μήνες	

Πίνακας 1: "Κύκλος ζωής του δάκου *Bactrocera oleae*"

Η θερμοκρασία παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην βιωσιμότητα και στους ρυθμούς αναπαραγωγής του εντόμου. Η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης του δάκου είναι 20°C και σε αυτήν ο βιολογικός κύκλος διαρκεί 20 ημέρες. Θερμοκρασίες πάνω από 28°C και κάτω από 15°C μειώνουν την δραστηριότητα του εντόμου ενώ η ανάπτυξη του ωαρίου γίνεται αδύνατη. Ο βιολογικός κύκλος στους 12°C διαρκεί 100 ημέρες. Πάνω από 34°C οι ωοθήκες των θηλυκών δεν λειτουργούν κανονικά μειώνεται η δραστηριότητα των αρσενικών και αυξάνεται η θνησιμότητα των ακμαίων.

Ζημιές υφίστανται επίσης οι pronύμφες ενώ ευνοείται ο παρασιτισμός. Σημαντικό ρόλο στην βιολογία του δάκου παίζει η σχετική υγρασία. Σε τιμές πάνω από 90% και κάτω από 40% εμποδίζεται η παραγωγή των ωαρίων, ενώ σε σχετική υγρασία 60-90% βραχύνεται η ζωή των θηλυκών.

1.1.c Συμπτώματα και Ζημιές

Ο δάκος προκαλεί σοβαρές ζημιές γιατί κατατρώγει το μεσοκάρπιο της ελιάς που στην συνέχεια πέφτει. Οι στοές τις οποίες ανοίγουν οι pronύμφες στους άγουρους καρπούς εμφανίζονται εξωτερικά σαν σκούρες ελαιώδεις κηλίδες. Στα σημεία αυτά ο καρπός συρρικνώνεται και ξεραίνεται σε συνθήκες ξηρασίας ή σαπίζει όταν ο καρπός είναι υγρός. Η οπή ωοτοκίας του δάκου βοηθά την εγκατάσταση μυκήτων που προξενούν δευτερογενείς προσβολές, όπως του *Sphaeropsis dalmatica*. Μια pronύμφη καταναλώνει το 1/5- 1/4 ενός καρπού μέσου μεγέθους εκτός από την ποσοτική, επέρχεται και η ποιοτική καταστροφή με την υποβάθμιση της ποιότητας του λαδιού. Οι οπές εξόδου διευκολύνουν την εγκατάσταση μυκήτων με συνέπεια την υδρόλυση και αύξηση της οξύτητας του λαδιού. Επίσης, η έκθεση του λαδιού στον ατμοσφαιρικό αέρα συνεπάγεται την οξείδωση του. Σε έντονη προσβολή αλλοιώνονται οι οργανοληπτικοί χαρακτήρες (γεύση και χρώμα) του προϊόντος που παράγεται λόγω της παρουσίας των pronυμφών μέσα στους καρπούς.



Εικόνα 8: "Προνύμφες του δάκου στο εσωτερικό του καρπού της ελιάς"

Το ύψος των ζημιών που προκαλούνται μπορεί να φθάσει το 80 % της παραγωγής κάτω από ευνοϊκές για την ανάπτυξη του εντόμου συνθήκες και αν δεν εφαρμοστούν μέτρα καταπολέμησής του. Συνήθως όμως τα ποσοστά ζημιών περιορίζονται γύρω στο 5% με τις μεθόδους αντιμετώπισης που εφαρμόζονται σήμερα (Demetzos, 2005).

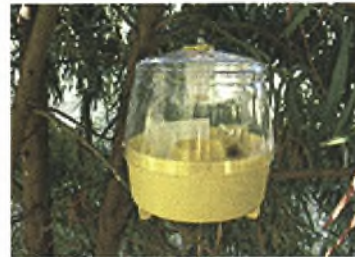


Εικόνα 9: "Προσβολή από δάκο, *Bactrocera oleae* σε ώριμους καρπούς ελιάς"

1.1.d Αντιμετώπιση

Ο έλεγχος των φυσικών πληθυσμών του εντόμου βασίζεται σε χημικές εφαρμογές, υπό την μορφή εντομοκτόνων. Η χρήση τους διακρίνεται είτε σε προληπτικό επίπεδο με εφαρμογή πρωτεϊνούχων δολωματικών ραντισμάτων που περιέχουν ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο είτε σε καθολικό θεραπευτικό ράντισμα με πλήρη κάλυψη των ελαιοδέντρων με το κατάλληλο εντομοκτόνο (οργανοφωσφορικά). Με τα προληπτικά ραντίσματα επιδιώκεται να θανατωθούν τα ενήλικα πριν αποθέσουν τα αυγά τους στον καρπό, ενώ με τα θεραπευτικά ραντίσματα επιδιώκεται η θανάτωση των προνυμφών που ήδη βρίσκονται μέσα στη σάρκα. Σήμερα, όμως, οι σύγχρονες απαιτήσεις των καταναλωτών, αλλά και οι αυστηρές οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την παραγωγή προϊόντων χωρίς υπολείμματα χημικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων, οδηγούν στη χρήση βιολογικών μεθόδων καταπολέμησης του δάκου, με απαραίτητη προϋπόθεση τη μη χρήση χημικών ουσιών.

Έτσι, τη σκυτάλη από τις χημικές ουσίες δείχνουν ότι παίρνουν ο βιολογικός έλεγχος, όπου η εξάλειψη του δάκου γίνεται μετά από προσβολή του από παρασιτικές σφήκες και οι δακοπαγίδες, οι οποίες έχουν στόχο τη μαζική παγίδευση του εντόμου. Υπάρχουν πολλοί τύποι παγίδων, άλλες αρκετά και άλλες λιγότερο αποτελεσματικές, που εκμεταλλεύονται διάφορα ερεθίσματα για να προσελκύσουν το έντομο και να παγιδευτεί εκεί. Υπάρχουν παγίδες, οι οποίες χρησιμοποιούν ερεθίσματα φαγητού ή οπτικά ερεθίσματα (εικόνα 10), όπου γίνεται χρήση κολλώδων υλικών όπως επίσης και παγίδες που έχουν ως δόλωμα τη φερομόνη.



Εικόνα 10: " Mcphail trap"

Οι τελευταίες χρησιμοποιούνται σε περιόδους αναπαραγωγής του εντόμου (Econoποπουλος et al, 1986). Για μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα κρίνεται αναγκαία η χρήση παραπάνω του ενός τύπου παγίδας (Katsoyannos, 1992). Στα πλαίσια καταπολέμησης του *Bactrocera oleae* και προστασίας των καλλιεργειών της ελιάς εναλλακτικά προτείνεται η χρήση της περιβαλλοντικά φιλικής τεχνικής στείρωσης των εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT). Η μέθοδος αυτή συνιστά την απελευθέρωση μεγάλου αριθμού αρσενικών στείρων ατόμων (κατόπιν εφαρμογής ακτινοβολίας γ ή X) στη φύση με ελεγχόμενο τρόπο, τα οποία ανταγωνίζονται τα αρσενικά άτομα αγρίου τύπου κατά τη σύζευξή τους με τα θηλυκά, μειώνοντας την αναπαραγωγή του πληθυσμού. Τα αρσενικά αυτά άτομα είναι ικανά προς σύζευξη και μεταφορά

σπέρματος, όμως το σπέρμα αυτό καθ' αυτό αδυνατεί να δώσει γένεση σε απογόνους και αν προκύψουν κάποια άτομα θα πεθάνουν πρόωρα πριν ολοκληρωθεί η ανάπτυξη τους λόγω των προκαλούμενων από την ακτινοβόληση χρωμοσωμικών δομικών αλλαγών (Robinson, 2002). Όταν τα εργαστηριακά αρσενικά άτομα απελευθερωθούν στο περιβάλλον και ζευγαρώσουν με τα θηλυκά άτομα αγρίου τύπου, δεν παράγονται απόγονοι. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την καταστολή του πληθυσμού αγρίου τύπου (Augustinos et al., 2008).

Οι βιολογικοί μέθοδοι ελέγχου, όπως αυτή της τεχνικής στείρωσης των εντόμων (SIT) αναπτύχθηκαν με στόχο την βελτίωση της αποτελεσματικότητας της διαχείρισης των επιβλαβών εντόμων. Η μέθοδος SIT μπορεί θεωρητικά να εφαρμοστεί στα περισσότερα είδη εντόμων, εξασφαλίζοντας έναν ικανοποιητικό αριθμό εντόμων που μπορούν να ανατραφούν και να απελευθερωθούν στη συνέχεια στη φύση. Η τεχνική αυτή έχει αποδειχτεί ένα πολύτιμο εργαλείο για τον έλεγχο αρκετών πληθυσμών, συμπεριλαμβανομένου και του είδους *Ceratitis capitata* (Hendrichs et al., 1983).

Από την άλλη πλευρά, όμως, παρουσιάζονται προβλήματα καθώς τα εργαστηριακά έντομα εμφανίζουν γενετική αστάθεια. Δεδομένου της ανικανότητας να διακριθούν τα αρσενικά από τα θηλυκά άτομα, απελευθερώνονται εξίσου στη φύση και τα δυο φύλα. Παρόλο που τα θηλυκά είναι στείρα, καταφέρνουν και πάλι να καταστρέψουν τον καρπό. Ανοίγουν και πάλι σπές για την εναπόθεση των αυγών, αφήνοντας τον καρπό ανοιχτό και εκτεθειμένο σε μολύνσεις από μύκητες. Επίσης, τα εργαστηριακά έντομα όταν απελευθερωθούν στη φύση αδυνατούν να ανταγωνιστούν τα έντομα αγρίου τύπου και τελικά εκτοπίζονται

Το γεγονός αυτό οδηγεί στην ανάγκη δημιουργίας μιας αποτελεσματικής και

απλής μεθόδου, όπου θα επιτρέπει τον φυλοδιαχωρισμό των ατόμων σε εμβρυικό στάδιο, δίχως την πολύπλοκη επέμβαση στο γονιδίωμα των εντόμων, και τελικά την ελεγχόμενη απελευθέρωση αρσενικών μόνο ατόμων στο περιβάλλον.

1.2 Φυλοδιαχωρισμός στο δάκο, *Bactrocera oleae*

Στο τέλος του 19^{ου} αιώνα, παρατηρήθηκε από τον H.Henking, η παρουσία "σωμάτων", που παρουσίαζαν σκούρες περιοχές (darkly-staining body) στα αρσενικά άτομα, τα οποία συμπεριφέρονταν διαφορετικά από ότι τα άλλα χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της μείωσης. Αναφέρθηκε στο χρωμοσωμικό αυτό σώμα ως "X" θέλοντας να περιγράψει την μυστηριώδη φύση του. Στις αρχές του 1900, ο E.B.Wilson παρατήρησε διαφορές στα χρωμοσώματα των φύλων σε διάφορα είδη εντόμων της οικογενείας Hemiptera. Πιο συγκεκριμένα, παρατήρησε δύο πιθανούς τύπους χρωμοσωμάτων στα αρσενικά άτομα. Στον πρώτο τύπο, τα αρσενικά περιλάμβαναν από ένα ζευγάρι ετερομορφικών χρωμοσωμάτων, το οποίο κατά τη διάρκεια της μείωσης, διαχωριζόταν σε δύο διαφορετικά θυγατρικά κύτταρα. Στον δεύτερο τύπο, τα αρσενικά άτομα είχαν ένα από αυτά τα ετερομορφικά χρωμοσώματα, ενώ τα θηλυκά είχαν δύο. Ο Wilson, αργότερα, αναφέρθηκε συλλογικά σε αυτά τα ετερομορφικά χρωμοσώματα ως τα "χρωμοσώματα φύλου" και ιδιαίτερα μίλησε για "X χρωμόσωμα" και για "Y χρωμόσωμα" (Mittwoch, 1967). Ήταν τότε που άρχισε να γίνεται γνωστό, σε μερικά είδη, ότι δεν είναι τα αρσενικά το ετερογαμετικό φύλο ούτε το X ή το Y τα μοναδικά ετερομορφικά χρωμοσώματα. Στα ζώα, όπως είναι τα πουλιά, τα θηλυκά είναι το ετερογαμετικό φύλο, περιλαμβάνοντας τα Z και τα W

χρωμοσώματα. Αυτά τα χρωμοσώματα είναι ετερομορφικά, με το W χρωμόσωμα να είναι κατά ένα μεγάλο μέρος ετεροχρωματικό και μικρότερο σε μέγεθος από το Z χρωμόσωμα (Solari, 1994).

1.2.α Μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυλετικών χρωμοσωμάτων

Τα φυλετικά χρωμοσώματα X και Y εμφανίζουν ευδιάκριτες μορφολογικές και γενετικές διαφορές αποδεικνύοντας ότι έχουν εξελιχθεί ανεξάρτητα σε πολλές ομάδες ζώων και φυτών (Bull 1983 και Charlesworth 1996). Ένα αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό είναι η σχεδόν ολοκληρωτική εξάλειψη γονιδίων από το Y χρωμόσωμα (ή W χρωμόσωμα στις ομάδες με θηλυκό ετερογαμέτη, χρησιμοποιείται όμως κάποιες φορές ο όρος Y χρωμόσωμα και για τα δύο είδη συστημάτων), εκτός από κάποια γονίδια που σχετίζονται με ειδικές λειτουργίες του ετερογαμετικού φύλου. Η ύπαρξη ενός διαβρωμένου γενετικά Y χρωμοσώματος σε πολλά taxa με διακριτά φυλετικά χρωμοσώματα συνδέεται με την αντιστάθμιση δόσης (dosage compensation) (Bull 1983 και Charlesworth 1996). Το πρώτο βήμα στην εξέλιξη των φυλετικών χρωμοσωμάτων πρέπει να έχει συμπεριληφθεί στην εγκαθίδρυση περιορισμένου ανασυνδυασμού γονιδίων ανάμεσα σε ένα ζευγάρι πρώτο-X και πρώτο-Y χρωμοσώματος (Muller, 1918) πιθανώς ως απάντηση στην ανάγκη να προληφθεί ο ανασυνδυασμός γονιδίων ανάμεσα σε γονίδια με πρωταρχικούς ρόλους φυλετικού διαχωρισμού, τα οποία μπορούσαν να οδηγήσουν σε γέννηση ατόμων ερμαφρόδιτων ή σεξουαλικά ανενεργών (στείρα άτομα) (Lewis 1942, Charlesworth & Charlesworth 1978 και Charlesworth 1996a). Παρόλα αυτά, ο φυλετικός διαχωρισμός σε πολλούς σύγχρονους οργανισμούς μπορεί μόνο να περιλαμβάνει διαφορά σε ένα μοναδικό

μείζων διακόπτη γονιδίων (Bull 1983). Ο διαχωρισμός αυτός μπορεί να αποτελεί την αρχική εξελικτική μετάβαση από τον ερμαφροδιτισμό ή τον περιβαλλοντικό φυλετικό διαχωρισμό σε ξεχωριστά φύλα. Αυτός ο διακόπτης πιθανόν να περιλαμβάνει αρκετούς γονιδιακούς τόπους καθορίζοντας το φυλετικό φαινότυπο (Westergaard 1958, Charlesworth & Charlesworth 1978 και Charlesworth 1996a).

Αν συμβεί ένας γενετικός φυλετικός διαχωρισμός, ο οποίος θα επιλέγει τα αλληλόμορφα που είναι πλεονεκτικά για τα αρσενικά άτομα αλλά μειονεκτικά για τα θηλυκά, μπορεί να οδηγήσει σε διαφοροποίηση ανάμεσα στα δύο φυλετικά χρωμοσώματα (Rice 1996). Αυτό προκαλεί την εντύπωση για περισσότερη εξέλιξη ενός εν τη γενέσει Y χρωμοσώματος. Στο σημείο αυτό θα έπρεπε να τεθεί το ερώτημα γιατί αφού τα περισσότερα από τα γονίδια είχαν αρχικά εμφανιστεί και στα πρώτο- X και στα πρώτο-Y χρωμοσώματα, τώρα έχουν πλέον εξαφανιστεί από τα Y χρωμοσώματα. Η απάντηση πρέπει να εντοπίζεται στη δημιουργία ενός φράγματος μη ανασυνδυασμένων γονιδίων, το οποίο περιορίζει το ένα φύλο και δεν του επιτρέπει να μετατραπεί ποτέ σε ομόζυγο. Έχουν προταθεί διάφορα μοντέλα για τον εκφυλισμό του πρώτο-Y χρωμοσώματος χωρίς όμως ακόμη να υπάρχει η δυνατότητα επιβεβαίωσης τους. Ένας λόγος για την ανεπάρκεια δοκιμών είναι ότι τα πιο συνήθη και λεπτομερώς εξετασμένα συστήματα για τα φυλετικά χρωμοσώματα, όπως είναι αυτών της *Drosophila* και των θηλαστικών, είναι πολύ παλιά και δίνουν πολύ λίγες ενδείξεις για την εξελικτική τους προέλευση (αλλά βλέπε και Lahn & Page 1999). Ταυτόχρονα, όμως γνωρίζουμε λίγα πράγματα για τα Y χρωμοσώματα από πιο πρόσφατες πηγές, όπως είναι αυτά των διετών φυτών (Westergaard 1958, Charlesworth and Guttman 1999), ή για συστήματα νέο-Y χρωμοσωμάτων στα

οποία η συγχώνευση ή η εκτόπιση μεταξύ ενός αυτοσωμικού ή φυλετικού χρωμοσώματος έχει δημιουργήσει ένα νέο χρωμοσωμικό βραχίονα ο οποίος πρέπει να υποστεί τις ίδιες εξελικτικές πιέσεις με τα Y χρωμοσώματα (Lucchesi 1978, Charlesworth 1996a, Steinemann and Steinemann 1998).

1.2.b Τα Ys και ο λόγος της εξέλιξης του Y χρωμοσώματος

Οι καταγεγραμμένες διαφορές στην αλληλουχία και στη σύνθεση των γονιδίων ανάμεσα στα καλά χαρακτηρισμένα ετερομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα στα διάφορα είδη, όπως είναι ο άνθρωπος και η *Drosophila*, οδηγούν σε ερωτήματα, όπως το γιατί να υπάρχει τόση ανομοιότητα μεταξύ αυτών των δύο χρωμοσωμάτων.

Τα Y χρωμοσώματα έχουν εκφυλιστεί γενετικά, έχοντας χάσει ένα μεγάλο μέρος των ενεργών γονιδίων που εμφανίζονταν στους προγόνους τους. Οι πιθανές αιτίες του προκαλούμενου εκφυλισμού έχουν ελκύσει το ενδιαφέρον των επιστημών της Θεωρητικής Εξέλιξης (Charlesworth, 2000). Θεωρίες αντιμάχονται στην προσπάθεια τους να εξηγήσουν την μεταβλητότητα των φυλετικών χρωμοσωμάτων, όμως ακόμη καμία δεν προσφέρει μια ολοκληρωμένη απάντηση.

Σε μια πρώτη προσέγγιση πρέπει να γίνει αναφορά στο μοντέλο των Μεταλλάξεων και της Επιλογής, όπου κατά τη διάρκεια του εκφυλισμού του Y χρωμοσώματος παρουσιάζεται έλλειψη ανασυνδυασμού των γονιδίων (Charlesworth, 2000).

Το δεύτερο μοντέλο παρέκκλισης για τα φυλετικά χρωμοσώματα, απευθυνόμενο ιδιαίτερα στον εκφυλισμό χρωμοσωμάτων όπως το Y, είναι κοινώς γνωστό ως οδοντωτός τροχός αναστολής της Muller (Muller's ratchet). Η J. Muller θεώρησε ότι τα X και Y χρωμοσώματα προέρχονται από ομόλογα χρωμοσώματα (Charlesworth, 1978). Η υπόθεση της Muller ισχυρίζεται

ότι σε κάποιο σημείο το Y απέτυχε να ανασυνδυαστεί με το X και ότι αυτό συνέχισε να αποτυγχάνει να υποβληθεί σε ανασυνδυασμό, μετατρέποντας το Y χρωμόσωμα σε μια "μόνιμα ετερόζυγη" κατάσταση (Charlesworth, 1978). Η έλλειψη ανασυνδυασμού επέτρεψε την καθιέρωση επερχόμενων μεταλλάξεων στο Y, κάποιες από τις οποίες προκάλεσαν απώλεια λειτουργίας. Ενώ σε φυσιολογικά ανασυνδυαζόμενα χρωμοσώματα, οι επιβλαβείς μεταλλάξεις εξαλείφονται χάρη στο Γενετικό Ανασυνδυασμό και στην Επιλογή, το μοντέλο Muller's ratchet προβλέπει ότι ο συνολικός αριθμός των μεταλλάξεων σε ένα μη ανασυνδυασμένο χρωμόσωμα θα αυξάνεται συνεχώς σε έναν πληθυσμό με αμετάβλητο μέγεθος (λόγω της έλλειψης του ανασυνδυασμού). Με τον καιρό, ο αριθμός των ατόμων που φέρουν χρωμοσώματα "ανεξάρτητα από μεταλλάξεις" θα μειωθεί τόσο ώσπου να εξαφανιστούν μόνιμα από τον πληθυσμό. Τελικά, θα παραμείνουν άτομα που θα περιέχουν χρωμοσώματα με ένα ή περισσότερα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα. Η Muller θεωρεί ότι αυτή είναι μια συνεχόμενη διαδικασία, όπου η γενιά των ατόμων που περιέχουν ένα μεταλλαγμένο αλληλόμορφο του χρωμοσώματος τελικά θα χαθεί, ακολουθούμενο από τη γενιά αυτή των περιεχομένων με δυο μεταλλαγμένα αλληλόμορφα και ούτω καθεξής. Η μόνιμη απώλεια από ολόκληρες "γενιές" ατόμων και η αύξηση εγκαθιδρυμένων μεταλλάξεων στο χρωμόσωμα θα αλλάξουν το ρυθμό εγκαθίδρυσης των μεταλλάξεων (Charlesworth, 1978). Αυτό θα μπορούσε τελικά να οδηγήσει σε απώλεια λειτουργικών, αγρίου τύπου, γονιδίων και σε μια βαθμιαία απόκλιση της αλληλουχίας μεταξύ των φυλετικών χρωμοσωμάτων, η οποία σε τελευταία ανάλυση θα οδηγήσει σε ολοκληρωτική απενεργοποίηση του Y χρωμοσώματος (Gordo and Charlesworth, 2001).

Ένα άλλο μοντέλο είναι εκείνο της Επιλογής υποστρώματος (Charlesworth et al. 1993, "Background selection" Charlesworth 1994), ή "background trapping" (Rice, 1996), καθώς και το φαινόμενο "Hill Robertson" της ασθενούς επιλογής (McVean and Charlesworth, 2000), τα οποία προσεγγίζουν σε μεγάλο βαθμό το μοντέλο της Muller. Τα μοντέλα αυτά υποστηρίζουν ότι μια ουδέτερη ή ασθενώς επιλεγόμενη μεταλλαγή η οποία αυξάνεται σε ένα μεγάλο πληθυσμό που δεν υφίσταται εξελικτικές πιέσεις, όπως είναι ο γενετικός ανασυνδυασμός, έχει μια μη μηδενική πιθανότητα να επιβιώσει, μόνο εάν εδραιωθεί αυθόρμητα σε ένα χρωμόσωμα μια σταθερή και επιβλαβής μετάλλαξη (Fisher 1930, Charlesworth 1994, Peck 1994 και Barton 1995).

Τέλος, υπάρχει και το μοντέλο Hitchhiking, το οποίο αναφέρεται σε προτιμώμενες / επιλεγόμενες μεταλλαγές. Οι Maynard Smith and Haigh (1974) υπήρξαν οι πρώτοι που μελέτησαν το φαινόμενο εξάπλωσης μιας μεμονωμένης μετάλλαξης σε συνδεδεμένους ουδέτερους γενετικούς τόπους. Είναι φανερό ότι όταν υπάρχει διασύνδεση μεταξύ δύο γενετικών τόπων, όπως αυτών που υπάρχουν σε ένα πρώτο-Y χρωμόσωμα, η "επιλεγόμενη σάρωση" για ένα προτιμητέο αλληλόμορφο θα εξαλείψει όλη την ποικιλότητα στον ουδέτερο γενετικά τόπο· ουδέτερη ποικιλότητα ή σχεδόν ουδέτερη θα ανακτηθεί μόνο πολύ αργά, καθώς νέες παρεκκλίσεις θα προστεθούν και θα συσσωρευτούν σε υψηλές συχνότητες. Επίσης, επιλογικές σαρώσεις σε ένα μη ανασυνδυασμένο γενετικά γονιδίωμα μπορούν να εξισορροπήσουν την στερεοτυπική συμπεριφορά που παρουσιάζουν τα μεταλλαγμένα αλληλόμορφα στην προτιμητέα μετάλλαξη, έτσι ώστε οι υιοθετημένες αντικαταστάσεις σε ένα πρώτο-Y χρωμόσωμα να οδηγούν στην εγκαθίδρυση επιβλαβών μεταλλάξεων σε πολλούς γενετικούς τόπους, συμβάλλοντας

στην εκφύλιση του (Rice, 1987). Το γεγονός, όμως, ότι αυτές οι προτιμητέες μεταλλάξεις πρέπει να είναι σταθερά επιλεγόμενες σαν επιβλαβείς μεταλλάξεις και γενετικά απομονωμένες σε ένα υπόβαθρο ούτως ώστε να έχουν μια καλή πιθανότητα να εγκαθιδρυθούν όταν δεν υπάρχει γενετικός ανασυνδυασμός (Peck, 1994), καθιστά τον μηχανισμό αυτό αμφισβητήσιμο (Charlesworth, 1996a).

1.2.c Βασικά χαρακτηριστικά των Y χρωμοσωμάτων

Τα Y χρωμοσώματα παρουσιάζουν ενδιαφέρον για πολλούς λόγους. Καταρχάς, εμφανίζεται συχνά η περίπτωση με τα ετερομορφικά φυλετικά χρωμοσώματα, όπως είναι το Y, όπου οι συμβατικοί κανόνες ενός χρωμοσώματος ζευγαρωμένου και ανασυνδυασμένου όπως παρουσιάζεται από τα αυτοσωμικά, δεν μπορεί να εφαρμοστεί. Γενικά, υπάρχει μια αξιοσημείωτη διαφορά στο σχετικό μέγεθος και στον συνδυασμό γονιδίων των φυλετικών χρωμοσωμάτων, τόσο σημαντική ώστε τις περισσότερες φορές, μόνο επιλεγμένες περιοχές αυτών των χρωμοσωμάτων να διατηρούν ακόμη ορθό ζευγάρωμα και διασταύρωση και μετά το πέρας της μείωσης.

Κατά δεύτερον, σε μερικά είδη που περιέχουν το Y χρωμόσωμα έχει βρεθεί ότι κληρονομούνται αποκλειστικά από το ένα φύλο.

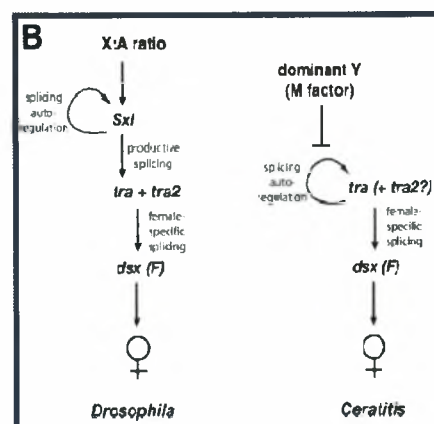
Τρίτον, εκτός από το γεγονός ότι είναι συχνά κατά ένα μεγάλο εύρος χωρίς "παραδοσιακά" γονίδια, όπως είναι ισοδύναμα αλληλόμορφα γονιδίων συνδεδεμένα στο X, τα Y χρωμοσώματα συχνά κουβαλούν γονίδια τα οποία είναι κρίσιμα για λειτουργίες όπως είναι ο φυλετικός καθορισμός ή/και η γονιμότητα (Lai J.S., 2002).

1.2.d Συστήματα Φυλοδιαχωρισμού

Στα περισσότερα έντομα, το φύλο καθορίζεται από ένα αρχικό σήμα, το οποίο όταν μεταβιβαστεί διαμέσου του μονοπατιού του φυλοδιαχωρισμού οδηγεί στη ρύθμιση των γονιδίων που απαιτούνται για την δημιουργία μορφολογικών, φυσιολογικών και συμπεριφερολογικών φαινοτύπων, ειδικών και για τα δυο φύλα. Το μονοπάτι του φυλοδιαχωρισμού στη *Drosophila melanogaster* είναι το καλύτερα μελετημένο και παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη πολυπλοκότητα ως προς τα υπόλοιπα Δίπτερα έντομα. Το πρωταρχικό γενετικό σήμα εξασφαλίζεται από την αναλογία των αυτοσωμικών με τα Χ χρωμοσώματα και καθορίζει μια κατάσταση on/off από το προϊόν Sex-lethal του γονιδίου *Sxl*. Για την ανάπτυξη θηλυκών ατόμων, όπου η απαιτούμενη αναλογία των X/A είναι 2:2, παράγεται η ενεργή πρωτεΐνη SXL και η παραγωγή της διατηρείται διαμέσου μιας αυτορυθμιζόμενης θηλιάς κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του θηλυκού εμβρύου. Για τα αρσενικά άτομα απαιτείται μια αναλογία των X/A ίση με 1:2 και δεν παρατηρείται παραγωγή της ενεργής πρωτεΐνης SXL, επομένως το σύστημα της αυτορυθμιζόμενης θηλιάς δεν μπορεί να σταθεροποιηθεί.

Το γονίδιο *Sxl* ρυθμίζει όχι μόνο το ίδιο του το μάτισμα αλλά και την κατεύθυνση του μονοπατιού του γονιδίου του *transformer* (*tra*) (Boggs *et al.*, 1987 και Inoue *et al.*, 1990). Το γονίδιο αυτό αντιγράφεται και στα δύο φύλα, αλλά το μετάγραφο του υποβάλλεται σε φύλο-ειδικό μάτισμα και κωδικοποιεί μια λειτουργική πρωτεΐνη TRA μόνο στα θηλυκά άτομα. Η πρωτεΐνη αυτή σχηματίζει σύμπλοκο με την πρωτεΐνη TRA2, η οποία κωδικοποιείται από το γονίδιο *transformer 2* (*tra2*) και στα δυο φύλα (Amrein *et al.*, 1988). Το σύμπλοκο TRA-TRA2 συμβάλλει θετικά στο ειδικό μάτισμα στα θηλυκά άτομα στο τελευταίο

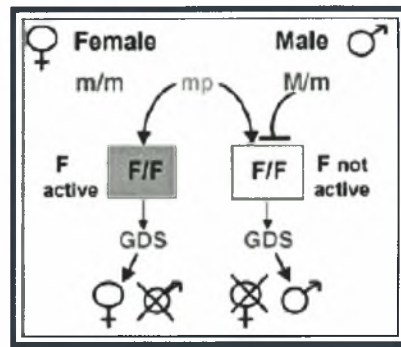
γονίδιο της αλυσίδας, το *doublesex* (*dsx*), αναγνωρίζοντας όλες τις σειρές επαναλήψεων των δεκατριών νουκλεοτιδίων, γνωστές και ως εξώνιο ESE (exonic splicing enhancer) καθώς και ένα μονό στοιχείο πλούσιο σε πουρίνες, το PRE, που εντοπίζεται στο εξώνιο 4. Το TRA διευκολύνει την καλύπτρα του TRA2 σε αυτές τις αλληλουχίες και το σύμπλοκο στρατολογεί άλλες RS πρωτεΐνες στην παρακείμενη περιοχή -3' του ματίσματος ούτως ώστε να επιτρέψει την συνοχή του εξωνίου 4 στα θηλυκά άτομα. Λόγο αυτού του σήματος, το μετάγραφο (mRNA) του γονιδίου *dsx*, που αποτελείται από τα εξώνια 1-4, παράγει μια ειδική θηλυκή ισομορφή της πρωτεΐνης DSX (Hoshijima *et al.*, 1991). Στα αρσενικά άτομα, η απουσία της πρωτεΐνης TRA έχει ως αποτέλεσμα την παράλειψη του ματίσματος του μεταγράφου του *dsx* και την υπερπήδηση του εξωνίου 4. Επομένως, το αρσενικό mRNA του *dsx*, αποτελούμενο από τα εξώνια 1-3 και 5-6, παράγει μια ειδική αρσενική ισομορφή της πρωτεΐνης DSX. Και οι δυο αυτές ισομορφές της DSX συνιστούν παράγοντες μεταγραφής που ρυθμίζουν την λειτουργία και την κατεύθυνση των γονιδίων, κληρονομώντας τον τρόπο έκφρασης των γονιδίων που απαιτούνται για τη δημιουργία του αντίθετου φύλου (διάγραμμα 1).



Διάγραμμα 1: "Αλυσίδα αντιδράσεων του συστήματος φυλοδιαχωρισμού στα είδη *Drosophila melanogaster* και *Ceratitidis capitata*"

Συγκριτικές μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί για το μονοπάτι του φυλετικού διαχωρισμού μεταξύ της *Drosophila melanogaster* και μη συγγενικών ειδών της (μη δροσοφιλικά έντομα), στην προσπάθεια κατανόησης της εξέλιξης του μονοπατιού. Σύμφωνα με το μοντέλο του Wilkins (Wilkins, 1995), το καλύτερα συντηρημένο στοιχείο του μονοπατιού είναι αυτό του τελευταίου γονιδίου του καταρράκτη, το *dsx*. Τα μετάγραφα του *dsx* υφίστανται εναλλακτικό μάτισμα στα αρσενικά και θηλυκά σε πολλά είδη Δίπτερον, συμπεριλαμβανομένων και των *Ceratitis capitata* (Saccone et al., 2000) και *Bactrocera oleae* (Lagos et al., 2005). Αντιθέτως, η εμπλοκή του *Sxl* φαίνεται να περιορίζεται στο γένος της *Drosophila*. Στα μη δροσοφιλικά έντομα, το *Sxl* είναι κατανομημένο ισόποσα και στα δύο φύλα (Meise et al., 1998, Saccone et al., 1998, Lagos et al., 2005). Το γονίδιο *tra*, το δεύτερο γονίδιο του καταρράκτη, έχει χαρακτηριστεί πολύ καλά στο είδος *Ceratitis capitata* (Pane et al., 2002, 2005). Τα συστήματα του Φυλετικού Διαχωρισμού στα Δίπτερα φανερώνουν μια ποικιλία από μηχανισμούς, οι οποίοι έχουν βρεθεί να διαφέρουν ακόμη και στις γενιές ίδιων στελεχών (Shearman, 2002). Το μοντέλο της στοιχειώδους κατάστασης στον φυλοδιαχωρισμό των εντόμων ίσως θα μπορούσε να περιγραφεί με τέσσερα στοιχεία- κλειδιά: το πρωταρχικό σήμα (M), τα μητρικά προϊόντα (mp), το γονίδιο κλειδί (F) και τον γενετικά διπλό διακόπτη (GDS). Το σύστημα αυτό περιγράφεται στην Εικόνα 11, όπου τα αρσενικά άτομα είναι ετερόζυγα για τον μοναδικό γενετικό τόπο M, που παίζει τον ρόλο φυλοκαθοριστή και φέρει ένα ζευγάρι ομόλογων φυλετικών χρωμοσωμάτων. Στα αρσενικά άτομα που φέρουν το M αλληλόμορφο του M γονιδίου (επικρατής αρσενικός καθοριστής), ο παράγοντας αρρενοποίησης M ρυθμίζει αρνητικά τη δράση του F, το οποίο στη

συνέχεια ενεργοποιεί το GDS στην αρσενική κατάσταση. Στα θηλυκά άτομα, εξαιτίας της απουσίας του M αλληλόμορφου, το F ρυθμίζεται θετικά από τα μητρικά προϊόντα mp, τα οποία είναι ικανά να ενεργοποιήσουν το GDS στην θηλυκή κατάσταση. Στο συγκεκριμένο μοντέλο το γονίδιο F είναι ενεργό στα θηλυκά άτομα και ανενεργό στα αρσενικά (Nöthiger and Steinemann Zwicky, 1985 and Dubendorfer, Hilfiker-Kleiner and Nöthiger, 1992).



Εικόνα 11: "Το μοντέλο φυλοδιαχωρισμού στα Δίπτερα"

Μια μεταλλαγή σε οποιοδήποτε από αυτά τα τέσσερα στοιχεία μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή διαφορετικών μηχανισμών φυλοδιαχωρισμού.

Πέραν του ενδιαφέροντος για συγκριτική αναπτυξιακή ανάλυση, οι μελέτες για τον φυλοδιαχωρισμό των γονιδίων στα έντομα οικονομικής σημασίας, όπως το *Bactrocera oleae*, είναι ενδεχομένως χρήσιμα και για έλεγχο των εντόμων. Συνεπώς, ένα διαγονιδιακό στέλεχος, που θα επέτρεπε την παραγωγή και απελευθέρωση μετά από στείρωση των αρσενικών μόνο ατόμων, θα μπορούσε να είναι πιο πολύτιμο για την προσπάθεια βελτίωσης της μεθόδου SIT (Hendrichs et al., 1995).

1.2.e Δομή του Υ χρωμοσώματος

Ένα πολύ μικρό μέρος του Υ χρωμοσώματος αποτελείται από ενεργά γονίδια, όπως είναι γονίδια που

κωδικοποιούν rRNA, οι παράγοντες γονιμότητας καθώς και ο παράγοντας αρρενοποίησης. Παρόλα αυτά το μεγαλύτερο μέρος του συνίσταται από ετεροχρωματικές περιοχές, που συνθέτονται από πολλαπλά αντίγραφα μεταθετών στοιχείων.

Τα τρασποζόνια (TE) είναι κινητά γενετικά στοιχεία που καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο ποσοστό των ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων (Finnegan, 1989). Τα TE μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες σύμφωνα με τον μηχανισμό της μετάθεσης. Τα DNA τρασποζόνια κινούνται διαμέσου ενός μηχανισμού αποκοπής- επικόλλησης δίχως να περιλαμβάνει αντιγραφή του DNA παρόλο που τα ρετροτρασποζόνια μετατοπίζονται χάρη στην αντίστροφη μεταγραφή ενός RNA (Berg and Howe 1989 και McDonald 1993). Τα ρετροτρασποζόνια διαιρούνται περαιτέρω σε LTR και μη- LTR, με ένα μακρύ άκρο επαναλήψεων (Finnegan 1989). Τα στοιχεία αυτά μοιάζουν να είναι εγωιστικό DNA, τα οποία παραμένουν σταθερά στο γονιδίωμα εξαιτίας της ικανότητάς τους να υφίστανται αντιγραφή των μεταθέσεων τους (Charlesworth and Langley 1989).

Η ετεροχρωματίνη είναι μια περιοχή έλλειψης ή καταστολής ανασυνδυασμού (Baker 1958). Τα TE έχουν βρεθεί να είναι συσσωρευμένα στο μη ανασυνδυασμένο ετεροχρωματικό Y χρωμόσωμα στη *D. melanogaster* και *D. simulans* (Junakovic et al. 1998), όπως επίσης και σε άλλες ετεροχρωματικές περιοχές του γονιδιώματός της (Charlesworth, Jarne, and Assimacopoulos 1994 και Pimpinelli et al. 1995). Η ετεροχρωματίνη συνιστά μια δεξαμενή ανενεργών γονιδίων συγκρινόμενη με τις ευχρωματικές περιοχές (Hilliker, Appels, and Schalet 1980 και Cold Spring Harbor Laboratory 2000). Για παράδειγμα, στο Y χρωμόσωμα της *D. melanogaster*, έχουν ταυτοποιηθεί λιγότερα από είκοσι γονίδια (Carvalho,

Lazzaro, and Clark 2000 and Carvalho et al. 2001). Συνεπώς, τα TE θα μπορούσαν να συσσωρευτούν στο Y χρωμόσωμα ή σε άλλες ετεροχρωματικές περιοχές λόγω του ότι υπάρχουν λιγότερα γονίδια και επομένως τα ένθετα στοιχεία είναι λιγότερο πιθανόν να έχουν επιβλαβείς επιδράσεις σε αυτά.

Έχουν ταυτοποιηθεί μοναδικές επαναλαμβανόμενες DNA αλληλουχίες στο Y χρωμόσωμα, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι δεν μπορούν να εντοπίζονται μοναδικά αντίγραφα επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και οπουδήποτε αλλού μέσα στο γονιδίωμα. Οι Y- ειδικές αλληλουχίες είναι γενικά μικρού μεγέθους (περίπου 200 bp) και εμφανίζουν υψηλό αριθμό αντιγράφων (πάνω από 1000 αντίγραφα). Τα νέο-Y χρωμοσώματα δείχνουν μια αυξημένη πληθώρα σε ετεροχρωματίνη και επαναλαμβανόμενο DNA (Steinemann 1982, Steinemann and Steinemann 1992, 2001). Μπορούν λοιπόν αυτά τα δύο στοιχεία να αποτελέσουν δείκτη ανίχνευσης Y- ειδικών αλληλουχιών για την επίτευξη του διαχωρισμού των αρσενικών και θηλυκών ατόμων στα πρώτα τους στάδια ανάπτυξης.

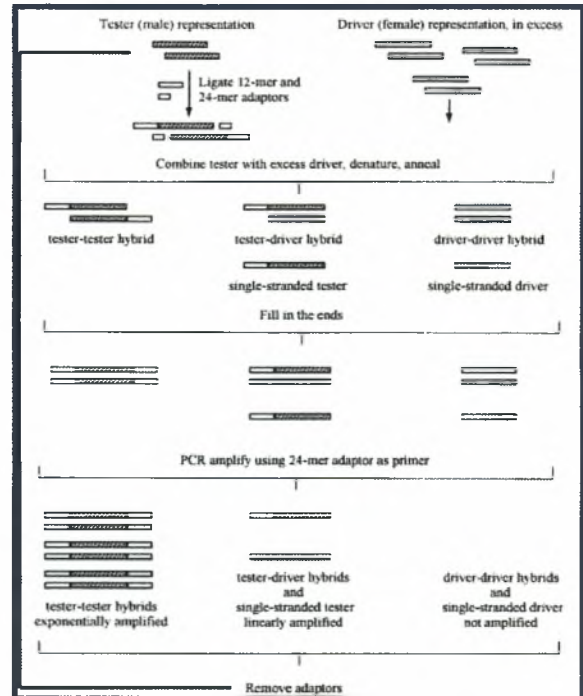
1.3 Ανάλυση Αντιπροσωπευτικής Πέψης (Representational Digestion Analysis, RDA)

Χάρη στη μέθοδο Ανάλυσης Αντιπροσωπευτικής Πέψης (RDA) (Lisistyn et al., 1993) καθίσταται ικανός ο διαχωρισμός και η απομόνωση διαφορών μεταξύ ατόμων με αρκετά όμοιο γονιδιωματικό DNA. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην υβριδοποίηση γονιδιωματικού DNA (Straus and Ausubel, 1990) (διάγραμμα 2).

Στη μέθοδο RDA, χρησιμοποιείται το ένα δείγμα γονιδιωματικού DNA ως "tester", αυτό για το οποίο ενδιαφερόμαστε να απομονώσουμε τις διαφορές και το άλλο

δείγμα παίζει τον ρόλο του "driver". Και τα δύο αυτά δείγματα γονιδιωματικού DNA υφίστανται πέψη με το ίδιο ένζυμο περιορισμού. Εν συνεχεία, πραγματοποιείται σύνδεση μικρών ολιγονουκλεοτιδικών προσαρμογέων σε θραύσματα γονιδιωματικού υλικού. Κατόπιν, τα δείγματα υφίστανται ενίσχυση. Δεδομένου ότι στην PCR ενισχύονται μικρές αλληλουχίες DNA, οι αντιπροσωπεύσεις προβλέπονται να περιέχουν αλληλουχίες DNA μεγέθους 150 με 1.500 bp (Lisistyn, 1999). Το πρώτο ζευγάρι προσαρμογέων αφαιρείται τόσο από τον "tester" όσο και από τον "driver" και ένα καινούριο ζευγάρι προσαρμογέων συνδέεται στον "tester" αλλά όχι στον "driver". Το tester DNA μετουσιώνεται και έπειτα υφίστανται υβριδοποίηση με μια υπερβολικά μεγάλη ποσότητα ενός μονόκλωνου driver DNA. Υστερα από την διαδικασία της υβριδοποίησης, εκτελείται ενίσχυση με PCR. Λόγω του ότι μόνο τα υβρίδια tester-tester θα έχουν προσαρμογείς και στους δύο κλώνους της μοριακής αλυσίδας, μόνο αυτά θα ενισχυθούν εκθετικά κατά την διάρκεια της PCR. Μετά από τον κάθε γύρο Υβριδοποίησης με Ενίσχυση, οι μη-υβριδοποιημένες μονόκλωνες αλυσίδες χάνονται από την δεξαμενή και οι προσαρμογείς αφαιρούνται από την δεξαμενή DNA χάρη στο αρχικό περιοριστικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία της αντιπροσώπευσης. Στον δεύτερο κύκλο της αντιπροσώπευσης συνδέονται νέοι προσαρμογείς στην προηγούμενη δημιουργηθείς δεξαμενή του DNA, η οποία στο επόμενο στάδιο μετουσιώνεται και υβριδοποιείται με έναν καινούριο driver, πλούσιο σε μετουσιωμένο DNA (Lisistyn et al., 1993). Με αυτόν τον τρόπο, δύο σημαντικοί παράγοντες στην μέθοδο RDA αυξάνουν την πιθανότητα ανάκτησης tester- ειδικών αλληλουχιών ή αφαίρεση των κοινών αλληλουχιών τόσο στον tester όσο και στον driver μέσω επαναλαμβανόμενων γύρων

από υβριδοποίηση του DNA, συνδυαζόμενου με τον εμπλουτισμό tester-ειδικών αλληλουχιών μέσα στην δεξαμενή του DNA διαμέσου PCR (Lisistyn et al., 1999).



Διάγραμμα 2: "Πρωτόκολλο Αντιπροσώπευσης"

Η παραπάνω μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία σε μια ποικιλία από εφαρμογές. Έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση Υ χρωμοσωμικών- ειδικών DNA αλληλουχιών στο διετές (dioecious) φυτό *Silene latifolia*, οι οποίες είναι χρήσιμες ως προς τη λειτουργία τους ως δείκτες Υ-ειδικές αλληλουχίες DNA για τον εντοπισμό αρσενικών- καθορισμένων γονιδίων στο Υ-χρωμόσωμα (Donnison et al., 1996). Η RDA έχει, επίσης, χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση δυο φύλο- ειδικών cDNAs από τον εγκέφαλο εμβρύων ποντικών. Μια από αυτές τις απομονωθείσες αλληλουχίες βρέθηκε να είναι αρσενική- ειδική (γονίδιο *Smscy*) και η άλλη εκφράζεται στα θηλυκά άτομα (γονίδιο *Xist*) (Eriksson et al., 1999). Οι Michiels et al. (1998) τροποποίησαν το πρωτόκολλο RDA ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικό υλικό μικρές

ποσότητες ιστού ή κυττάρων από καλλιέργεια (τόσο μικρή ποσότητα όσο είναι 50 διπλοειδή κύτταρα), καθιστώντας έτσι δυνατή την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα ιστών όπως είναι οι ιστοί για βιοψίες, όπου το δείγμα μπορεί να μην περιλαμβάνει μόνο έναν κυτταρικό τύπο και όπου οι τεχνικές μικροανατομής είναι ικανές να απομονώσουν μόνο μικρά δείγματα από καρκινικά κύτταρα.

Σκοπός..

Η προνύμφη του *Bactrocera oleae* αναπτύσσεται μέσα στους καρπούς της ελιάς, καταστρέφοντας τους και οδηγώντας σε σημαντική οικονομική ζημιά στις καλλιέργειες. Ωστόσο έχουν πραγματοποιηθεί λίγες γενετικές και μοριακές μελέτες, οι οποίες κυρίως επικεντρώνονται στη μελέτη ενζύμων (Brogna et al., 2001, Mazi et al., 1998 και Zougos and Loukas, 1989) και στην ανάλυση μιτωτικών και πολυταινικών χρωμοσωμάτων (Mavragani-Tsipidou et al., 1992).



Εικόνα 12: "Θηλυκό ενήλικο άτομο σε καρπό της ελιάς"

Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη δημιουργία ενός συστήματος μοριακής ανίχνευσης του φύλου του είδους *Bactrocera oleae*. Έγινε προσπάθεια απομόνωσης Υ-ειδικών αλληλουχιών με στόχο να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες ταυτοποίησης του φύλου στο δάκο. Τέτοιοι δείκτες είναι χρήσιμοι για τη βελτίωση της τεχνικής στείρωσης των εντόμων (SIT) ώστε να επιτευχθεί η απελευθέρωση μόνο των αρσενικών ατόμων στο περιβάλλον και η μη καταστροφή του καρπού από τα θηλυκά (εικόνα 12).

Για τον σκοπό αυτό κατασκευάστηκαν Βιβλιοθήκες Ανάλυσης Αντιπροσωπευτικής Πέψης (Representational Digestion Analysis,

RDA) και ενισχύθηκαν μέσω της τεχνικής της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR). Στη συνέχεια, ανακτήθηκε το τελικό προϊόν DP3, κλωνοποιήθηκε και αναλύθηκε με τη μέθοδο κατά Southern με στόχο την απομόνωση και επιβεβαίωση των ευρημάτων ως Υ-ειδικές αλληλουχίες.

Έγινε σύγκριση των αλληλουχιών που απομονώθηκαν με ήδη γνωστές αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων, ώστε με τις παρατηρούμενες ομολογίες να πιθανολογηθεί η λειτουργία των ευρημάτων.

Υλικά και Μέθοδοι

Υλικά και μέθοδοι

2.1 Δείγματα του δάκου *Bactrocera oleae*

Χρησιμοποιήθηκε γονιδιωματικό DNA αρσενικών και θηλυκών ατόμων από στελέχη του *Bactrocera oleae* που στάλθηκαν από τη Βιέννη (εταιρεία AIAE). Πιο συγκεκριμένα:

- Το γένος "Δημόκριτος", ένα πολύ παλιό γένος ελληνικής προελεύσεως, που είχε δημιουργηθεί στο εργαστήριο.
- Υβριδικά στελέχη "Ισραήλ", η γενεαλογία αυτή των δάκων είχε δημιουργηθεί το 2007 στο εργαστήριο από αρσενικά άτομα αγρίου τύπου από το Ισραήλ και από θηλυκά έντομα του γένους "Δημόκριτος".

Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν άτομα αγρίου τύπου συλλεχθέντα:

- από την Ιορδανία το 2002, και
- από το Λίβανο, κοντά στην περιοχή Tiro (Νοέμβρης 2002), τα οποία στάλθηκαν στο εργαστήριο το 2003.

2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από *Bactrocera oleae* με τη χρήση φαινόλης: "Μέθοδος του Baruffi" (Baruffi et al., 1995)

Extraction Buffer

100mM NaCl₂

200mM Sucrose

50mM EDTA

0.5% SDS

100mM Tris HCl pH 9.1

Πορεία

1. Διαλογή δέκα αρσενικών ατόμων και δέκα θηλυκών με τη χρήση μικροσκοπίου

και αποκοπή του τμήματος του κεφαλιού.

2. Προσθήκη 2μL πρωτεϊνικής κινάσης K στο κάθε erpendorf.

3. Προσθήκη 200μL από το Extraction Buffer.

4. Ομογενοποίηση των εντόμων με πλαστικό έμβολο και ξέπλυμα αυτού με άλλα 200μL Extraction Buffer. Το ομογενοποίημα επώαζεται στους 65°C για 30 λεπτά.

5. Ενώ οι σωλήνες είναι ακόμη ζεστοί, προστίθενται 56μL KAc 8M (Potassium Acetate) στο καθένα, πραγματοποιείται ανάδευση και τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για 30 λεπτά.

6. Φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 15 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά του υπερκειμένου σε καινούριους σωλήνες.

7. Φυγοκέντρηση εκ νέου στις 14.000rpm για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και μεταφορά του υπερκειμένου σε καινούριους σωλήνες.

8. Προσθήκη 5μL RNase A (10mg/ml) και επώαση των διαλυμάτων στους 37°C για 30 λεπτά.

9. Προσθήκη 400μL διαλύματος φαινόλης: ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και ανάδευση.

10. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14.000rpm και μεταφορά του υπερκειμένου σε καινούριο σωλήνα.

11. Προσθήκη στο υπερκείμενο 400μL διαλύματος χλωροφορμίου: ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1), πολύ καλή ανάδευση και εκ νέου φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14.000rpm.

12. Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα, προσθήκη 200μL αμμωνιακού άλατος 7.5M, ανακίνηση του μείγματος και προσθήκη 800μL κρύας απόλυτης αιθανόλης. Ανάδευση εκ νέου.

13. Επώαση των δειγμάτων για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά.

14. Ξέπλυμα του ιζήματος με αιθανόλη περιεκτικότητας 70%, φυγοκέντρηση για 10 λεπτά, αφαίρεση του υπερκείμενου και αφήνεται να στεγνώσει.

15. Αναδιάλυση του ιζήματος με 20μl TE (10mM Tris- HCl, pH 8.0 και 0.1mM EDTA).

2.3 Απομόνωση RNA από θηλυκά άτομα *Ceratitidis capitata* (Trizol, Invitrogen)

Πορεία

1. Προσθήκη 200μl διαλύματος Trizol σε πέντε θηλυκά άτομα.
2. Ομογενοποίηση των εντόμων και ξέπλυμα των εμβόλων με άλλα 200μl Trizol. Επώαση για 3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 100μl διαλύματος χλωροφορμίου. Ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα και επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
5. Μεταφορά του υπερκείμενου του διαλύματος σε καινούριο erpendorf, όπου γίνεται προσθήκη 200μl ισοπροπανόλης.
6. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 10λεπτά. Φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 10λεπτά στους 4°C.
7. Προσθήκη 500μl αιθανόλης περιεκτικότητας 75%.
8. Φυγοκέντρηση 8.000rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
9. Αφαίρεση του υπερκείμενου, στέγνωμα και αναδιάλυση σε 20μl TE (στο κάθε δείγμα).

Η ποσοτικοποίηση του DNA και RNA υπολογίστηκε με χρήση του Nanodrop ND-1000 σπεκτρο- φωτόμετρου (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA).

2.4 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

Αρχικά, έγιναν δοκιμές με διάφορα περιοριστικά ένζυμα ώστε να διαπιστωθεί ποιο ένζυμο κόβει καλύτερα την αλληλουχία μας.

- a. MspI (από την εταιρεία Roche, χρησιμοποιήθηκε 10X L Buffer)
- b. BglII (από την εταιρεία Invitrogen, χρησιμοποιήθηκε 10X React 3 Buffer)
- c. BamHI (από την εταιρεία BioLabs, χρησιμοποιήθηκε 10X NE Buffer BamHI)
- d. EcoRI (από την εταιρεία Invitrogen, χρησιμοποιήθηκε 10X React 3 Buffer)
- e. MseI (από την εταιρεία BioLabs, χρησιμοποιήθηκε 10X NE Buffer 4 και 100X BSA)
- f. DpnII (από την εταιρεία BioLabs, χρησιμοποιήθηκε 10X NE Buffer DpnII)
- g. HindIII (από την εταιρεία BioLabs, χρησιμοποιήθηκε 10X NE Buffer 2)

Πορεία

1. Ετοιμασία των αντιδράσεων με ποσότητες: 5.0 μl DNA, 1.0 μl Buffer 10X, 0.5 μl περιοριστικό ένζυμο και 3.5 μl H₂O.
2. Φυγοκέντρηση και επώαση τους στους 37°C όλο το βράδυ.

2.5 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Όλα τα πήκτωμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν περιεκτικότητας 1% ή 2% αγαρόζης (της εταιρείας erpendorf). Η ηλεκτροφόρηση έγινε στα 35-60V και ως buffer ηλεκτροφόρησης χρησιμοποιήθηκαν:

- a. TAE 1X, από TAE (50X)/L που περιείχε 242g Tris base, 57.1ml καθαρό οξικό οξύ και 100ml 0.5M EDTA (με pH 8.00).
- b. TBE 1X, από TBE (5X)/L που περιείχε 54g Tris base, 27.5g βορικό οξύ και 20ml 0.5M EDTA (με pH 8.00).

2.6 Κατασκευή βιβλιοθήκης "Ανάλυσης Αντιπροσωπευτικής Πέψης" (RDA, Representational Digestion Analysis) (Lisistyn et al., 1993)

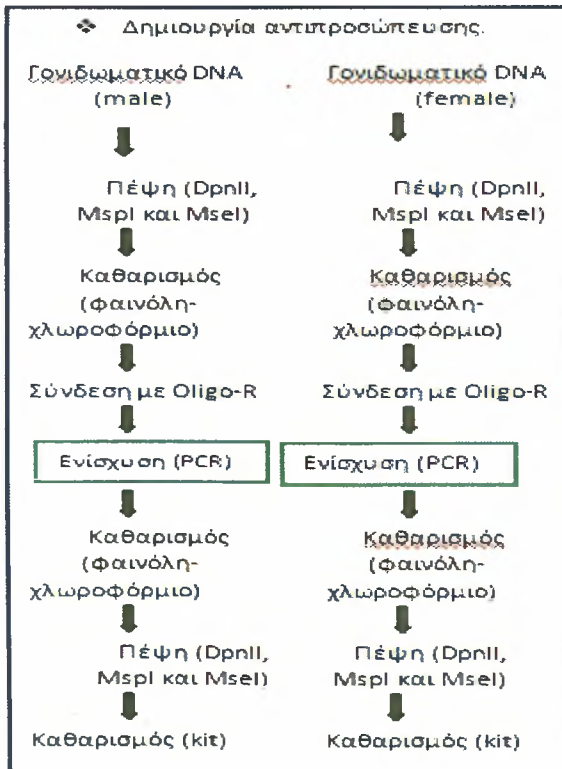
Χρήση προσαρμογών από την SIGMA, απομόνωση τους μέσω ηλεκτροφόρησης PAGE και αναδιάλυση σε TE 2 μg/μl.

Πορεία

1. Στους 37°C για 30 δευτερόλεπτα, ανάδευση και φυγοκέντρωση.
2. Διατήρηση στους -20°C.

2.6.1 Δημιουργία Αντιπροσωπευτικών Πέσεων

Για την δημιουργία των αντιπροσωπεύσεων ακολουθείται η πορεία που περιγράφεται στο διάγραμμα (3).



Διάγραμμα 3: "Δημιουργία αντιπροσώπευσης"

Αρχικά, γίνεται παρασκευή και πέψη των δειγμάτων από αρσενικά και θηλυκά άτομα του *B. oleae* με τα περιοριστικά ένζυμα DpnII,

MspI και MseI. Στη συνέχεια, ακολουθεί η αντίδραση σύνδεσης με τους προσαρμογείς oligo-R, η ενίσχυση του προϊόντος μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) και καθαρισμός και πέψη του ενισχυμένου προϊόντος για την απομάκρυνση των προσαρμογών.

Πορεία

1. Παρασκευή μίγματος DNA των δειγμάτων του Ισραήλ και της Βιέννης, συνολικής ποσότητας 20μg αρσενικών και θηλυκών ατόμων αντίστοιχα. Ο τελικός όγκος του κάθε μίγματος ήταν 60μl.

2. Δημιουργία τριών κλασμάτων του παραπάνω μίγματος και πέψη αυτών με την χρήση των περιοριστικών ενζύμων DpnII, MspI και MseI.

a. Το μίγμα της πέψης περιείχε: 20μl DNA, 5μl περιοριστικό ένζυμο, 10μl Buffer (10X), 10μl RNase και νερό μέχρι τελικό όγκο 100μl. Επώαση στους 37°C για όλο το βράδυ.

b. Αποθήκευση 10μl της πέψης στους -20°C, χρήση 10μl για την ηλεκτροφόρηση και προσθήκη 320μl TE στα εναπομείναντα 80μl. Εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο, ακολουθώντας το ίδιο πρωτόκολλο με την απομόνωση γενωμικού DNA (παράγραφος 2.2). Αναδιάλυση των δειγμάτων με 20μl TE.

3. Αντίδραση σύνδεσης με προσαρμογείς-R στο γονιδιωματικό DNA.

a. Παρασκευή του μίγματος της σύνδεσης: 18μl DNA, 7μl ligase Buffer (5X), 4μl R#24 (2μg/μl), 2μl R#12 (2μg/μl) και 1μl ddH₂O.

b. Τοποθέτηση των δειγμάτων στο eppendorf cycler:

- i. Στους 50°C για 5 λεπτά (το καπάκι της συσκευής ήταν στους 115°C).
- ii. Σε διάρκεια 1 ώρας πραγματοποιήθηκε βαθμιδωτή

μεταβολή της θερμοκρασίας στους 5⁰C με ρυθμό 0.6⁰C/min, όπου παρέμειναν τα δείγματα για 5 λεπτά.

- iii. Προσθήκη 3μl λιγάσης (500 U/μl) και επώαση στους 14⁰C όλο το βράδυ.

4. PCR Δοκιμής: Στο σημείο αυτό πραγματοποιήθηκε μια PCR δοκιμής για να διαπιστωθεί ποια θα ήταν η καταλληλότερη συγκέντρωση DNA που θα έδινε το υψηλότερο δυνατόν ποσοστό ενίσχυσης του γενώματος.

Πορεία

- a. Προσθήκη 140μl ddH₂O (6 ng/μl). Παρασκευή μίγματος (1) που περιείχε 36ng DNA, 3.6μl Buffer 10X, 1.08μl MgCl₂ 50mM, 0.72μl dNTPs και 22.6μl ddH₂O.
- b. Λήψη 6μl από το μίγμα (1) και παρασκευή του μίγματος (2), το οποίο περιείχε με αυτόν τον τρόπο 0.2ng/μl DNA. Ομοίως, για το μίγμα (3), μεταφορά 6μl από το μίγμα (2). Τελική ετοιμασία επτά μιγμάτων, τα οποία περιείχαν το πρώτο μίγμα 1ng/μl DNA, το δεύτερο 0.2ng/μl, το τρίτο 0.04ng/μl, το τέταρτο 8pg/μl, το πέμπτο 1.6pg/μl, το έκτο 0.32pg/μl και το έβδομο 0.064pg/μl. Δηλαδή, κάθε φορά υπήρχε ένας παράγοντας αραιώσης 1:5.
- c. Προσθήκη στο κάθε δείγμα 1μl primer R#24. Τοποθέτηση των δειγμάτων για 3λεπτά στους 72⁰C, προσθήκη 1μl Taq DNA πολυμεράσης 5U/μl (της εταιρείας Invitrogen) και επώαση για 5 λεπτά στους 72⁰C.
- d. 20 κύκλοι αντίδρασης σε συνθήκες 1 λεπτού στους 95⁰C και 3 λεπτών στους 72⁰C.
5. PCR για τη δημιουργία αντιπροσώπευσης: Επιλέχθηκε η καλύτερη αραιώση από την PCR δοκιμής τόσο για τα αρσενικά όσο και για τα θηλυκά άτομα και παρασκευάστηκαν τέσσερις PCR των 200μl για το κάθε ένα.

			DNA (σε pg)	Ποσότητα σε μl
Μίγματα των 100μl	DpnII	Male	1.600	27
		Female	800	14
	MspI	Male	800	14
		Female	800	14
	MseI	Male	800	14
		Female	800	14

Πίνακας 2: " DNA αραιώση 1:100, (60 pg/μl)"

Στη συνέχεια, πραγματοποιείται παρασκευή δύο μιγμάτων PCR, όπου το πρώτο περιέχει 27μl DNA και το δεύτερο 14μl DNA και προσθήκη στο καθένα 100μl Buffer 10X, 30μl MgCl₂ 50mM, 20μl dNTPs, 30μl primer R#24 και ddH₂O μέχρι τελικό όγκο 800μl. Προστίθενται 6μl Taq DNA πολυμεράσης με τον ίδιο τρόπο που πραγματοποιήθηκε η PCR δοκιμής (2.5.1.D).

6. Καθαρισμός της PCR: Η παραπάνω PCR εκχυλίζεται μέσω του πρωτοκόλλου "Φαινόλη: Χλωροφόρμιο: Ισοάμυλο-αλκοόλη" με αναλογία 25:24:1. Προστίθενται 200μl από το μίγμα αυτό στο κάθε δείγμα, τα οποία κατακρημνίζονται με την προσθήκη 100μl άλατος αμμωνίου 7.5M και 800μl απόλυτης Αιθανόλης (cold). Τοποθετούνται τα δείγματα για 15λεπτά στους -80⁰C και εν συνεχεία, γίνεται φυγοκέντρηση στις 14.000rpm για 10 λεπτά. Το ίζημα ξεπλένεται με 500μl Αιθανόλης περιεκτικότητας 70%, φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 14.000rpm, αφαιρείται το υπερκείμενο, αφήνεται να στεγνώσει και αναδιαλύεται σε 10μl TE.

7. Πέψη της αντιπροσώπευσης για την απομάκρυνση των προσαρμογέων- R: Για τη πέψη χρησιμοποιούνται 48μl DNA, 10μl Buffer 10X, 5μl περιοριστικού ενζύμου (για το MseI προστέθηκε επίσης 1μl BSA 100X) και ddH₂O ώστε ο τελικός όγκος να είναι 37μl. Τα δείγματα επωάζονται στους 37⁰C

όλο το βράδυ. Ακολουθεί καθαρισμός των δειγμάτων πέψης εφαρμόζοντας PCR micro Kit (Invitrogen).

2.6.II DP1: Differential product I

Λαμβάνεται το προϊόν της πέψης από την παραπάνω πορεία και χρησιμοποιείται για τη δημιουργία του πρώτου προϊόντος της αντιπροσώπευσης.

Πορεία

1. Σύνδεση με προσαρμογείς- J στα αρσενικά άτομα και θηλυκό γονιδιωματικό DNA: Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με αυτήν της σύνδεσης με τους προσαρμογείς-R (παράγραφος 2.5.1.3), με τη διαφορά ότι προστίθενται οι προσαρμογείς J#24 και J#12.

2. PCR Δοκιμής: Προστίθενται 140μl ddH₂O (6 ng/μl) στα δείγματα. Κατόπιν, παρασκευάζεται μίγμα που περιέχει 0.5μl DNA (που προέρχεται από την προηγούμενη αραίωση), 3μl Buffer 10X, 0.9μl MgCl₂ 50mM, 0.6μl dNTPs, 1μl primers (R#24; J#24) και 23μl ddH₂O. Κατασκευάζονται άλλες δυο PCR των 200μl για τα θηλυκά άτομα με primers R#24. Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την παράγραφο (2.5.1.4).

3. Απομόνωση DNA (**DP1 1:100**):

Αναμειγνύονται 7μg DNA από τα θηλυκά άτομα (από Αντιπροσώπευση) και 70ng DNA από τα αρσενικά άτομα συνδεδεμένα με oligo-J και προστίθεται TE ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 200μl.

Η απομόνωση του DNA πραγματοποιείται μέσω του πρωτοκόλλου της "Φαινόλη: Χλωροφόρμιο: Ισοάμυλο- αλκοόλη" και Αιθανόλης.

4. Υβριδοποίηση αρσενικών ατόμων με oligo- J με θηλυκά από Αντιπροσώπευση: Πραγματοποιείται αναδιάλυση των

δειγμάτων σε 4μl HEPES 30mM, pH8.0, 3mM EDTA, τοποθέτησή τους σε σωλήνες για PCR και κάλυψη τους με mineral oil. Στη συνέχεια, θερμαίνονται τα δείγματα στους 98°C για 6 λεπτά, προστίθεται 1μl NaCl 5M και επωάζονται στους 67°C για όλο το βράδυ.

5. Ενίσχυση της υβριδοποίησης: Στα δείγματα της υβριδοποίησης προστίθενται 8μl TE που περιέχουν 5μg/μl RNA (από medfly) και αραιώνονται σε 100μl TE.

Σε δύο σωλήνες των 200μl πραγματοποιείται PCR (για το καθένα) με 20μl DNA, 20μl Buffer 10X, 6μl MgCl₂ 50mM, 4μl dNTPs, 6μl primers J#24, 6μl Taq DNA πολυμεράση και 138μl ddH₂O. Ακολουθείται εκχύλιση με φαινόλη, κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και αναδιάλυση του DNA με 20μl TE.

Το προϊόν που ανακτήθηκε ονομάστηκε DP1.

6. Πέψη της Αντιπροσώπευσης για την απομάκρυνση προσαρμογέων-J:

Ακολουθείται πέψη των δειγμάτων, επώαση τους στους 37°C για 3 ώρες και εν συνεχεία, καθαρισμός εφαρμόζοντας PCR micro Kit (Invitrogen).

Στο τέλος της παραπάνω διαδικασίας λήφθηκε το πρώτο προϊόν, το οποίο ονομάστηκε DP1 και χρησιμοποιήθηκε για τη συνέχεια της δημιουργίας των αντιπροσωπευτικών πέψεων .

2.6.III DP2: Differential product II

Πορεία

1. Σύνδεση με προσαρμογείς- N στο DP1:

Ομοίως με την παράγραφο (2.5.1.3), όμως προστίθενται οι προσαρμογείς N#24 και N#12.

2. PCR Δοκιμής: Ομοίως με την παράγραφο

(2.5.I.4), προσθέτοντας όμως 1μl από τους primers J#24 και N#24.

3. Απομόνωση DNA (DP2 1:800):

Αναμειγνύονται 10μg DNA από τα θηλυκά άτομα και 12.5ng DNA από τα DP1 συνδεδεμένα με oligo- N και προστίθεται TE ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 200μl. Η εκχύλιση του DNA πραγματοποιείται χάρη στο πρωτόκολλο "Φαινόλη: Χλωροφόρμιο: Ισοάμυλο-αλκοόλη" και Αιθανόλης.

4. Υβριδοποίηση DP1 με oligo- N με θηλυκά από Αντιπροσώπευση: Ομοίως με την παράγραφο (2.5.II.4).

5. Ενίσχυση της υβριδοποίησης: Ομοίως με την παράγραφο (2.5.II.5), με τη διαφορά ότι γίνεται προσθήκη 6μl primers N#24.

Το προϊόν που ανακτήθηκε ονομάστηκε DP2.

6. Πέψη της Αντιπροσώπευσης για την απομάκρυνση των προσαρμογέων-J: Ακολούθησε πέψη των δειγμάτων, τα οποία αφέθηκαν στους 37°C για 3 ώρες και εν συνεχεία, έγινε καθαρισμός εφαρμόζοντας PCR micro Kit (Invitrogen).

2.6.IV DP3: Differential product III

Το προϊόν DP2 χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τη συνέχεια του προτύπου αντιπροσώπευσης.

Πορεία

1. Σύνδεση με προσαρμογείς- J στο DP2:

Ομοίως με την παράγραφο (2.5.I.3), όμως προστίθενται οι προσαρμογείς J#24 και J#12.

2. PCR Δοκιμής: Στους σωλήνες, αρχικά, προστέθηκαν 140μl ddH₂O (6 ng/μl). Κατόπιν, παρασκευάζεται μίγμα με 0.5μl DNA (αραιωμένο 1:100), 3μl Buffer 10X, 0.9μl MgCl₂ 50mM, 0.6μl dNTPs, 1μl primers (J#24;

N#24) και 23μl ddH₂O. Για την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ακολουθείται η ίδια διαδικασία με την παράγραφο (2.5.I.4).

3. Απομόνωση DNA (DP3 1:400.000):

Αναμειγνύονται 20μg DNA από τα θηλυκά άτομα και ≥50pg DNA από DP2 συνδεδεμένα με oligo- J και προστίθεται TE ώστε ο τελικός όγκος να είναι 200μl. Για την απομόνωση του DNA εφαρμόζεται το πρωτόκολλο "Φαινόλη: Χλωροφόρμιο: Ισοάμυλο- αλκοόλη" και Αιθανόλη.

4. Υβριδοποίηση DP2 με oligo-J με θηλυκά από representation: Ίδια διαδικασία με την παράγραφο (2.5.II.4).

5. Ενίσχυση της υβριδοποίησης:

Στα δείγματα της υβριδοποίησης προστέθηκαν 8μl TE με 5μg/μl RNA (από medfly) και αραιώνονται σε 100μl TE.

Σε ένα σωλήνα των 200μl γίνεται PCR με 20μl DNA, 20μl Buffer 10X, 6μl MgCl, 4μl dNTPs, 6μl primer J#24, 6μl Taq DNA πολυμεράση και 138μl ddH₂O. Ακολουθείται εκχύλιση με φαινόλη, κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη και αναδιάλυση του DNA με 20μl TE.

Στο τέλος αυτής της παραπάνω διαδικασίας λήφθηκε το τρίτο προϊόν, το οποίο ονομάστηκε DP3.

2.7 Κλωνοποίηση

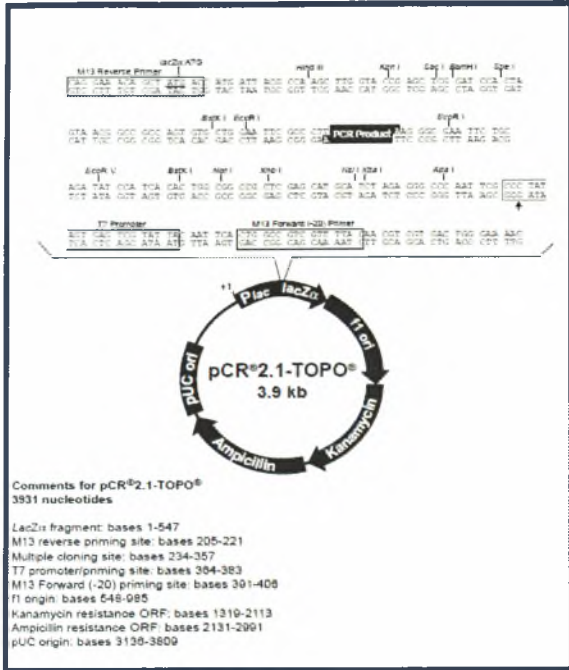
Πραγματοποιήθηκε εισαγωγή του προϊόντος της PCR σε φορέα pCR 2.1 TOPO- TA (για τις βιβλιοθήκες MspI-DP3 και MseI-DP3)

Πορεία

1. Παρασκευή μίγματος που περιέχει 4μl PCR, 1μl Salt solution (1.2M NaCl, 0.06M MgCl₂) και 1μl TOPO Vector, ανάδευση και

επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 30λεπτά.

2. Προσθήκη του μίγματος σε κύτταρα *E.coli* TOPO10 (Invitrogen), ανάδευση και επώαση στον πάγο για 30 λεπτά.



3. Πρόκληση θερμικού σοκ (heat shock) στους 42°C για 30 δευτερόλεπτα.
4. Προσθήκη 250μl διαλύματος S.O.C και για μια ώρα στους 37°C υπό ανάδευση.

S.O.C Medium
2% Tryptone
0.5% Yeast Extract
10mM NaCl
2.5mM KCl
10mM MgCl ₂
10mM MgSO ₄
20mM glucose

5. Ετοιμασία τριβλίων για την εφαρμογή στερεής καλλιέργειας, οι οποίες περιείχαν LB, agar, Amp 50γ/ ml και X- gal. Επώαση όλο

το βράδυ στους 37°C και εν συνεχεία, διατήρηση στους +4°C.

Διάλυμα LB (ανά λίτρο)	Bacto-tryprone 10g, bacto-yeast extract 5g, NaCl 10g, NaOH 10M 100μl
------------------------	---

Διάλυμα LB με άγαρ (ανά λίτρο)	LB με 15g bacto-agar
--------------------------------	----------------------

2.8 Απομόνωση Πλασμιδιακού DNA (Miniprep)

Πραγματοποιείται υγρή καλλιέργεια στους κλώνους που λαμβάνονται από τα τρυβλία, η οποία περιέχει LB με αμπικιλίνη 50μg/ml. Επώαζεται για όλο το βράδυ στους 37°C υπό ανάδευση.

Εν συνεχεία, πραγματοποιείται απομόνωση πλασμιδιακού DNA στους προτιμητέους κλώνους με τη χρήση PureLink™ Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen).

2.9 Ανάλυση κατά Southern (Southern, 1975)

A. Πέψη αρσενικών και θηλυκών ατόμων με τα περιοριστικά ένζυμα *MspI* και *MseI*

Digestion mix	MspI		MseI	
	M	F	M	F
DNA	5μg	5μg	5μg	5μg
Buffer 10X	10μl		10μl	
MspI	10μl		-	
MseI	-		10μl	
BSA	-		1μl	
ddH ₂ O μέχρι 100μl	 μέχρι 100μl	

Παρασκευή του μίγματος της πέψης και επώαση στους 37°C για όλο το βράδυ.

B. Κατακρήμιση DNA

Ακολουθεί προσθήκη 100μl TE, 100μl Άλας Αμμωνίου 7.5M και 400μl κρύα Αιθανόλη και εφαρμογή του πρωτοκόλλου για την κατακρήμιση του DNA (παράγραφος 2.5.1.F).

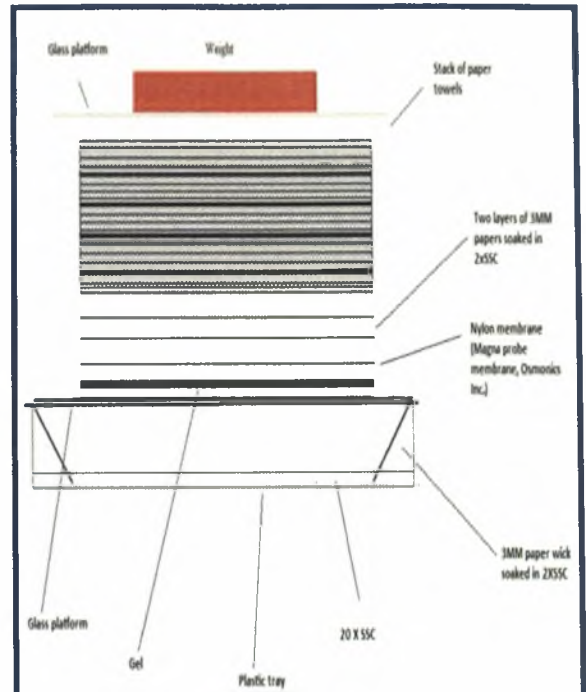
C. Ηλεκτροφόρηση και Ανάλυση κατά Southern

Πορεία

1. Ηλεκτροφόρηση: Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 2% 1X TBE, στα 35V όλο το βράδυ στους 4°C.
2. Προετοιμασία πηκτωμάτων για την ανάλυση κατά Southern:
 - a. Θραύση μεγάλων κομματιών DNA μέσω της αποκοπής πουρινών και οξέως (fragmentation of large DNA and acid depurination): Τοποθέτηση του πηκτώματος σε διάλυμα HCl 0.2M για 10 λεπτά.
 - b. Αποδιάταξη του DNA και εξουδετέρωση: Επώαση του gel για 15 λεπτά σε διάλυμα αποδιάταξης, επί δύο φορές. Ομοίως για το διάλυμα εξουδετέρωσης.

Buffer	
Αποδιάταξης (Denaturation)	1.5M NaCl 0.5M NaOH
Εξουδετέρωσης (Neutralization)	1M Tris- HCl, pH 7.4 1.5M NaCl

3. Ανάλυση κατά Southern:
 - a. Κατασκευή μηχανισμού "blotting"
 - b. Επώαση της μεμβράνης για 12 με 18ώρες για τη μεταφορά του gel.



Buffer	
20X SCC	3M NaCl 0.3M sodium citrate

4. Σταθεροποίηση του DNA στη μεμβράνη:
 - a. Έκθεση της μεμβράνης στο UV για 2λεπτά.
 - b. Προ- υβριδοποίηση σε διάλυμα προ-υβριδοποίησης (Amersham Gene Images AlkPhos Direct Labelling and Detection System, GE Healthcare) στους 55°C για 2 με 3 ώρες.

Buffer	
Προ-υβριδοποίησης:	
0.5M NaCl 4% w/v blocking reagent	Σε διάλυμα Υβριδοποίησης

5. Σήμανση ανιχνευτή:
 - a. Θέρμανση 10μl DNA (10ng/μl) στους 100°C για 5 λεπτά.
 - b. Επώαση στον πάγο για 5 λεπτά.

- c. Προσθήκη 10μl reaction buffer, 2μl labeling reagent, 10μl cross – linker solution.
 d. Επώαση στους 37°C για 30 λεπτά.
 Προσθήκη των ανιχνευτών στο διάλυμα υβριδοποίησης και επώαση στους 55°C για όλο το βράδυ.

6. "Ξέπλυμα" της μεμβράνης:

- a. Επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα πλύσης A για 10 λεπτά, ξέπλυμα αυτής και επανατοποθέτηση της στο ίδιο διάλυμα για άλλα 10 λεπτά.
 b. Ακολουθεί επώαση στο διάλυμα πλύσης B για 10 λεπτά και επανάληψη της διαδικασίας.

Διάλυμα πλύσης A	-2M Urea, 0.1% (w/v) SDS, 50mM Na-phosphate pH 7.00, 150mM NaCl, 1mM -MgCl ₂ , 0.2% (w/v) blocking reagent
Διάλυμα πλύσης B	-50mM Tris base pH 10.00, 0.1M NaCl, -2mM MgCl ₂

7. Ανίχνευση σήματος:

- a. Επώαση της μεμβράνης στο διάλυμα detection reagent (CDP- star) για 5 λεπτά.
 b. Αφαίρεση του εναπομείναντος υγρού από τη μεμβράνη τινάζοντας την και τύλιγμά της μέσα σε διαφανή μεμβράνη.
 c. Σε σκοτεινό δωμάτιο τοποθετείται η μεμβράνη σε κινηματογραφική ταινία (KODAK BIOMAX XAR FILM) και πραγματοποιείται εκθεση του blot για μια ώρα.
 d. Πραγματοποιείται εμφάνιση της ταινίας.

2.10 PCR με τη χρήση primers CIAf και C1Ar

Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν αραιώθηκαν με διάλυμα TE, επωάστηκαν για

30λεπτά στους 37°C και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -20°C.

Πραγματοποιήθηκε ενίσχυση των κλώνων C1A.

Mix	Ποσότητες σε μl
DNA	1
Buffer 10x	2.5
MgCl ₂	0.73
dNTPs	0.5
Primer f	0.5
Primer R	0.5
Taq pol	0.5
ddH ₂ O	18.75

Πορεία Ενίσχυσης (x 24 κύκλους..)

1. Αποδιάταξη αρχικού DNA για 3 λεπτά στους 95°C.
2. Αποδιάταξη για 30 δευτερόλεπτα στους 94°C.
3. Υβριδισμός εκκινητών για 30 δευτερόλεπτα στους 58°C.
4. Πολυμερισμός αλυσίδων για 30 δευτερόλεπτα στους 72°C.
5. Τελικός πολυμερισμός για 2 λεπτά στους 72°C.

Αποτελέσματα

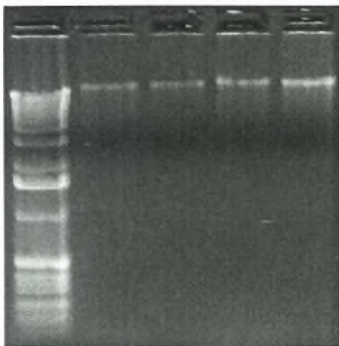
Αποτελέσματα

3.1 Ποσοτικοποίηση γονιδιωματικού DNA από μών *Bactrocera oleae*

Έγινε απομόνωση DNA από αρσενικά και θηλυκά άτομα *Bactrocera oleae* μέσω της μεθόδου Baruffi (εικόνα 13) και προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του DNA στα αρσενικά και θηλυκά άτομα (πίνακας 3).

	Males (ng)	Females (ng)
1	3.665	3.463
2	3.568	4.565
3	2.698	2.848
4	2.650	1.636
5	2.903	3.868
6	4.808	2.450
7	2.939	2.041
8	1.830	2.207
9	6.395	2.727

Πίνακας 3: "Ποσοτικοποίηση της απομόνωσης DNA από δείγματα της υβριδικής σειράς από το Ισραήλ του δάκου *Bactrocera oleae*"



Εικόνα 13: "Παράδειγμα ηλεκτροφόρησης DNA σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από καθαρισμό του"

3.2 Ποσοτικοποίηση RNA από θηλυκά άτομα *Ceratitidis capitata*

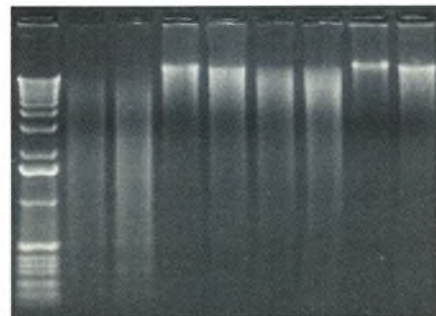
Έγινε απομόνωση RNA συνολικής ποσότητας 25 μg/μL (260/280), το οποίο στη

συνέχεια αραιώθηκε μέχρι τελικής συγκεντρώσεως 5 μg/μL.

3.3 Πέψη με περιοριστικά ένζυμα

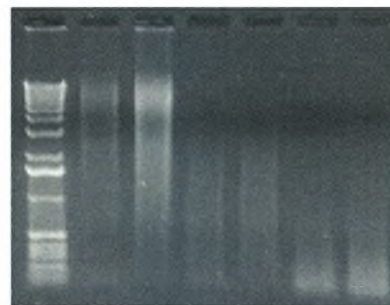
Πραγματοποιήθηκε πέψη με τα περιοριστικά ένζυμα *MspI*, *BglII*, *EcoRI*, *BamHI* (εικόνα 14), *MseI*, *DpnII* και *HindIII* (εικόνα 15) ώστε να διαπιστωθεί με ποιο από τα παραπάνω ένζυμα προκύπτουν θραύσματα του γονιδιώματος μοριακού βάρους μεταξύ 100 έως 1.000 bp.

MspI *BglII* *EcoRI* *BamHI*
M F M F M F M F



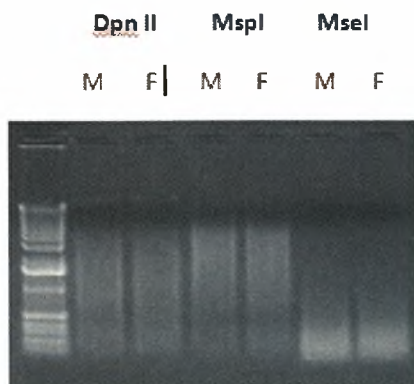
Εικόνα 14: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από την πέψη DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *MspI*, *BglII*, *EcoRI* και *BamHI* (όπου M=male, δηλαδή αρσενικά άτομα και F=female, δηλαδή θηλυκά)"

HindIII *DpnII* *MseI*
M F M F M F



Εικόνα 15: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από την πέψη DNA με τα περιοριστικά ένζυμα *HindIII*, *DpnII* και *MseI*"

Επιλέχθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα DpnII, MspI και MseI, τα οποία αναγνωρίζουν νουκλεοτιδικές αλληλουχίες τεσσάρων βάσεων και δεδομένου ότι ήταν αυτά τα οποία έδωσαν τις πιο έντονες ζώνες στο εύρος 100 έως 1.000 bp κρίθηκαν ως τα καταλληλότερα για να χρησιμοποιηθούν στην κατασκευή βιβλιοθηκών (εικόνα 16).



Εικόνα 16: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων πέψης με τα περιοριστικά ένζυμα DpnII, MspI και MseI"

3.4 Κατασκευή βιβλιοθήκης RDA (Representational Digestion Analysis, Ανάλυση Αντιπροσωπευτικής Πέψης) (Lisistyn et al., 1993)

3.4.1 Δημιουργία Αντιπροσωπευτικών πέψεων

Οι προσαρμογείς που χρησιμοποιήθηκαν κατά την διεξαγωγή της δημιουργίας των αντιπροσωπεύσεων ήταν οι εξής:

R-Dpn24,
5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'
R- Dpn12,
5'-GATCTGCGGTGA-3'

J- Dpn24,
5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'
J- Dpn12,

5'-GATCTGTTCATG-3'

N- Dpn24,
5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'
N- Dpn12,
5'-GATCTTCCCTCG-3'

R-Msp24,
5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCAC-3'
R-Msp12,
5'-CGGTGCGGTGAG-3'

J-Msp24,
5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACAC-3'
J-Msp12,
5'-CGGTGTTTCATGG-3'

N-Msp24,
5'-AGGCAACTGTGCTACTCGAGGGAAAC-3'
N-Msp12,
5'-CGGTCCCTCGA-3'

R-Mse24,
5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCAT-3'
R-Mse12,
5'-TAATGCGGTGAG-3'

J-Mse24,
5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACAT-3'
J-Mse12,
5'-TAATGTTTCATGG-3'

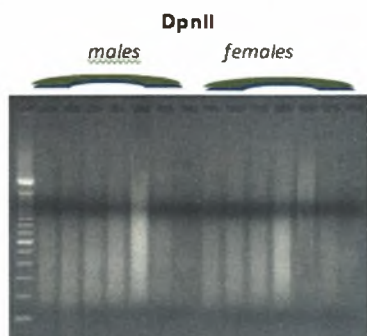
N-Mse24,
5'-AGGCAACTGTGCTACTCGAGGGAAAT-3'
N-Mse12,
5'-TAATCCCTCGA-3'

1. PCR δοκιμής:

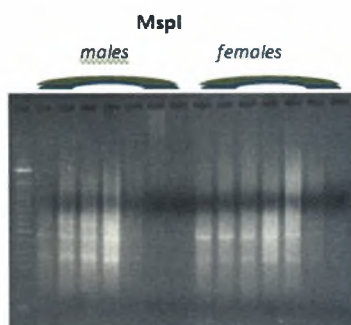
Αρχικά, πραγματοποιήθηκε μια αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) ενίσχυσης του γονιδιώματος στα προϊόντα της πέψης των περιοριστικών ενζύμων DpnII, MspI και MseI και πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές αραιώσεις (εικόνες 17, 18 και 19). Στόχος

ήταν να προσδιοριστεί ποια συγκέντρωση του DNA είναι εκείνη στην οποία παρατηρείται αυξημένη ενίσχυση του προϊόντος και είναι η καταλληλότερη για την διεξαγωγή των αντιπροσωπεύσεων.

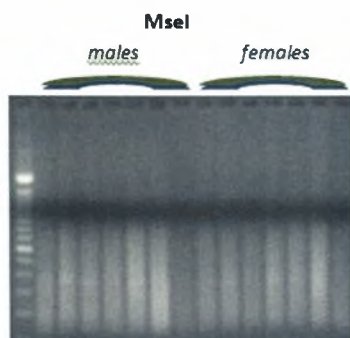
Τα προϊόντα της πέψης ενισχύθηκαν μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας ως εκκινητή τον R#24.



Εικόνα 17: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από την PCR αραίωσης σε αρσενικά και θηλυκά άτομα *Bactrocera oleae* με το ένζυμο περιορισμού DpnII και συνδεδεμένο με το oligo-R"



Εικόνα 18: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από την PCR αραίωσης σε αρσενικά και θηλυκά άτομα"



Εικόνα 19: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από την PCR αραίωσης σε αρσενικά και θηλυκά άτομα *Bactrocera oleae* με το περιοριστικό ένζυμο MseI και συνδεδεμένο με oligo-R"

Στον πίνακα (4) παρουσιάζονται οι κατάλληλες συγκεντρώσεις DNA που επιλέχθηκαν από την PCR δοκιμής.

mix	"καλύτερη αραίωση"	Ποσότητα περιεχόμενου DNA σε ng/μl
DpnII	M	n ⁰ 5
	F	n ⁰ 4
MspI	M	n ⁰ 4
	F	n ⁰ 4
MseI	M	n ⁰ 4
	F	n ⁰ 4

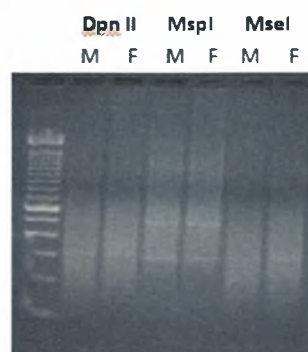
Πίνακας 4: "Αποτελέσματα αραίωσης από την PCR δοκιμής (όπου M=Male, F=Female)"

2. Αντιπροσώπηση:

Μετά την επιλογή καλύτερης αραίωσης, πραγματοποιήθηκε εκ νέου ενίσχυση του DNA, χρησιμοποιώντας ως εκκινητή τον R#24. Το DNA εκχυλίστηκε (πίνακας 5) και πραγματοποιήθηκε πέψη για την απομάκρυνση των oligo-R (εικόνα 20).

Mix	ng σε 30μl	
DpnII	M	6.480
	F	6.792
MspI	M	6.372
	F	6.939
MseI	M	5.322
	F	7.191

Πίνακας 5: "Συγκεντρώσεις δειγμάτων DNA μετά την εκχύλιση"

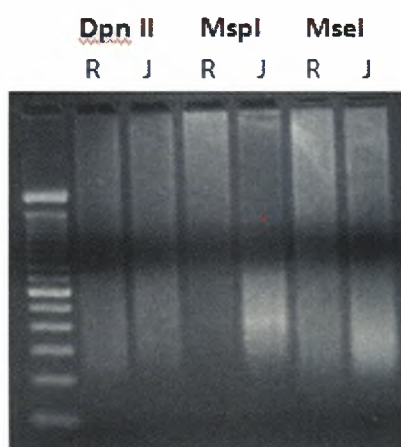


Εικόνα 20: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης της αντιπροσώπευσης για την απομάκρυνση των προσαρμογέων-R"

3.4.II DP1: Differential product I

1. PCR δοκιμής:

Οι αντιπροσωπεύσεις των αρσενικών ατόμων υπέστησαν σύνδεση με προσαρμογείς oligo-J και ενισχύθηκαν μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας ως εκκινητές τους R#24 και J#24 για να επιβεβαιωθεί εάν οι προσαρμογείς oligo-J είχαν συνδεθεί στις αντιπροσωπεύσεις (εικόνα 21).



Εικόνα 21: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των αρσενικών ατόμων συνδεδεμένων με oligo-J μετά από την PCR δοκιμής"

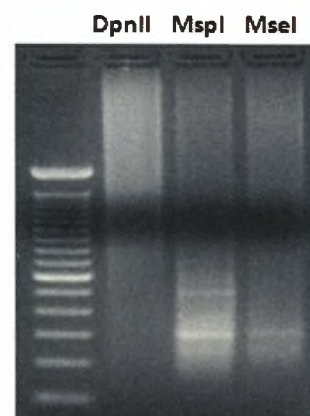
2. Δημιουργία του DP1:

Οι αντιπροσωπεύσεις των αρσενικών ατόμων συνδεδεμένων με oligo-J υβριδοποιήθηκαν με αυτές των θηλυκών και το υβριδοποιημένο DNA ενισχύθηκε μέσω του primer J#24 για τη δημιουργία του προϊόντος DP1. Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε πέψη της αντιπροσώπευσης για την απομάκρυνση προσαρμογέων-J (εικόνα 22) μέσω της

χρήσης PCR micro Kit (Invitrogen) και προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις τους (πίνακας 6).

DP1	ng σε 48μl
DpnII	6.475.2
MspI	8.856
MseI	1.840

Πίνακας 6: "Ποσοτικοποίηση του DNA μετά τον καθαρισμό"



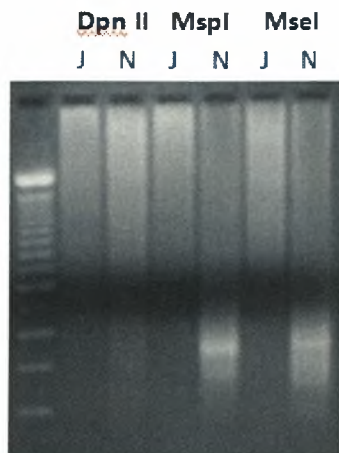
Εικόνα 22: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος DP1"

3.4.III DP2: Differential product II

1. PCR δοκιμής:

Για την δημιουργία του δεύτερου προϊόντος της αντιπροσώπευσης χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο το DP1, το οποίο υπέστη σύνδεση με προσαρμογείς oligo-N και ενισχύθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιώντας τον εκκινητή N#24. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του DP1 χρησιμοποιώντας ως εκκινητή τον J#24 για να διαπιστωθεί ότι όντως είχαν απομακρυνθεί οι προσαρμογείς oligo-J από το δείγμα μετά από τον καθαρισμό του με το micro Kit. Τα προϊόντα της ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν και επιβεβαιώθηκε η

απομάκρυνση των oligo-J και η σύνδεση των προσαρμογέων oligo-N στο DP1 (εικόνα 23).



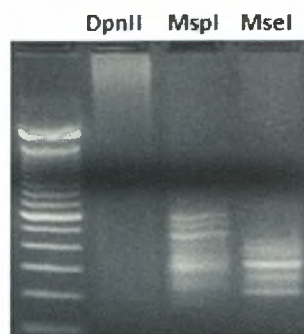
Εικόνα 23: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος DP1 συνδεδεμένου με oligo-N μετά από την PCR δοκιμή"

2. Δημιουργία του DP2:

Το συνδεδεμένο με oligo-N DP1 υβριδοποιήθηκε με τις αντιπροσωπεύσεις των θηλυκών ατόμων και το υβριδοποιημένο DNA ενισχύθηκε μέσω του εκκινητή N#24 για τη δημιουργία του προϊόντος DP2 (εικόνα 24). Εν συνεχεία, πραγματοποιήθηκε πέψη της αντιπροσώπευσης για την απομάκρυνση των προσαρμογέων-N μέσω της χρήσης PCR micro Kit και προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις του προϊόντος DP2 (πίνακας 7).

DP2	ng/uL	260/280
DpnII	81.8	1.86
MspI	189.5	1.84
MseI	125.2	1.85

Πίνακας 7: "Ποσοτικοποίηση του DNA μετά τον καθαρισμό"



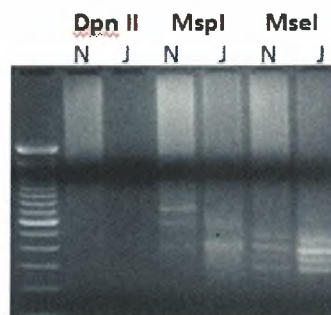
Εικόνα 24: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης DP2"

3.4.IV DP3: Differential product III

1. PCR δοκιμής:

Η DP2 υπέστη σύνδεση με τους προσαρμογείς oligo-J και ενισχύθηκε μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, χρησιμοποιώντας ως εκκινητή τον J#24. Επιπλέον, το προϊόν DP2 ενισχύθηκε με τον εκκινητή N#24 για να επιβεβαιωθεί η απομάκρυνση των προσαρμογέων oligo-N.

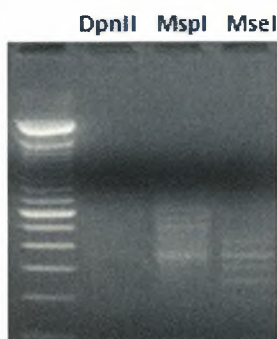
Πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης όπου διαπιστώθηκε η επιτυχής απομάκρυνση των προσαρμογέων oligo-N και η επιτυχής σύνδεση των oligo- J (εικόνα 25).



Εικόνα 25: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του προϊόντος DP2 συνδεδεμένου με oligo-J μετά από την PCR δοκιμή"

2. Δημιουργία του DP3:

Το συνδεδεμένο με oligo-J προϊόν DP2 υβριδοποιήθηκε με τις αντιπροσωπεύσεις των θηλυκών ατόμων και το υβριδοποιημένο DNA ενισχύθηκε μέσω του primer J#24 για τη δημιουργία του προϊόντος DP3 (εικόνα 26).



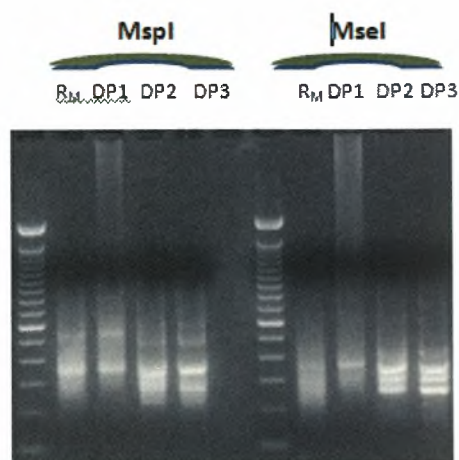
Εικόνα 26: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης DP3"

3. PCR Βιβλιοθήκη:

Για την δημιουργία της PCR βιβλιοθήκης χρησιμοποιήθηκαν τα περιοριστικά ένζυμα DpnII, MspI και MseI. Από αυτά τα τρία ενισχύθηκαν και έδωσαν προϊόν αντιπροσωπευσης μόνο τα δύο τελευταία. Η βιβλιοθήκη DpnII δεν προκάλεσε ενίσχυση καμιάς αλληλουχίας. Αυτό μπορεί να προκλήθηκε είτε λόγω κάποιου τεχνικού προβλήματος κατά τη διάρκεια της δημιουργίας αυτής της βιβλιοθήκης, για παράδειγμα μη σύνδεση των προσαρμογών στο DNA που είχε υποστεί πέψη, είτε το ένζυμο αυτό να μην αναγνωρίζει αλληλουχίες DNA του χρωμοσώματος Y στο απαιτούμενο μέγεθος για την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε πέψη του γονιδιώματος των αρσενικών ατόμων και σύνδεση με τους προσαρμογείς oligo-R στο δείγμα (στήλη R_M). Το προϊόν αυτό χρησιμοποιήθηκε ως εκμαγείο για τη δημιουργία της πρώτης αντιπροσωπευσης (DP1). Αυτό, στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε για την δεύτερη αντιπροσωπευση (DP2), η οποία αποτέλεσε εκμαγείο της τρίτης (DP3).

Στην εικόνα (27), φαίνεται η συνολική πορεία από τις διαδοχικές αντιπροσωπεύσεις που πραγματοποιήθηκαν και παρατηρούνται οι ζώνες ενίσχυσης συγκεκριμένων αλληλουχιών του γονιδιώματος αρσενικών ατόμων του *B. oleae*. Οι αλληλουχίες αυτές του προϊόντος DP3 χρησιμοποιήθηκαν περαιτέρω για να διαπιστωθεί αν είναι Y- ειδικές.



Εικόνα 27: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης όπου διαφαίνεται η συνολική εικόνα των προϊόντων που λάβαμε από τις αντιπροσωπεύσεις (R_M, DP1, DP2 και DP3) συγκριτικά με το δείγμα που περιείχε DNA συνδεδεμένο με oligo-R από αρσενικά άτομα *Bactrocera oleae*"

3.5 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA για MseI-DP3

Από τις τρεις βιβλιοθήκες που κατασκευάστηκαν επιλέχθηκε να αναλυθεί και να σταλεί για αλληλούχιση η τρίτη, αυτή του MseI.

Το πλασμιδιακό DNA τυχαίων κλώνων απομονώθηκε και υπέστη πέψη με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI για να διαπιστωθεί ο επιτυχής ανασυνδυασμός. Οι θετικοί κλώνοι στάλθηκαν στην εταιρεία MacroGen Inc. για να προσδιοριστεί η αλληλουχία τους.



Εικόνα 28: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των κλώνων C1, μετά από πέψη με το ένζυμο EcoRI"

3.6 Αλληλουχία του C1A

Η αλληλουχία προσδιορίστηκε με τη χρήση του primer M13 forward.

1. Αλληλουχία C1A

ACCGACGTCGACTATCCATGAACA**TTAA**GGCATTATTCAATCTCTGAGGAAATTATATAGTTCGAATG
 GCTATAGCATATAGCTTCCGTACAAACTGAACATTTGGAATCAAGTATTTGTATGGAAAACCTTTTCATT
 TGACGAG**G**TAG**C**TT**C**AC**G**AAAT**G**TT**G**CATATATTTATTTTCAGGCAACAATGTAATCTCCGAAGAAAT
 TATTCAGTTCGGATGACTATAGCATACAGCTGCCATACAAACTGAACAATCGGAATCAAGTGCTTGTAT
 GAAAAACCTTTTCATTTGACGAGGTATCTTTAC**G**AAATTT**G**CAC**G**AAAT**T**GT**C**AG**TTAA**TGTTTCATGGAT
AGTCGACGTCGGT

Εικόνα 29: "Η αλληλουχία C1A, όπου: **N**: oligo-J Mse24, **TTAA**: MseI restriction sequence και **N**:C1A primers"

2. Ανάλυση της αλληλουχίας C1A

α) Γενικά Χαρακτηριστικά

Μήκος της αλληλουχίας: 360 bp

Μήκος της αλληλουχίας χωρίς oligo-J: 312 bp

Ποσοστό των βάσεων AT: 65.7%

β) Ανάλυση μέσω του ηλεκτρονικού προγράμματος Blastn (NCBI)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
AJ535757.1	<i>Bactrocera oleae</i> ovoB	277	539	96%	3,00E-71	84%
AJ535756.1	<i>Bactrocera oleae</i> ovoA	277	539	96%	3,00E-71	84%
FJ710563.1	<i>Bactrocera dorsalis</i> pnr gene	143	1312	95%	4,00E-31	85%
FJ710559.1	<i>Bactrocera dorsalis</i> pnr gene	125	299	85%	1,00E-25	85%

FJ710555.1	<i>Bactrocera dorsalis</i> pnr gene	125	299	85%	1,00E-25	85%
FJ710550.1	<i>Bactrocera dorsalis</i> eve gene	114	209	81%	2,00E-22	80%
FJ710598.1	<i>Bactrocera dorsalis</i> tko and gt genes	91.5	152	83%	2,00E-15	71%
EU489807.1	<i>Ceratitidis capitata</i> microsatellite Medflymic152	91.5	170	68%	2,00E-15	88%
U97104.1	<i>Bactrocera tryoni</i> white gene	73.4	141	60%	6,00E-10	76%
M34544.1	<i>D.virilis</i> sevenless gene	66.2	66.2	80%	9,00E-08	68%
AF098329.1	<i>Drosophila virilis</i> eyeless protein gene	62.6	123	80%	1,00E-06	73%
EU489756.1	<i>Bactrocera oleae</i> microsatellite Boms14	60.8	60.8	16%	4,00E-06	86%
AF289109.1	<i>Drosophila lummei</i> L5 transposon Penelope gene	60.8	60.8	30%	4,00E-06	75%
EU523047.1	<i>Drosophila montana</i> hsp70 gene	51.8	51.8	27%	0.002	75%

Πίνακας 8: "Αποτελέσματα σύγκρισης της αλληλουχίας C1A με γνωστές αλληλουχίες, χρησιμοποιώντας τη βάση δεδομένων Blastn"

c) Στοιχισμός της αλληλουχίας C1A

Πραγματοποιήθηκε στοιχισμός με τις πρώτες τρεις αλληλουχίες που βρέθηκαν από τον πίνακα (6) με το πρόγραμμα Blastn. Για τη στοιχισμός χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα T-Coffee.

```
C1A          TTAAGGCATTTATTCAATCTCTGAGGAAATTATATAGTTTCGAATGGCT
AJ535757.1  -----CT
AJ535756.1  -----CT
FJ710563.1  -----CT
```

```
C1A          ATAGCATATAGCTTCCGTAACAAACTGAAACATTTGGAAATCAAGTATTTG
AJ535757.1  ATAGCATATAGCTGCCAACAACAAACTGAAACATTCGGAAAGCAAGTCTTTG
AJ535756.1  ATAGCATATAGCTGCCAACAACAAACTGAAACATTCGGAAAGCAAGTCTTTG
FJ710563.1  -----aaglcstt
```

```
C1A          TATGGAAAACCTCTTTCATTTGACGAGGTAGCCTTCAAGAAATCTTGGCAT
AJ535757.1  TATGGAAAACCTTCTTTCATTTGAAAGCAATATCATCAAGAAATCTTGGCAT
AJ535756.1  TATGGAAAACCTTCTTTCATTTGAAAGCAATATCATCAAGAAATCTTGGCAT
FJ710563.1  TATGGAAAACCTTCTTTCATTTGAAAGCAATATCATCAAGAAATCTTGGCAT
```

C1A
 AJ535757.1
 AJ535756.1
 FJ710563.1

```

    ATTTTATTTATTTTCAGGCCAACCAATGTAATCTCCGAAAGAAAATTATTTCAAT
    CAGTTATTTTCTAAGCCCAACAATATAAATCTCCCAAAAAATTTCTTTTACG
    CAGTTATTTTCTAAGGCCAAGAATATAAATCTCCGAAAAAAATTTGTTTAA
    TTTTATTTTCTAAGGCCAAGAATATAAATCTCCGAAAAAAATTTGTTTAA
    
```

C1A
 AJ535757.1
 AJ535756.1
 FJ710563.1

```

    TCGGATGACTATAGCATATAGCTGCCATACAAAACCTGAAACGATCGGAAI
    TCGGATGACTATAGCATATAGCTGCCATACAAAACCTGAAACGATCGGAAI
    TCGGATGACTATAGCATATAGCTGCCATACAAAACCTGAAACGATCGGAAI
    TCGGACTATTATAGCATATAGCTGTCTTACAATCTGATCGACATAAAC
    
```

C1A
 AJ535757.1
 AJ535756.1
 FJ710563.1

```

    CAAATGCTTTGATGGAAAACTCTTTTCATTTGACCGAGGT-----ATCT
    CAAATGCTTTGATGGAAAACTCTTTTCATTTGACCGAGGT-----ATCT
    CAAATGCTTTGATGGAAAACTCTTTTCATTTGACCGAGGT-----ATCT
    caatgcttttgtatagaaaaccttttcatttggaccgaggtatcagagtatc
    
```

C1A
 AJ535757.1
 AJ535756.1
 FJ710563.1

```

    TTACGAAATTTGGCACGAAATGTCAGTTAA
    TCAC-----AAAT-----T
    TCAC-----AAAT-----T
    tcacg-----aaat-ttag--ca
    
```

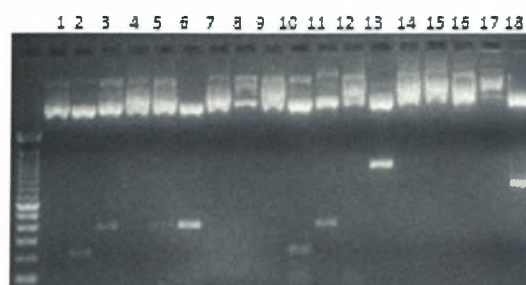
d) Ανάλυση κατά Southern με ανιχνευτή την αλληλουχία C1A

Η ανάλυση κατά Southern πραγματοποιήθηκε στο γονιδιωματικό DNA του *B.oleae*, της σειράς του Ισραήλ μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο MseI. Χρησιμοποιήθηκε τόσο για τα αρσενικά όσο και για τα θηλυκά άτομα η ίδια ποσότητα του DNA (5 μg). Από την υβριδοποίηση προέκυψε σήμα και στα δύο φύλα, μεγαλύτερης όμως έντασης στα αρσενικά άτομα (εικόνα 30). Το γεγονός αυτό είναι αποτέλεσμα της ύπαρξης μεγαλύτερου αριθμού αντιγράφων των αλληλουχιών αυτών στα αρσενικά άτομα του *B.oleae*, δηλαδή του μεγαλύτερου αριθμού μορίων της αλληλουχίας C1A που εντοπίζονται στο γονιδίωμα τους.



Εικόνα 30: "Ανάλυση κατά Southern"

συνεχεία, έγινε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA. Οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι επιβεβαιώθηκαν μέσω της πέψης με το περιοριστικό ένζυμο EcoRI και επιλέχθηκαν για να αναλυθεί η αλληλουχία τους.



Εικόνα 32: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των κλώνων C1A, μετά από πέψη με το ένζυμο EcoRI"

3.9 Ανάλυση των αλληλουχιών C1A

Η προσδιορισμός της αλληλουχίας των κλώνων που απομονώθηκαν έδειξε ότι η ζώνη μεγέθους 188 bp ταυτοποιείται στην αλληλουχία C1A. Οι ζώνες μεγαλύτερου μεγέθους (342 bp, 500 bp και 650 bp) συνδέονται με τη ζώνη 188 bp. Παρακάτω φαίνεται η σχέση μεταξύ των ζωνών. Πιο συγκεκριμένα, γίνεται σύγκριση του κλώνου C1A2 με τον κλώνο C1A3 και C1A18.

📌 Στοιχισμός της αλληλουχίας C1A3 (342 bp) με την αλληλουχία C1A2 (188 bp)

		1	50
C1A_3	(1)	GTAGCTTCACGAAATGTTGCATATATATATATTTTAGGCAACAATGTAAT	
C1A_2	(1)	GTAGCTTCACGAAATGTTGCATATATATATATTTTAGGCAACAATGTAAT	
C1A_2#2	(1)	-----	
		51	100
C1A_3	(51)	CTCCGAAGAAATATTTAGTTCGGATGACTATAGCATTAAGCAGCCATAC	
C1A_2	(51)	CTCCGAAGAAATATTTAGTTCGGATGACTATAGCATACAGCTGCCATAC	
C1A_2#2	(1)	-----	
		101	150
C1A_3	(101)	AAACTGAACAATCGGAATGAAATTCCTTGTATGGAAAACCTCCTTCATTTGA	
C1A_2	(101)	AAACTGAACAATCGGAATCAAGTGCCTTGTATGGAAAACCTCTTTATTTGA	
C1A_2#2	(1)	-----	
		151	200
C1A_3	(151)	CGAGGTATCTTCACGAAATTTGGCATATATTAATATTTAAGGTATTTATTT	
C1A_2	(151)	CGAGGTATCTTTACGAAATTTGGCACGAATTTGTCAGTT-----	
C1A_2#2	(1)	----GTAGCTTCACGAAATGTTGCATATATATATATTTTAGGCAACAATG	
		201	250
C1A_3	(201)	CAATCACCGATGAAATATGTAGATCGGATATTTATAGCATATAGATTC	
C1A_2	(189)	-----	
C1A_2#2	(47)	TAATCTCCGAAGAAATATTTAGTTCGGATGACTATAGCATACAGCTGCC	
		251	300
C1A_3	(251)	ATACAAACTGAACAATCGGAATCAAGAGCTTGTATGGAAAACCTCTGTCAT	
C1A_2	(189)	-----	
C1A_2#2	(97)	ATACAAACTGAACAATCGGAATCAAGTCTTGTATGGAAAACCTCTTTAT	

```

                                301                                342
C1A_3 (301) TTGACGAGGTATCTTTACGAAATTTGGCACGAATTGTCAGTT
C1A_2 (189) -----
C1A_2#2 (147) TTGACGAGGTATCTTTACGAAATTTGGCACGAATTGTCAGTT
    
```

Στοιχισή της αλληλουχίας C1A18 (650 bp) με την αλληλουχία C1A2 (188 bp)

```

                                1                                50
C1A_18 (1) GTAGCTTCACGAAATGTTGCATATATTATTATTTTCAGGCAACAATGTAAT
C1A_2 (1) GTAGCTTCACGAAATGTTGCATATATTATTATTTTCAGGCAACAATGTAAT
C1A_2#2 (1) -----
C1A_2#3 (1) -----
C1A_2#4 (1) -----

                                51                                100
C1A_18 (51) CTCCGAAGAAATTATTCAGTTCGGATGACTATAGCATATAGCTGCCATAC
C1A_2 (51) CTCCGAAGAAATTATTCAGTTCGGATGACTATAGCATACAGCTGCCATAC
C1A_2#2 (1) -----
C1A_2#3 (1) -----
C1A_2#4 (1) -----

                                101                                150
C1A_18 (101) AAACCTGAATAATCGAAATCAAGTGCTTGAATGGAAAACCTCTTTCATTTGT
C1A_2 (101) AAACCTGAACAATCGGAATCAAGTGCTTGTATGGAAAACCTCTTTCATTTGA
C1A_2#2 (1) -----
C1A_2#3 (1) -----
C1A_2#4 (1) -----

                                151                                200
C1A_18 (151) CGAGGTCACCTTCACGAAATTTGGCATATATTATTATTTAAGGCATTTAT
C1A_2 (151) CGAGGTATCTTTACGAAATTTGGCACGAATTGTCAGTT-----
C1A_2#2 (1) ----GTAGCTTCACGAAATGTTGCATATATTATTATTTTCAGGCAACAATG
C1A_2#3 (1) -----
C1A_2#4 (1) -----

                                201                                250
C1A_18 (201) CAATCTCTGAGGAAATTATATAGTTCGGATGGCTATAGCATATAGCTTCC
C1A_2 (189) -----
C1A_2#2 (47) TAATCTCCGAAGAAATTATTCAGTTCGGATGACTATAGCATAACAGCTGCC
C1A_2#3 (1) -----
C1A_2#4 (1) -----

                                251                                300
C1A_18 (251) ATACAAACTGAACATTTGGAATCAAGTATTTGTATGGAAAACCTCTTTCAT
C1A_2 (189) -----
C1A_2#2 (97) ATACAAACTGAACAATCGGAATCAAGTGCTTGTATGGAAAACCTCTTTCAT
C1A_2#3 (1) -----
C1A_2#4 (1) -----

                                301                                350
C1A_18 (301) TTGACGAGGTTTCTTCACGAAATTTGTACGAATTATTATTTAAGGTTAC
C1A_2 (189) -----
C1A_2#2 (147) TTGACGAGGTATCTTTACGAAATTTGGCACGAATTGTCAGTT-----
C1A_2#3 (1) -----GTAGCTTCACGAAATGTTGCATATATTATTATTTTCAGGCAAC
C1A_2#4 (1) -----

                                351                                400
C1A_18 (351) GATGTAATCTCCGAAGAAATTATTCAGAGCGGATGACTATAGCATATAGC
C1A_2 (189) -----
    
```

```

C1A_2#2 (189) -----
C1A_2#3 (43) AATGTAATCTCCGAAGAAATTATTCAGTTCCGGATGACTATAGCATACAGC
C1A_2#4 (1) -----
                401                                     450
C1A_18 (401) TTCCATACAAATTGAACAATCGGAATCAAGTGCTTGTATGGAAAACCTCTT
C1A_2 (189) -----
C1A_2#2 (189) -----
C1A_2#3 (93) TGCCATACAAACTGAACAATCGGAATCAAGTGCTTGTATGGAAAACCTCTT
C1A_2#4 (1) -----
                451                                     500
C1A_18 (451) TCATTTGACGAGGTAGCTTCACGAAATTAGGCACAGATTGTCAGTTAAGG
C1A_2 (189) -----
C1A_2#2 (189) -----
C1A_2#3 (143) TTATTTGACGAGGTATCTTTACGAAATTTGGCACGAATTGTCAGTT----
C1A_2#4 (1) -----GTAGCTTCACGAAATGTTGCATATATTATTTATTTTCAGG
                501                                     550
C1A_18 (501) CAACAATGTAATCTCCAAAGAAATAATAAAGTTCGGATGACTATAGCGTA
C1A_2 (189) -----
C1A_2#2 (189) -----
C1A_2#3 (189) -----
C1A_2#4 (39) CAACAATGTAATCTCCGAAGAAATTATTCAGTTCCGGATGACTATAGCATA
                551                                     600
C1A_18 (551) TAGCTGCCATACAAACTGAATAATCGAAATCAAGTGCTTGAATGGAAAAC
C1A_2 (189) -----
C1A_2#2 (189) -----
C1A_2#3 (189) -----
C1A_2#4 (89) CAGCTGCCATACAAACTGAACAATCGGAATCAAGTGCTTGTATGGAAAAC
                601                                     650
C1A_18 (601) TCTTTTATTTGTCGAGGTATCTTCACGAAATTTGGCACGAATTGTCAGTT
C1A_2 (189) -----
C1A_2#2 (189) -----
C1A_2#3 (189) -----
C1A_2#4 (139) TCTTTTATTTGACGAGGTATCTTTACGAAATTTGGCACGAATTGTCAGTT

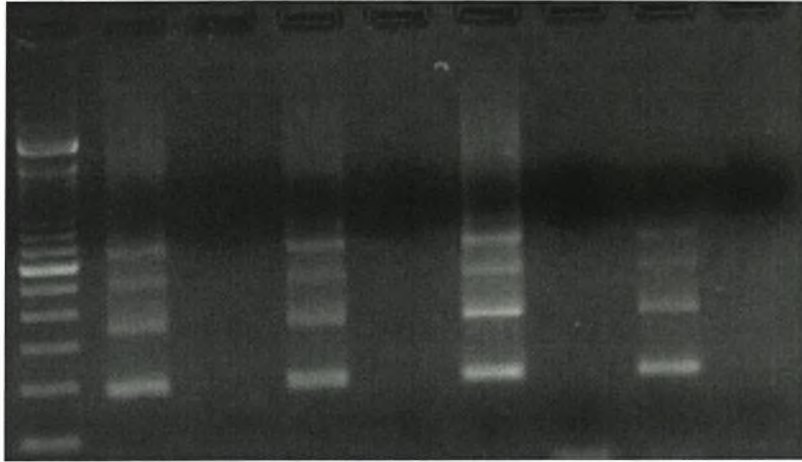
```

3.10 Ενίσχυση σε διάφορα άτομα *Bactrocera oleae*

Οι εκκινητές C1A (f, r) δίνουν προϊόν ενίσχυσης στα αρσενικά μόνο άτομα (εικόνα 31). Για να αποδειχθεί εάν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτης διαφοροποίησης μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων του είδους *B.oleae*, πραγματοποιήθηκε ενίσχυση του τμήματος αυτού σε διάφορα στελέχη του *B.oleae*. Στην εικόνα 33 φαίνεται η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης των δειγμάτων *B.oleae* από διάφορες γεωγραφικές περιοχές. Παρατηρούνται οι τέσσερις προαναφερθείσες ζώνες των 188 bp, 342 bp, 500 bp και 650 bp στα αρσενικά άτομα του είδους, ενώ στα θηλυκά δεν παρατηρείται κανένα αποτέλεσμα.

Συμπεραίνεται, επομένως, η κατάλληλη χρήση των εκκινητών C1A (f, r) ως δείκτες για τον διαχωρισμό μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων του είδους *B.oleae*.

Ισραήλ		Δημόκριτος		Ιορδανία		Λίβανο	
m ₁	f ₁	m ₂	f ₂	m ₃	f ₃	m ₄	f ₄



Εικόνα 33: "Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μετά από ενίσχυση του κλώνου C1A σε αρσενικά και θηλυκά άτομα σε διαφορετικά στελέχη του *B. oleae*"

Συζήτηση

Συζήτηση

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάζεται η πρώτη μέθοδος μοριακής ανίχνευσης του φύλου στο είδος *Bactrocera oleae*. Δεδομένης της αδυναμίας διάκρισης των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων του εντόμου (έμβρυο, προνύμφη και νύμφη) βάσει μορφολογικών χαρακτηριστικών, η δυνατότητα μίας μεθόδου ανίχνευσης του φύλου κρίνεται μεγάλης οικονομικής σημασίας για τη μελέτη της γενετικής ανάπτυξης σε μοριακό επίπεδο.

Οι μέθοδοι μοριακής ανίχνευσης του φύλου βασίζονται στη χρήση γονιδιωματικών αλληλουχιών ειδικών για τα αρσενικά άτομα, δηλαδή αλληλουχιών που εντοπίζονται στο χρωμόσωμα Y. Στην οικογένεια Tephritidae, στην οποία περιλαμβάνεται ο δάκος *Bactrocera oleae*, έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι μοριακής ανίχνευσης του φύλου μόνο στο είδος *Ceratitis capitata* (Douglas et al, 2004). Χρησιμοποιώντας μορφολογικά χαρακτηριστικά, η φυλετική ταυτοποίηση στα είδη εντόμων όπως αυτό της μεσογειακής μύγας των φρούτων, *Ceratitis capitata* απαιτεί είτε ολόκληρα δείγματα ή συγκεκριμένα μέρη του σώματος από το τελικό στάδιο της κάμπιας ή από το στάδιο ανάπτυξης της ενηλικίωσης (White and Elson- Harris, 1992). Αντίθετα, η μοριακή ανίχνευση του φύλου εφαρμόζεται πιο εύκολα, απαιτώντας μικρή ποσότητα DNA από τα διάφορα αναπτυξιακά στάδια του βιολογικού κύκλου. Επιπροσθέτως, η χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) είναι επιτρεπτή για αυτού του είδους μεθόδων καθώς απαιτεί μικρές μόνο ποσότητες υλικού για την επιτυχή λειτουργία της. Αυτά τα πλεονεκτήματα θεωρούνται σημαντικά για τη ανάλυση πολλών ολομετάβολων εντόμων όπου τα ανώριμα φυσιολογικά άτομα δεν μπορούν να διακριθούν από τα ενήλικα ή σε περιπτώσεις όπου είναι διαθέσιμες μόνο πολύ μικρές ποσότητες γενετικού υλικού.

Μοριακή ανίχνευση του φύλου έχει αναπτυχθεί για ένα μεγάλο εύρος θηλαστικών (Fernando and Melnick, 2001) καθώς και για είδη πτηνών (Griffiths et al., 1998). Οι αλληλουχίες του DNA που είναι χρήσιμοι ως δείκτες μοριακής ανίχνευσης του φύλου, συνήθως προέρχονται από τα φυλετικά χρωμοσώματα. Αυτά τα χρωμοσώματα είναι μια ιδανική πηγή ειδικών φυλετικών αλληλουχιών DNA, διότι τα αρσενικά άτομα πολλών ειδών, συμπεριλαμβανομένης και της Μεσογειακής μύγας, φέρουν φυλετικά χρωμοσώματα τα οποία είναι ετερομορφικά (Zapater and Robinson, 1986). Επιπλέον, τα X και Y χρωμοσώματα, καθώς παρουσιάζουν μια τελείως διαφορετική δομή, υφίστανται μικρή ή καθόλου γενετική αλλαγή διαμέσου του ανασυνδυασμού γονιδίων (Bedo, 1987). Τα Y χρωμοσώματα τείνουν να περιέχουν λίγα συγγενικά λειτουργικά γονίδια και σπάνια φέρουν αλληλόμορφα που είναι συνδεδεμένα στο X χρωμόσωμα. Γενικά, η απλοειδής φύση του Y χρωμοσώματος προτείνει ότι εξελίσσεται ανεξάρτητα από το X ή από άλλα χρωμοσώματα. Σε διαφορετικά είδη, ένας αριθμός από διαφορετικές μεταλλαγές έχουν εντοπιστεί στο Y χρωμοσωμικό υλικό, ενώ το μεγαλύτερο μέρος τους είναι μοναδικοί νουκλεοτιδικοί πολυμορφισμοί (Hurles and Jobling, 2001). Για την επίτευξη μοριακής ανίχνευσης φύλου, απαιτείται η χρήση ειδικών δεικτών για την ταυτοποίηση DNA αλληλουχιών, με προέλευση από το ένα ή και τα δύο φυλετικά χρωμοσώματα. Η απομόνωση τέτοιων δεικτών, που μπορούν να διαγνώσουν την παρουσία είτε του X είτε του Y χρωμοσώματος, είναι δυνατόν να αποτελέσουν κριτήρια διαχωρισμού του φύλου των ατόμων ακόμη και σε πολύ αρχικά αναπτυξιακά στάδια.

Η πρώτη προσπάθεια μοριακής ανίχνευσης του φύλου σε έντομα της οικογένειας Tephritidae έγινε στο είδος *Ceratitis capitata* και ταυτοποιεί τα αρσενικά άτομα με βάση

την θετική ενίσχυση αλληλουχιών επαναλαμβανόμενου DNA, που προέρχεται από το Υ χρωμόσωμα (Anleitner and Haymer, 1992). Στην προσπάθεια αυτή λήφθηκαν DNA αλληλουχίες, που ήταν εμπλουτισμένες, ειδικές για το γονιδίωμα των αρσενικών ατόμων της Μεσογειακής μύγας και απομονώθηκαν μέσω μιας προσέγγισης διαφορικής υβριδοποίησης (differential hybridization approach). Στη συνέχεια, επιλέχθηκαν δώδεκα κλώνοι φάγων από τη γονιδιωματική βιβλιοθήκη, οι οποίοι έδωσαν πιο έντονο σήμα υβριδοποίησης με τον ανιχνευτή του γονιδιώματος των αρσενικών ατόμων από αυτό των θηλυκών. Η ανάλυση κατά Southern αποκάλυψε ότι αυτοί οι ανασυνδυασμένοι κλώνοι περιέχουν τουλάχιστον ένα θραύσμα που προκαλείται μετά από πέψη με *EcoRI*. Το θραύσμα αυτό ήταν ειδικό ή εμφανιζόταν σε υψηλότερο βαθμό στο αρσενικό γονιδίωμα απ' ό,τι στο γονιδίωμα των θηλυκών ατόμων. Αυτά τα θραύσματα από το ένζυμο *EcoRI*, όταν χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές, δημιούργησαν ένα όμοιο μοτίβο με το πρότυπο των πολλαπλών ζωνώσεων που προκύπτει από το γονιδιωματικό DNA των αρσενικών ατόμων. Το γεγονός αυτό υποδήλωσε την παρουσία επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, οι οποίες ήταν ομόλογες με περιοχές που είναι ειδικές ή εμπλουτισμένες στα αρσενικά άτομα. Η *In situ* υβριδοποίηση σε μιτωτικά χρωμοσώματα επιβεβαίωσε την Υ χρωμοσωμική προέλευση για αυτές τις ειδικές, ως προς τα αρσενικά, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες. Δεδομένα της οργάνωσης του γονιδιώματος δείχνουν μια διατήρηση αυτών των αλληλουχιών κατά τη διάρκεια της εξέλιξης. Σε αντίστοιχη προσέγγιση βασίστηκε η ανίχνευση του φύλου του κουνουπιού *Anopheles gambiae* (Krzywinski, 2004).

Μια άλλη μέθοδος συν-ενισχύει ομόλογες περιοχές του ριβοσωμικού DNA (rDNA) και στα δυο φυλετικά χρωμοσώματα. Στη Μεσογειακή μύγα, έχουν εντοπιστεί συστοιχίες του ριβοσωμικού DNA στα Χ και Υ

χρωμοσώματα (Bedo and Webb, 1989). Η διάκριση των αρσενικών και θηλυκών ατόμων γίνεται με βάση το πρότυπο των θραυσμάτων που προκύπτει μετά από πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *ApoI* των προϊόντων της PCR (Douglas, Untalan and Haymer, 2004). Αυτές οι δύο μέθοδοι είναι ικανές να επαληθεύουν τη φυλετική ταυτότητα των ατόμων, βασιζόμενοι με πολύ μικρές ποσότητες γενετικού υλικού, προερχόμενου από οποιοδήποτε στάδιο του βιολογικού κύκλου του εντόμου (Douglas et al., 2004).

Η μη συντήρηση των Υ-ειδικών αλληλουχιών της Μεσογειακής μύγας στο συγγενικό δάκο της ελιάς κατέστησε απαραίτητη την ανάγκη μιας εισαγωγικής μελέτης για την ταυτοποίηση κάποιας Υ-ειδικής αλληλουχίας του είδους αυτού. Στην παρούσα διπλωματική εργασία επιλέχθηκε η μέθοδος RDA (Representational Differential Analysis), καθώς επιτρέπει την απομόνωση ειδικών αλληλουχιών ενός DNA "tester" ξεκινώντας από μια δεξαμενή DNA αρκετά περίπλοκη, όπως είναι το γονιδιωματικό DNA (Lysitsin et al., 1993).

Μετά από μια πρώτη ανάλυση, τα περιοριστικά ένζυμα *DpnII*, *MspI* και *MseI* κρίθηκαν ως τα πιο κατάλληλα για να χρησιμοποιηθούν στη δημιουργία βιβλιοθηκών RDA. Από τα παραπάνω ένζυμα προέκυψαν θραύσματα του γονιδιώματος μοριακού βάρους μεταξύ 100 έως 1.000 bp, κατάλληλα για την εργασία αυτή.

Από τη βιβλιοθήκη *DpnII* δεν ενισχύθηκε καμία αλληλουχία. Εν αντιθέσει, οι βιβλιοθήκες *MspI* και *MseI*, αμφότερες, επέτρεψαν την ενίσχυση τουλάχιστον τεσσάρων αλληλουχιών, οι οποίες αναμενόταν να είναι Υ-ειδικές.

Για περαιτέρω ανάλυση επιλέχθηκε μόνο η βιβλιοθήκη *MseI*. Μια από τις αλληλουχίες αυτής της βιβλιοθήκης, η C1A, είναι αρκετά όμοια με ήδη γνωστές αλληλουχίες του *Bactrocera oleae* καθώς και άλλων ειδών του γένους *Bactrocera*. Πιο συγκεκριμένα, η C1A είναι όμοια με τις αλληλουχίες άλλων γονιδιακών περιοχών, όπως είναι αυτή της

αλληλουχίας του προαγωγέα των γονιδίων *onoA* και *onoB* του *Bactrocera oleae*.

Συγκριτικά με την *Drosophila*, ο δάκος εμφανίζει βιοχημικές και μορφολογικές διαφορές κατά την ωγένεση (Trougamos et al., 1999), αλλά ομοιότητες στη δυναμική της ακτίνης (actin dynamics) (Nezis et al., 2001). Το γονίδιο *ono* είναι ο βασικός καθοριστής της ωγένεσης στη Μεσογειακή μύγα. Στην *Drosophila*, το γονίδιο *ono* ανήκει στο σύμπλεγμα γονιδίων *ono/shavenbaby (svb)* (Mével-Ninio et al., 1991). Τα γονίδια *ono/svb* έχουν εντοπιστεί και στο *Bactrocera oleae*, παρόλο που αυτά τα δυο είδη βρίσκονται φυλογενετικά μακριά (*Diptera*). Αυτό αποδεικνύει τη σημαντικότητα των γονιδίων στην οργάνωση του γονιδιώματος και στο πολύπλοκο πρότυπο μεταγραφής της αναπαραγωγικής σειράς και αποκαλύπτει το λόγο που διατηρήθηκαν τα γονίδια αυτά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης (Khila et al., 2003).

Στη *Drosophila*, τα γονίδια *ono/svb* κωδικοποιούν την οικογένεια των μεταγραφικών παραγόντων C₂H₂ zinc- finger (δάκτυλα ψευδαργύρου) που απαιτούνται για την ανάπτυξη της αναπαραγωγικής σειράς και της επιδερμίδας. Το γονίδιο *ono* απαιτείται ειδικά για την επιβίωση και σωστή διαφοροποίηση της θηλυκής γαμετικής αναπαραγωγικής σειράς (Busson et al., 1983 και Oliver et al., 1987) και το γονίδιο *svb* απαιτείται κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης για τη δημιουργία της κορυφαίας ακρολοφίας στα επιδερμικά εμβρυικά κύτταρα (trichome patterning) (Payre et al., 1999; Wieschaus et al., 1984). Κατά την ωγένεση, υπάρχουν εναλλακτικοί προαγωγείς που παράγουν δυο διαφορετικά μετάγραφα του γονιδίου *ono*. Τα μετάγραφα αυτά, τα *Ono-A* και *Ono-B* είναι δυο ισομορφές του γονιδίου και έχουν ανταγωνιστική δράση (Andrews et al., 2000 και Mével-Ninio et al., 1996). Η ισομορφή *Ono-B* ενεργοποιείται στο αρχικό στάδιο της ωγένεσης και προωθεί την ανάπτυξη της γαμετικής σειράς (Andrews et al., 2000; Mével-Ninio et al., 1996). Ο μεταγραφικός

παράγοντας *Ono-A* έχει δράση καταστολέα και ενεργοποιείται στα τελικά στάδια της ωγένεσης (Andrews et al., 2000).

Ορθόλογα του συμπλέγματος των γονιδίων *ono/svb* έχουν εντοπιστεί σε άλλα μετόζωα, όπως είναι το *Caenorhabditis elegans* (Johnson et al., 2001) καθώς και σε σπονδυλωτά (Chidambaram et al., 1997, Dai et al., 1998 και Masu et al., 1998).

Το γεγονός λοιπόν ότι βρέθηκε η αλληλουχία C1A να παρουσιάζει ομολογία με τον προαγωγέα του γονιδίου *ono*, ένα γονίδιο που παίζει ρόλο στην ωγένεση, αυξάνει τις πιθανότητες της αλληλουχίας να είναι Υ – ειδική. Φαίνεται, δηλαδή, ένας πιθανός ρόλος της αλληλουχίας C1A στο να συμμετέχει ή να αποτελεί μέρος μεταγραφικών παραγόντων που δρουν ως αρρενό- καθοριστικοί παράγοντες.

Η παρουσία όμοιων αλληλουχιών με το C1A, διασκορπισμένων στο γονιδίωμα του *Bactrocera oleae*, επιβεβαιώθηκε μέσω της ανάλυσης κατά Southern· εμφανίστηκε ένα πρότυπο ζωνώσεων τόσο στο DNA των αρσενικών ατόμων όσο και σε αυτό των θηλυκών. Παρόλο που χρησιμοποιήθηκε η ίδια ποσότητα του γονιδιωματικού DNA για την ανάλυση (5 μg), στην περίπτωση των αρσενικών το σήμα της υβριδοποίησης εμφάνισε μεγαλύτερη ένταση. Αυτό το δεδομένο θεωρήθηκε ενδεικτικό του γεγονότος ότι, μολονότι παρουσιάζονται σε όλο το γονιδίωμα, αυτές οι αλληλουχίες έχουν συσσωρευτεί στο χρωμόσωμα Υ του *Bactrocera oleae*.

Οι εκκινητές C1Af και C1Ag σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να ενισχύουν μια εσωτερική αλληλουχία της C1A, μεγέθους 188 bp και να μην περιλαμβάνουν τις αλληλουχίες που εμφάνισαν ομοιότητα μετά από ανάλυση με το πρόγραμμα Blastn με ήδη γνωστούς γενετικούς τύπους. Πράγματι, ο εκκινητής C1Ag βρέθηκε να είναι ειδικός για την μοναδική αλληλουχία C1A, όπως δείχθηκε στις στοιχίσεις. Λόγω του γεγονότος αυτού, εικάστηκε ότι το προϊόν της ενίσχυσης μέσω PCR του γενωμικού DNA θα μπορούσε να προέρχεται μόνο από τα αρσενικά άτομα. Η

αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) στο γονιδιωματικό DNA στα αρσενικά και θηλυκά άτομα του στελέχους του Ισραήλ επιβεβαίωσε ότι οι εκκινητές C1Af και C1Ar λειτουργούν μόνο στο αρσενικό γενωμικό DNA και, επομένως, πιθανόν μόνο στο χρωμόσωμα Y. Ωστόσο το μοτίβο της ενίσχυσης δεν περιλάμβανε μόνο τη ζώνη των 188 bp, αλλά ένα πρότυπο ζωνώσεων. Η ανάλυση της αλληλουχίας αυτών των ζωνών αποκάλυψε ότι ήταν πολλαπλάσιου μοριακού βάρους της αλληλουχίας των 188 bp. Επομένως, στο χρωμόσωμα Y του *Bactrocera oleae*, η αλληλουχία των 188 bp είναι μια εν σειρά (in tandem) επανάληψη. Δεδομένου ότι το μεγαλύτερο μέρος του Y χρωμοσώματος αποτελείται από επαναλαμβανόμενα μεταθετά στοιχεία, το πρότυπο των πολλαπλάσιων ζωνών αποτελεί άλλο ένα ενδεικτικό στοιχείο που ενισχύει την άποψη ότι πραγματικά η αλληλουχία C1A προέρχεται από το Y χρωμόσωμα.

Στο τελικό στάδιο, η μέθοδος της μοριακής ανίχνευσης του φύλου εξετάστηκε σε τέσσερα διαφορετικά στελέχη του *Bactrocera oleae*, δείχνοντας ότι η μέθοδος αυτή είναι ευρέως αξιοποιήσιμη για αυτό το είδος καθώς επιτρέπει τον καθορισμό του φύλου σε ένα δείγμα, ανεξάρτητα από τη γεωγραφική προέλευσή του.

Εν κατακλείδι, στην συγκεκριμένη μελέτη παρουσιάζεται μια πρώτη μέθοδος μοριακής ανίχνευσης του φύλου του *Bactrocera oleae* βασιζόμενη στην παρουσία της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας C1A στο χρωμόσωμα Y.

Βιβλιογραφία

Βιβλιογραφία

- Amrein H., Gorman M. and Nothiger R., "The sex determining gene *tra-2* of *Drosophila* encodes a putative RNA binding protein", *Cell* 55: 1025–1035 (1988).
- Andrews J., Garcia-Estefania D., Delon I., Lu J., Mevel-Ninio M., Spierer A., Payre F., Pauli D., Oliver B., "OVO transcription factors function antagonistically in the *drosophila* female germline", *Development* 127, 881–892 (2000).
- Anleitner J. and Haymer DS, "Y enriched and Y specific DNA sequences from the genome of the mediterranean fruit fly, *C.capitata*", *Chromosoma* 101, 271-278 (1992).
- Augustinos A, Stratikopoulos E, Drosopoulou E, Kakani E, Mavragani-Tsipidou P, Zacharopoulou A and Mathiopoulos K, "Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family", *BMC Genomics* 2008
- Baker W.K., "Crossing over in heterochromatin", *Am. Nat.* 92:9–60 (1958).
- Baruffi L., Damiani G., Guglielmino CR, Bandi C., Malacrida AR, Gasperi G., "Polymorphism within and between populations of *Ceratitidis capitata*: comparison between RAPD and multilocus enzyme electrophoresis data", *Heredity*, 74 (Pt 4): 425-437 (1995).
- Barton N.H., "Linkage and the limits to natural selection", *Genetics* 140, 821-841 (1995).
- Bedo D.G., "Polytene chromosome mapping in *C.capitata* (Diptera: Tephritidae)", *Genome* 29, 598-611 (1987).
- Bedo D.G. and Webb G.C., "Conservation of nucleolar structure in polytene tissues of *Ceratitidis capitata*", *Chromosoma* 98, 443-449(1989).
- Berg D. E. and M. M. Howe, "Mobile DNA", American Society of Microbiology, Washington, DC (1989).
- Bielinska B., Lu Jining,, Sturgill D. and Oliver B., " Core Promoter Sequences Contribute to *ovo-B* Regulation in the *Drosophila melanogaster* Germline", *Genetics Society of America* (2005)
- Boggs R.T., Gregor P., Idriss S., Belote,J.M. and McKeown M., "Regulation of sexual differentiation in *D. melanogaster* via alternative splicing of RNA from the *transformer* gene", *Cell* 50: 739–747 (1987).
- Brogna S., Benos P.V., Gasperi G., Savakis, C., "The *Drosophila* alcohol

- dehydrogenase gene may have evolved independently of the functionally homologous medfly, olive fly, and flesh fly genes", *Mol. Biol. Evol.* 18, 322–329 (2001).
- Bull J. J., "Evolution of sex determining mechanisms", Menlo Park, CA: Benjamin Cummings (1983).
- Busson D., Gans M., Komitopoulou K., Masson M., "Genetics analysis of three dominant female-sterile mutations located on the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*", *Genetics* 105, 309–325 (1983).
- Carvalho A. B., B. A. Dobo, M. D. Vibranovski and A. G. Clark, " Identification of five new genes on the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*", *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* 98:13225–13230 (2001).
- Carvalho, A. B., B. P. Lazzaro and A. G. Clark, "Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:13239–13244 (2000).
- Charlesworth, "Model for evolution of Y chromosomes and dosage compensation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 5618-5622 (1978).
- Charlesworth B. and C. H. Langley, "The population genetics of *Drosophila* transposable elements", *Annu. Rev. Genet.* 23:251–287 (1989).
- Charlesworth, B., Morgan, M. T. & Charlesworth, D., "The effect of deleterious mutations on neutral molecular variation", *Genetics* 134, 1289-1303 (1993).
- Charlesworth B., Sniegowski P. and Stephan W., "The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes", *Nature* 371, 215-220 (1994).
- Charlesworth, B., "The effect of background selection against deleterious alleles on weakly selected, linked variants", *Genet. Res.* 63, 213-228 (1994).
- Charlesworth, B., P. Jarne, and S. Assimakopoulos, "The distribution of transposable elements within and between chromosomes in a population of *Drosophila melanogaster*" (1994)
- Charlesworth B., "The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation", *Curr. Biol.* 6, 149-162 (1996).
- Charlesworth D. and Guttman D. S., "The evolution of dioecy and plant sex chromosome systems. In *Sex determination in plants*", (ed. C. C. Ainsworth), pp. 25-49. London: Society for Experimental Biology (1999).
- Charlesworth Brian and Charlesworth Deborah, "The degeneration of Y chromosomes", *UK Genetica* 102/103, 409-420 (2000).

- Chidambaram A., Allikmets R., Chandrasekarappa S., Guru S.C., Modi W., Gerrard B., Dean M., "Characterization of a human homolog (OVOL1) of the *Drosophila* ovo gene, which maps to chromosome 11q13", *Mamm Genome* 8, 950–951 (1997).
- Dai X., Schonbaum C., Degenstein L., Bai W., Mahowald A., Fuchs E., "The ovo gene required for cuticle formation and oogenesis in flies is involved in hair formation and spermatogenesis in mice", *Genes Dev.* 12, 3452–3463 (1998).
- Demetzos Nikistratos, "ΠΡΟΛΗΨΗ ΚΑΙ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ ΣΤΑ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΑ", (2005).
- Donnison I.S., Siroky J., Vyskot B., Saedler H., Grant S.R., "Isolation of Y chromosome-specific sequences from *Silene latifolia* and mapping of male sex-determining genes using Representational Difference Analysis", *Genetics* 144:1893-1901 (1996).
- Douglas LJ, Untalan PM, Haymer DS., "Molecular sexing in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*", *Insect Biochem Mol Biol.* 34(2):159-165 (2004).
- Dubendorfer, Hilfiker-Kleiner and Nöthiger, "Sex determination mechanisms in dipteran insects: the case of *Musca domestica*", *Semin.Dev.Biol.* (1992).
- Fisher R. A., "The genetical theory of natural selection", Oxford University Press (1930).
- Finnegan D.J., "Eukaryotic transposable elements and genome evolution", *Trends Genet.* 5:103–107 (1989).
- Economopoulos P. and Loukas M., "ADH allele frequency changes in olive fruit flies shift from olives to artificial larval food and vice versa, effect of temperature", *Ento mol.Exp.Appl.* 40, 21
- Fernando and Melnick, "Molecula sexing eutherian mammals", *Molec.Ecol., Notes*1, 350-353 (2001)
- Gordo and Charlesworth B., "On the speed of Muller's ratchet", *Genetics* (2001). 5-221 (1986).
- Griffiths R., Double M.C, Orr K. and Dawson RJG, "A DNA test to sex most birds", *Molec.Ecol.*7, 1071-1076 (1998).
- Hendrichs J., G. Ortiz, P. Liedo and A.Schwarz, "Six years of successful medfly program in Mexico and Guatemala, in CEC/IOBC International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance", edited by Economopoulos, Athens, Greece (1983).
- Hendrichs J., Franz G. and Rendon P., "Increased effectiveness and applicability of the Sterile Insect Technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit-flies during fruiting season", *J Appl Entomol* 119: 371–377 (1995).

- Hilliker A. J., R. Appels and A. Schalet, "The genetic analysis of *D. melanogaster* heterochromatin", *Cell* 21:607–619 (1980).
- Hoshijima K., Inoue K., Higuchi I., Sakamoto H. and Shimura Y., " Control of *doublesex* alternative splicing by *transformer* and *transformer-2*", *Drosophila Sci* 252: 833–836 (1991).
- Hurles ME and Jobling MA, "Haploid chromosomes in molecular ecology: lessons from the human Y", *Molec.Ecol.*10, 1599-1613 (2001).
- Johnson A.D., Fitzsimmons D., Hagman J., Chamberlin H.M., "EGL-38 Pax regulates the ovo-related gene *lin-48* during *Caenorhabditis elegans* organ development", *Development* 128, 2857–2865 (2001).
- Junakovic N., A. Terrinoni C. Di Franco, C. Vieira and C. Loevenbruck, "Accumulation of transposable elements in the heterochromatin and on the Y chromosome of *Drosophila simulans* and *Drosophila melanogaster*", *J. Mol.Evol.* 46:661–668 (1998).
- Inoue K., Hoshijima K., Sakamoto H. and Shimura Y., "Binding of the *Drosophila* Sex-lethal gene product to the alternative splice site of *transformer* primary transcript", *Nature* 344: 461–463 (1990).
- Katsoyannos P., "Olive pests and their control in the Near East.", *FAO Paper* (1992).
- Khila A , Haidani A, Vincent A, Payre F, Souda Saad Ibn, "The dual function of *ovo/shavenbaby* in germline and epidermis differentiation is conserved between *Drosophila melanogaster* and the olive fruit fly *Bactrocera oleae*", *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33 691–699 (2003).
- Krzywinski J, Nusskern D.R., Kern Marcia K. and Besansky Nora J., "Isolation and Characterization of Y Chromosome Sequences From the African Malaria Mosquito *Anopheles gambiae*", *Genetics Society of America* (2004).
- Lagos D., Ruiz M.F., Sánchez L. and Komitopoulou K., "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 (2005).
- Lai S. Janice, "DNA sequences differentially represented in males and females of the oriental fruit fly *Bactrocera dorsalis*", *University of Hawaii*, (2002).
- Lahn B. T. & Page, D. C., "Four evolutionary strata on the human X chromosome" *Science* 286, 964-967 (1999).
- Lewis D., "The evolution of sex in flowering plants", *Biol. Rev.* 17, 46-67 (1942).
- Lisitsyn Nikolai, Lisitsyn Natalya, Wigler Michael, "Cloning the Differences Between

- Two Complex Genomes.", *Science* Vol. 259 (1993).
- Lisitsyn Nikolai, Lisitsyn Natalya, Wigler Michael, "Cloning the Differences Between Two Complex Genomes", *Science* Vol. 259 (1999).
- Lucchesi J. C., "Gene dosage compensation and the evolution of sex chromosomes" *Science* 202, 711-716 (1978).
- Mavragani-Tsipidou P., Karamanlidou, G., Zacharopoulou A., Koliais S., Kastritsis C., "Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae)", *Genome* 35, 373–378 (1992).
- Mazi V., Cosmidis N., Loukas M., Clonis Y., Zouros E., "Biochemical differences between products of the ADH locus in olive fruit fly (*Bactrocera oleae*)", *Biochem. Genet.* 36, 259–269 (1998).
- Masu Y., Ikeda S., Okuda-Ashitaka E., Sato E., Ito S., "Expression of murine novel zinc finger proteins highly homologous to *Drosophila* ovo gene product in testis", *FEBS Lett.* 421, 224–228 (1998).
- McDonald J.F., "Transposable elements and evolution", Kluwer, Dodrecht, The Netherlands (1993).
- McVean G. A. T. and Charlesworth B., "The effects of Hill Robertson interference between weakly selected mutations on patterns of molecular evolution and variation", *Genetics* 155, 929-944 (2000).
- Mével-Ninio M., Terracol R., Kafatos F.C., "The ovo gene of *Drosophila* encodes a zinc finger protein required for female germ line development" *EMBO J.* 10, 2259–2266 (1991).
- Mével-Ninio M., Fouilloux E., Guenal I., Vincent A., "The three dominant female-sterile mutations of the *Drosophila* ovo gene are point mutations that create new translation-initiator AUG codons", *Development* 122, 4131–4138 (1996).
- Mittwoch U., "Sex chromosomes", Academic Press, New York (1967).
- Muller H. J., "Genetic variability, twin hybrids and constant hybrids in a case of balanced lethal factors", *Genetics* 3, 422-499 (1918).
- Nezis I.P., Stravopodis D.J., Papassideri I., Margaritis L.H., "Actin cytoskeleton reorganization of the apoptotic nurse cells during the late developmental stages of oogenesis in *Dacus oleae*", *Cell.Motil. Cytoskeleton* 48, 224–233 (2001).
- Nöthiger and Steinemann-Zwicky, "A single principle for sex determination in insects", *Cold Spring Harbour Symp.Quant.Biol* (1985).
- Oliver B., Perrimon N., Mahowald A.P., "The ovo locus is required for sex-specific

- germ line maintenance in *Drosophila*", *Genes Dev.* 1, 913–923 (1987).
- Pane A., Salvemini M., Bovi P.D., Polito C. and Saccone G., "The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate", *Development* 129: 3715–3725 (2002).
- Pane A., De Simone A., Saccone G. and Polito C., "Evolutionary conservation of *Ceratitis capitata* transformer gene function", *Genetics* 171: 615–624 (2005).
- Payre F., Vincent A., Carreno S., "ovo/svb integrates Wingless and DER pathways to control epidermis differentiation", *Nature* 400, 271–275 (1999).
- Peck J., "A ruby in the rubbish: beneficial mutations, deleterious mutations, and the evolution of sex", *Genetics* 137, 597-606 (1994).
- Petousis Giorgio, Σημειώσεις εργαστηρίου Μεσογειακών Δενδρωδών Καλλιέργειών (2002).
- Pimpinelli S., M. Berloco L. Fanti, P. Dimitri, S. Bonaccorsi, E. Marchetti, R. Caizzi, C. Caggese, and M. Gatti, "Transposable elements are stable structural components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:3804–3808 (1995).
- Rice W. R., "Genetic hitch-hiking and the evolution of reduced genetic activity of the Y sex chromosome", *Genetics* 116, 161-167 (1987).
- Rice W. R., "Evolution of the Y sex chromosome in animals", *Biosciences* 46, 331-343 (1996).
- Robinson A.S., "Mutations and their use in insect control", *Mutation Research* 511, 113-132 (2002).
- Rodanakis and Alissandrakis, "ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΧΡΩΜΑΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΚΩΝ ΠΑΓΙΔΩΝ ΜΕ ΕΛΚΥΣΤΙΚΑ ΤΡΟΦΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΓΙΔΕΥΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ (Bactrocera oleae GMEL) ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ".
- Saccone G., Pane A., Test G., Santoro M., de Martino, G., "Sex determination in Medfly: a molecular approach. In: *Area-Wide Control of Fruit Flies and Other Insect Pests*", (Tan, K.H., ed.), pp. 491–496. Penerbit University Sains (2000)
- Shearman D.C.A, "The evolution of sex determination systems in dipteran insects other than *Drosophila*", *Genetica* (2002).
- Solari A.J., "Sex Chromosomes and Sex Determination in Vertebrates", CRC Press Inc, Boca Raton, Florida (1994).
- Southern E.M., "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", *J Mol Biol* 98(3): 503-517 (1975).

- Steinemann M., S. Steinemann and F. Lottspeich, "How Y chromosomes become genetically inert", Proc. Natl. Acad. Sci.USA 90:5737–5741 (1993).
- Steinemann M., S. Steinemann and B. M. Turner, "Evolution of dosage compensation", Chromosome Res. 4:1–6 (1996).
- Steinemann S., and M. Steinemann, "The Amylase gene cluster on the evolving sex chromosomes of *Drosophila Miranda*" Genetics 151:151–161 (1999).
- Steinemann M. and Steinemann S., "Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution" (1998).
- Straus D. and F.M Ausubel, "Genomic Subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations", Proc. Natl. Acad. Sci.USA 87 (1889-1893) (1990).
- Trougakos I.P., Lamnissou K., Margaritis L.H., "Biochemical and immunocytochemical analysis of vitellogenesis in the olive fruit fly *Dacus (bactrocera) oleae* (Diptera: Tephritidae)", Cell Biol.Int. 23, 417–429 (1999).
- Westergaard M., "The mechanism of sex determination in flowering plants", Adv. Genet. 9, 217-281 (1958).
- Wieschaus E., Nusslein-Volhard C., Jurgens G., "Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*.III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome", Roux Arch. Dev. Biol. 193, 296–307 (1984).
- Wilkins A.S., "Moving up the hierarchy: a hypothesis on the evolution of a genetic sex determination pathway", Bioassays 17: 71–77 (1995).
- White and Elson- Harris, "Fruit pest species. Fruit flies of Economic Significance, Their identification and Bionomics", CAB International London, pp.290-298 (1992).
- Zapater M. and Robinson AS, "Sex chromosome aneuploidy in a male-linked translocation in *C.capitata*", Can.J.Genet.Cytol.28, 161-167 (1986).
- Zouros E., Loukas M., In: Robinson A.S., Hooper G.H.S. (Eds.), World Crop Pests, vol. 3B. Elsevier, Amsterdam, pp. 75–87 (1989).

