

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ
ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ
ΤΟΥ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ,
ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *BACTROCERA OLEAE*

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ
ΕΝΤΟΜΟΥ *BACTROCERA OLEAE*

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ
ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΣ - ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

|

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ
ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *ΒΑΧΤΡΟCΕΡΑ ΟΛΕΑΕ***

❖ **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος (Επιβλέπων Καθηγητής)

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

❖ **ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

Δροσπούλου Ελένη

Λέκτορας Μοριακής Βιολογίας – Κυτταρογενετικής Ζωικών Οργανισμών
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Μαυραγάνη – Τσιπίδου Πηνελόπη

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γενετικής και Κυτταρογενετικής Ζωικών Οργανισμών
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σαραφίδου Θεολογία

Λέκτορας Μοριακής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Σκούρας Ζαχαρίας

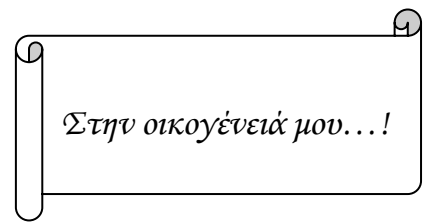
Καθηγητής Γενετικής
Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Σταθόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Βιοχημείας
Τμήμα Ιατρικής, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ
ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ ΕΝΤΟΜΟΥ *BACTROCERA OLEAE***



ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

**ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΤΟΥ
ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, ΤΟΥ
ΕΝΤΟΜΟΥ *BACTROCERA OLEAE***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**Αριθμός προκαταρκτικών σελίδων: 22
Συνολικός αριθμός σελίδων: 241
Συνολικός αριθμός πινάκων: 20
Συνολικός αριθμός εικόνων: 62
Συνολικός αριθμός παραρτημάτων: 1
Συνολικός αριθμός βιβλιογραφικών αναφορών: 288**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, προκαλεί τη μεγαλύτερη ποιοτική και ποσοτική ζημία στην ελαιοπαραγωγή. Παρά την οικονομική του σημασία, ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες σε μοριακό και γενετικό επίπεδο. Η γονιδιωματική ανάλυση του εντόμου, πέρα από τη σημασία της στη βασική έρευνα του δάκου, έχει και προεκτάσεις σε μεθόδους βιολογικού ελέγχου του εντόμου, όπως η μέθοδος του στείρου εντόμου (Sterile Insect Technique, SIT) οι οποίες προαπαιτούν την ύπαρξη βασικών μοριακών και γενετικών δεδομένων. Συνεπώς, η ανάλυση της οργάνωσης του γονιδιώματος του δάκου δύναται να συνεισφέρει προς την κατεύθυνση ανάπτυξης βασικών γνώσεων και εργαλείων για το έντομο αυτό.

Στα πλαίσια της παρούσας ανάλυσης, προσδιορίστηκε το μέγεθος του γονιδιώματος του δάκου μέσω Real-time PCR. Το μέγεθος του γονιδιώματος είναι περίπου 3.22×10^8 bp, γεγονός που το κατατάσσει στο κάτω εύρος της κλίμακας των γνωστών μεγεθών των Διπτέρων.

Επιτεύχθηκε επίσης η απομόνωση και η ταυτοποίηση 195 κλωνοποιημένων αλληλουχιών της cDNA βιβλιοθήκης του δάκου. Ο καθορισμός της αλληλουχίας αυτών των EST δεικτών έδωσε τη δυνατότητα σύγκρισής τους με άλλες ήδη γνωστές πρωτεϊνικές αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων, με αποτέλεσμα να εκτιμηθεί η λειτουργία των αντίστοιχων γονιδίων. Επιπλέον, βάσει της ομολογίας των ESTs με γονίδια της *Drosophila melanogaster* πραγματοποιήθηκε η κατηγοριοποίησή τους με όρους γονιδιακής οντολογίας (Gene Ontology) καθιστώντας εφικτή μια δυνητική εκτίμηση της οργάνωσης του τρανσκριπτόματος του εντόμου σύμφωνα με την κατανομή των ESTs σε κάθε κατηγορία.

Παράλληλα, για 35 από αυτούς τους τυχαίους EST κλώνους προσδιορίστηκε με *in situ* υβριδισμό η κυτταρογενετική θέση τους στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου, εμπλουτίζοντας τον κυτταρογενετικό χάρτη του δάκου καθώς πλέον διπλασιάζονται τα σημεία εισόδου στο γονιδίωμα. Παράλληλα διερευνήθηκε η συνταϊνιακότητα του

δάκου με τη *D. melanogaster*, καθορίζοντας κατ' αρχήν την ομολογία των χρωμοσωμικών στους στοιχείων και κατά δεύτερον τις ομολογίες των γονιδίων τους όσον αφορά τη διάταξή τους στους κυτταρογενετικούς χάρτες. Αποτέλεσμα της σύγκρισης αυτής ήταν η δημιουργία του αντίστοιχου χάρτη συνταϊνιακότητας μεταξύ των δύο οργανισμών και παράλληλα η ταυτοποίηση ορισμένων συνταϊνιακών περιοχών. Αξιοποιώντας τη διαθεσιμότητα των νέων αλληλουχιών υπολογίστηκε και η συχνότητα επιλογής των συνώνυμων κωδικονίων κατά την μεταγραφική δραστηριότητα και περαιτέρω ελέχθηκε η ύπαρξη συντηρημένου προφίλ συγκριτικά με άλλους οργανισμούς. Η συγκριτική ανάλυση της αλληλουχίας EST δεικτών του δάκου με τους αντίστοιχους γενετικούς τόπους στη *D. melanogaster* έδωσε επίσης τη δυνατότητα σχεδιασμού 17 ζευγών εκκινητών για την ενίσχυση παρεμβαλλομένων ιντρονίων (Exon Priming Intron Crossing-PCR), τη δια-ειδική εφαρμογή τους σε άλλα 11 είδη της οικογένειας Tephritidae και ακολούθως τη φυλογενετική τους σύγκριση.

Επιπλέον με τη χρήση ενός πιθανολογούμενου τμήματος ρετρομεταθετού στοιχείου (επονομαζόμενου *Achilles*) ως ανιχνευτή, αναλύθηκαν φαγικοί κλώνοι μέσω διαλογής της γονιδιωματικής λ βιβλιοθήκης του εντόμου για την απομόνωση ενός ακέραϊου αντιγράφου του ρετρομεταθετού. Η μοριακή ανάλυση των κλώνων που απομονώθηκαν και η *in silico* επεξεργασία τους, οδήγησαν στη διαλεύκανση της οργάνωσης του LTR ρετρομεταθετού *Achilles* του δάκου σύμφωνα με την αντίστοιχη δομή του ομόλογου στοιχείου MAX της *D. melanogaster*, που ανήκει στην οικογένεια BEL-Pao. Συγκεκριμένα προσδιορίστηκε συνολικά η αλληλουχία 7,487 bp που περιλαμβάνει το 5' LTR άκρο, την αλληλουχία της 5' μη κωδικής περιοχής που ακολουθεί και το πλήρες αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη gag-rol του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles*, ενώ με ποσοτική Real-time PCR καθορίστηκε ότι ο αριθμός των συνολικών του

αντιγράφων στο γονιδίωμα αντιστοιχεί σε 42. Επιπλέον διερευνήθηκε η ενεργότητα του στοιχείου, οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι δυνητικά εντοπίζεται τουλάχιστον ένα ενεργό αντίγραφο του *Achilles* στο γονιδίωμα.

Παράλληλα, κατά τη διαδικασία αναζήτησης του μεταθετού *Achilles*, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη μιας συντηρημένης κεντρομερικής δορυφορικής αλληλουχίας ~300 bp. Το επαναλαμβανόμενο αυτό στοιχείο, που ονομάστηκε BoR300, χαρακτηρίστηκε ως ειδικό για το δάκο, όπως αποδείχτηκε μετά από χρήση του σε αναλύσεις κατά Southern και άλλων συγγενικών του ειδών, γεγονός που το συνιστά έναν ανιχνευτή είδους, που θα μπορούσε να καταστεί ιδιαίτερα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στην αναγνώριση ατόμων του εντόμου, κατά το αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης ή της νύμφης, στο οποίο είναι δύσκολη η διάκριση από άλλα συγγενικά του είδη Terphritidae. Πέρα από τα τυπικά χαρακτηριστικά του, καθορίστηκε επιπλέον η συμμετοχή του στη δομή του γονιδιώματος ίση με κατά προσέγγιση ~ 0.3%, ενώ ο έλεγχος της κατανομής του στα πολυταινικά και μιτωτικά χρωμοσώματα του εντόμου, έδωσε τη δυνατότητα της πρώτης συσχέτισης μεταξύ των δύο τύπων χρωμοσωμάτων.

ABSTRACT

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, causes extensive damages in olive production. Apart from its great economic importance, little information is available at the genetic and molecular level. Genomic analysis of this insect is important not only with regard its basic research, but also due to further implications in biological control methods. Effective application of such methods, like the Sterile Insect Technique (S.I.T.), relies on the availability of fundamental genetic and molecular data. Consequently, the analysis of *B. oleae*'s genome structure may contribute towards the development of basic knowledge and tools for this insect.

In the context of the present analysis, the *B. oleae*'s genome size was determined through a quantitative Real-time PCR approach. Genome size was estimated at about 3.22×10^8 bp, which places it at the lower end of the dipteran genome size range.

The isolation and characterization of 195 selected cDNA clones was also achieved. The sequence determination of these ESTs allowed further comparisons with known protein sequences deposited in the database and consequently the corresponding genes were characterized. In addition, based on *D. melanogaster* matches, the ESTs were functionally assigned and classified with Gene Ontology terms, allowing a primary estimation of the insect's transcriptome organization according to the ESTs' distribution to each functional category.

Moreover, the exact cytogenetic localization of 35 EST clones was determined by *in situ* hybridization to the insect's polytene chromosomes, enriching the available physical map with more than double entry points.

Additionally, the synteny between *B. oleae* and *D. melanogaster* was also explored, firstly by demonstrating the colinearity of the chromosomal segments between the two species and secondly by the examination of the respective chromosomal positions among the mapped ESTs and their *Drosophila* orthologs. As a consequence, a synteny

map of the two species was produced, enabling also the identification of some syntenic blocks.

Taking advantage of the availability of these new sequences, the overall codon frequencies of the active transcriptome were calculated, in order to examine the presence of a conserved profile. The comparative sequence analysis of the *B. oleae* ESTs with the homologous *D. melanogaster* genes led to the development of 17 nuclear EPIC-PCR markers (Exon Priming Intron Crossing-PCR). These markers were used for the amplification of the corresponding intron sequences in 11 Tephritids, which were subsequently used for phylogenetic comparisons.

Additionally, with the use of a segment of a putative LTR retrotransposon (named *Achilles*) as a probe, a *B. oleae* genomic library was screened and several phage clones were analyzed in order to isolate an intact copy of the retrotransposon. Molecular and *in silico* analysis of the isolated clones led to the clarification of the *B. oleae*'s LTR retrotransposon *Achilles* organization, according to the respective structure of the homologous element *MAX* of *D. melanogaster*, which belongs to the BEL-Pao family. More specifically, the *Achilles* sequence was determined at about 7,487 bp, consisting of the 5' LTR end, the 5' non coding sequence and the open reading frame (ORF) which encodes the polyprotein gag-pol. In a quantitative Real-time PCR approach the element's copies were calculated at about 42 copies per genome. Moreover the activity of the element was examined, demonstrating the presence of at least one active copy of *Achilles* in the genome.

During the analysis of *Achilles* containing phage clones, a conserved centromeric satellite sequence of about ~ 300 bp was also discovered. This tandem repeat, named BoR300, was species specific, as determined by Southern analysis on several related species. This finding can render it a species diagnostic marker, particularly of the morphologically indistinguishable larval and pupal stages of several closely related species of the

Tephritidae family. Finally, BOR300 was estimated to occupy ~ 0.3 % of the insect's genome, whereas the examination of its distribution on polytene and mitotic *B. oleae* chromosomes enabled the first correlation between these two types of chromosomes, concerning 2 out of the six autosomes.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η περιπετειώδης και πολύχρονη αυτή διαδρομή που λέγεται διδακτορική διατριβή ξεκίνησε για μένα στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής, του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Κοιτάζοντας πίσω στο χρόνο, θα την παραλλήλιζα σαν μια «Οδύσσεια», με δυσκολίες που δεν φανταζόμουν στην αρχή, που όμως με παρόπλισε με ωριμότητα, τόσο επιστημονική όσο και προσωπική..., για να φτάσω τελικά στη δική μου Ιθάκη!

Η πρώτη σελίδα αυτού του κειμένου, είναι ουσιαστικά η τελευταία σελίδα σε αυτή την προσπάθεια! Αλλά εξίσου σημαντική με όσα «επιστημονικά» αναλύονται παρακάτω!

Ίσως και ανάλογης δυσκολίας, όσο και αν δε φαίνεται! Πώς να περιγράψεις άλλωστε με λέξεις την ευγνωμοσύνη σου σε όλους αυτούς τους ανθρώπους που σε επιστημονικό και ηθικό επίπεδο συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της δημιουργικής αλλά και επίπονης πορείας! Δεν περίμενα να αναβοσβήνει ο κέρσορας στην οθόνη προσπαθώντας μέσα από αυτές τις γραμμές να εκφραστώ για το ταξίδι αυτό και τους συνταξιδιώτες μου! Που υπήρξαν πολλοί, γι' αυτό εκ των προτέρων ας με συγχωρήσουν κάποιοι αν τους λησμονήσω!

Ο πρώτος άνθρωπος που θα αναφερθώ είναι ο Κώστας Μαθιόπουλος. Ως πραγματικός ακαδημαϊκός δάσκαλος συνέβαλε στη διαμόρφωση των προτύπων σκέψης μου, όλα αυτά τα χρόνια που έχω τη χαρά να δουλεύω μαζί του. Η διαρκής του αναζήτηση και η αγάπη του για την έρευνα εμπνέουν κάθε νέο επιστήμονα που θα βρεθεί κοντά του. Οι χρήσιμες συμβουλές, η καθοδήγηση και η συνεχής ευθάρρυνσή του ήταν καθοριστικές καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διατριβής, όπως επίσης και οι ουσιαστικές παρεμβάσεις του κατά τη συγγραφή της. Φυσικά δεν θα μπορούσα να παραλείψω την ανεξάντλητη αισιοδοξία του, ιδιαίτερα σε περιόδους που οι πειραματικές αντιξοότητες με αποθάρρυναν! Τον ευχαριστώ ολόψυχα για την ευκαιρία που μου έδωσε και την εμπιστοσύνη του σε αυτό το εγχείρημα!

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους δασκάλους μου και συνεπιβλέποντες ως μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής κ. Ζήση Μαμούρη και κ. Κώστα Σταθόπουλο, για τις πολύτιμες συμβουλές και εύστοχες παρατηρήσεις τους κατά την παρακολούθηση της εξέλιξης της παρούσας διατριβής και το ενδιαφέρον τους κατά την εκπόνησή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά συνολικά τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής μου την κ. Δροσοπούλου Ελένη, τον κ. Μαμούρη Ζήση, την κ. Μαυραγάνη –Τσιπιδου Πηνελόπη, την κ. Σαραφίδου Θεολογία, τον κ. Σκούρα Ζαχαρία και τον κ. Σταθόπουλο Κώστα για το χρόνο που διέθεσαν για την ανάγνωση και κρίση της διατριβής, αλλά και για την παρουσία τους κατά την υποστήριξη της στην καυτή Λάρισα!

Ιδιαίτερα νιώθω την υποχρέωση να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην κ. Πηνελόπη Μαυραγάνη – Τσιπιδου για τη φιλοξενία στο εργαστήριο της και την υπομονή της να μου υποδείξει τα «μυστικά» των χρωμοσωμάτων του δάκκου όπως επίσης και την κ. Ελένη Δροσοπούλου, χωρίς τη συμβολή των οποίων θα ήταν αδύνατη η διεξαγωγή των κυτταρογενετικών πειραμάτων.

Τα κυρίαρχα μέλη της καθημερινότητας μου στο εργαστήριο όλα αυτά τα χρόνια, τους συναδέλφους και συνεργάτες Δρ Εύη Κακάνη και τον υποψήφιο διδάκτορα Νίκο Ζυγουρίδη, που συνέβαλλαν στο φιλικό και δημιουργικό περιβάλλον! Αμέτρητες οι ώρες που μοιραστήκαμε, άπειρες οι απόψεις που ανταλλάξαμε! Τον Δρ Αντώνη Αυγουστίνο, αν και «ημερολογιακά» μη μόνιμο μέλος του εργαστηρίου, για την προθυμία του σε ότι χρειάστηκε και τη συμβολή του στο σχεδιασμό των ΕΡIC δεικτών και τα εποικοδομητικά του σχόλια. Την υποψήφια διδάκτορα Μαρία-Ελένη Τρηγορίου για τη συνδρομή της στις τελευταίες πειραματικές πιναελίες!

Ένα ιδιαίτερο ευχαριστώ στην εργαστηριακή μου «μητέρα», την Δρ Εύη Κακάνη, για την πολύτιμη βοήθειά της επιστημονική και μη, από τα πρώτα μου βήματα σ' αυτό το χώρο. Η παρουσία της, αν και υπερατλαντικά πλέον κατά τη διάρκεια της συγγραφής, ήταν καταλυτική παρέχοντας μου το απαραίτητο – αλλά μη προσβάσιμο από εμένα – βιβλιογραφικό υλικό, από τη νέα εργαστηριακή της στέγη. Ευχαριστώ λοιπόν και το Πανεπιστήμιο του Harvard για την έμμεση διευκόλυνση!

Παρελθόντα και παρόντα μέλη του εργαστηρίου, που άμεσα ή έμμεσα συνέβαλαν σε αυτή την προσπάθεια. Στο σημείο αυτό θέλω επίσης να αναφερθώ και σε όλους τους συναδέλφους του τμήματος, για την καλή διάθεση και συνεργασία όποτε χρειάστηκε.

Φυσικά σε όλο αυτό το ταξίδι, πέραν του εργαστηρίου, οι φίλοι μου ήταν το λιμάνι μου! Αγχολυτικοί και συμπαραστάτες, μου έδωσαν τη δυνατότητα όλα αυτά τα χρόνια να μην είναι μονότονα, συνδυάζοντας τον χρόνο τους και τις επιλογές τους με τους δικούς μου αναγκαστικούς πολλές φορές περιορισμούς! Ιδιαίτερα, νιώθω τυχερή για όλες τις στιγμές που μοιράστηκα με τις συναδέλφους αλλά προπάντων επιστήθιες και ανιδιοτελείς φίλες Γκέλυ Τσουκαλά, Εύη Κακάνη και Ζαχαρούλα Κυριακοπούλου! Μου λείψανε πολύ στη μοναχική διαδρομή της συγγραφής!

Ένα ευχαριστώ είναι λίγο στον σύντροφό μου Γιάννη που με εμπύχωνε όταν έχανα την αυτολεπείθησή μου από την κούραση και που κρατούσε ζωντανά τα όνειρα! Η δική μου Ιθάκη, ήρθε κοντύτερα χάρη στη δική του υπομονή και υποστήριξη!

Τις τελευταίες αυτές γραμμές θέλω να τις αφιερώσω στην οικογένειά μου! Στους λατρεμένους μου γονείς Τηλέμαχο και Αλέκα που πάντα στήριζαν και στηρίζουν τις επιλογές μου ηθικά και υλικά και μου έδωσαν τη δυνατότητα να κάνω αυτό το παραπάνω βήμα! Η αγάπη τους και η κατανόησή τους με όπλιζε με δύναμη να συνεχίσω! Και φυσικά στα αδέρφια μου, Θωδωρή και Δημήτρη, που με έκαναν να γελά και να κλέβω λίγη από την ενέργειά τους! Δημήτρη συγγνώμη που όλα αυτά τα χρόνια δεν ήμουν κοντά σου! Με μια φράση, τους οφείλω λιτά και απέρριπτα..... ΤΑ ΠΑΝΤΑ!

Λάρισα, Ιούνιος 2012

Κωνσταντίνα Τσουμάνη

«Από τότε που κουράστηκα να ψάχνω,
έμαθα να βρίσκω!

Και από τότε που ο άνεμος μου εναντιώθηκε,
έμαθα να σαλπάρω με όλους τους ανέμους...»

Φοήντιχ Νίτσε

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	VII
ABSTRACT	IX
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	XI
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	XVIII
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	XXI
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	3
1.2 Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	4
1.2.1 Οικονομική σημασία, προέλευση, εξάπλωση.....	4
1.2.2 Μορφολογία	5
1.2.3 Βιολογικός κύκλος	6
1.2.4 Προκαλούμενη ζημία.....	7
1.2.5 Διαχείριση, καταπολέμηση	8
1.3 ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟ ΔΑΚΟ	12
1.3.1 Δομή μιτωτικών χρωμοσωμάτων	12
1.3.2 Μιτωτικά χρωμοσώματα στο δάκο	13
1.3.3 Προέλευση και δομή πολυταινικών χρωμοσωμάτων.....	14
1.3.4 Πολυταινικά χρωμοσώματα στο δάκο	15
1.3.5 Δομή Υ χρωμοσώματος	16
1.4 ΜΟΡΙΑΚΗ & ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ.....	17
1.5 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	18
1.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	18
1.6.1 Μέγεθος και πολυπλοκότητα του γονιδιώματος.....	19
1.6.2 Οργάνωση γονιδιώματος	20
1.6.3 Κατανομή & ταξινόμηση γονιδίων	21
1.6.4 Μεταθετά Στοιχεία	21
1.6.4.1 DNA τρανσποζόνια	23
1.6.4.2 Ρετροτρανσποζόνια μη-LTR	23
1.6.4.3 LTR ρετροτρανσποζόνια	23
1.6.5 Κατανομή και ρόλος μεταθετών στοιχείων.....	24
1.6.6 Δορυφορικό DNA.....	29
1.6.7 Ρόλος δορυφορικού DNA	30
1.7 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ	32

1.7.1	Γενετικοί χάρτες.....	32
1.7.2	Φυσικοί χάρτες.....	33
1.7.3	Δείκτες χαρτογράφησης.....	33
1.7.4	Ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs).....	34
1.8	ΣΚΟΠΟΣ.....	36
2	ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ.....	37
2.1	ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ.....	39
2.1.1	Τεχνητή εκτροφή εντόμου <i>B. oleae</i>	39
2.1.1.1	Ενήλικα άτομα.....	39
2.1.1.2	Υπόστρωμα ωτοκίας.....	39
2.1.1.3	Συλλογή αυγών.....	39
2.1.1.4	Προνυμφικό στάδιο.....	39
2.1.1.5	Νυμφικό στάδιο.....	40
2.1.2	Ανάπτυξη βακτηρίων.....	40
2.1.2.1	Ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα.....	40
2.1.2.2	Ανάπτυξη σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα.....	40
2.2	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	41
2.2.1	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα <i>Bactrocera oleae</i>	41
2.2.2	Απομόνωση ολικού RNA από ενήλικα άτομα <i>Bactrocera oleae</i>	41
2.2.3	Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση.....	42
2.3	ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ.....	43
2.3.1	Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο.....	43
2.3.2	Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη.....	44
2.3.3	Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων.....	44
2.3.3.1	Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός.....	44
2.3.3.2	Ηλεκτροφορητικός προσδιορισμός.....	44
2.3.4	Κατάτμηση DNA με ένζυμα περιορισμού.....	45
2.3.4.1	Πλήρης κατάτμηση.....	45
2.3.4.2	Μερική κατάτμηση.....	45
2.3.4.3	Πρωτόκολλο συνδυασμού πλήρους & μερικής κατάτμησης για χαρτογράφηση.....	46
2.3.5	Δημιουργία διαδοχικών ελλείψεων με χρήση εξωνουκλεάσης.....	47
2.3.6	Σχηματισμός δίκλωνων προσαρμογών DNA.....	48
2.3.7	Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	48
2.3.8	Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	49

2.4	ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ.....	50
2.4.1	Προετοιμασία πλασμιδιακού φορέα για κλωνοποίηση	50
2.4.1.1	Αποφωσφορυλίωση φορέα	50
2.4.1.2	Προσθήκη T- άκρων	51
2.4.2	Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA.....	51
2.4.3	Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση	52
2.4.3.1	Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση.....	52
2.4.3.2	Μετασχηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση	53
2.4.4	Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων	53
2.5	ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ-DASH®II – ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ	54
2.5.1	Βακτηριοφάγος λ-DASH®II (Stratagene).....	54
2.5.2	Επιμόλυνση βακτηριοφάγου λ σε στερεή καλλιέργεια	55
2.5.2.1	Προετοιμασία βακτηρίων-ξενιστών του βακτηριοφάγου λ.....	55
2.5.2.2	Επίστρωση βακτηριοφάγων λ σε στερεό υπόστρωμα (plating cells)	55
2.5.2.3	Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ.....	56
2.5.2.4	Τιτλοδότηση φαγικού αναιωρήματος.....	56
2.5.3	Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε στερεό υπόστρωμα.	57
2.5.4	Απομόνωση βακτηριοφάγου λ – εξαγωγή DNA.....	57
2.5.4.1	Παρασκευή λυτικού εναιωρήματος βακτηριοφάγων λ.....	57
2.5.4.2	Απομόνωση βακτηριοφάγου λ.....	58
2.5.4.3	Εξαγωγή DNA βακτηριοφάγου λ.....	58
2.6	ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ-ZAP – cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ	59
2.6.1	Βακτηριοφάγος λ-ZAP Express®II (Stratagene)	59
2.6.2	Προετοιμασία βακτηρίων-ξενιστών του βακτηριοφάγου λ-ZAP και φαγεμιδίων pBK-CMV.59	
2.6.3	<i>In vivo</i> μαζική εκτομή ενθεμάτων από φορέα λ-ZAP	59
2.7	ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	60
2.7.1	Συμβατική PCR (Conventional PCR) τελικού σημείου	60
2.7.2	PCR μεγάλου μήκους (Long PCR).....	62
2.7.3	PCR Αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription RT-PCR).....	62
2.7.3.1	Σύνθεση cDNA	62
2.7.3.2	Ενίσχυση του cDNA με PCR	63
2.7.4	PCR πραγματικού χρόνου με SYBR Green I (Real-Time PCR)	63
2.7.4.1	Ανίχνευση και ανάλυση προϊόντων Real-Time PCR	64
2.8	ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ	65

2.8.1	Σήμανση ανιχνευτών	65
2.8.1.1	Σήμανση DNA ανιχνευτών με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων	65
2.8.1.2	Σήμανση RNA ανιχνευτών με in vitro μεταγραφή	66
2.8.1.3	Σήμανση ανιχνευτών με διγοξιγενίνη	66
2.8.1.4	Σήμανση ανιχνευτών με βιοτίνη για FISH	67
2.8.2	Ανάλυση κατά Southern	67
2.8.2.1	Μεταφορά σε νάilon μεμβράνη	67
2.8.2.2	Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνες.....	68
2.8.2.3	Απομάκρυνση του ανιχνευτή	69
2.8.2.4	Ανίχνευση σήματος	69
2.8.3	Διαλογή βιβλιοθήκης.....	70
2.8.3.1	Μεταφορά των πλακών των βακτηριοφάγων λ σε νάilon μεμβράνη.....	70
2.8.4	<i>In situ</i> υβριδισμός	71
2.8.4.1	Κατασκευή πολυταινικών χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων	71
2.8.4.2	Προετοιμασία παρασκευασμάτων πολυταινικών χρωμοσωμάτων για υβριδισμό	71
2.8.4.3	Υβριδισμός σε χρωμοσωμικά παρασκευάσματα	72
2.8.4.4	Ανίχνευση σήματος	72
2.8.5	Φθορίζων <i>in situ</i> υβριδισμός (FISH)	73
2.8.5.1	Κατασκευή μιτωτικών χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων	73
2.8.5.2	Προετοιμασία παρασκευασμάτων για υβριδισμό FISH.....	73
2.8.5.3	Υβριδισμός FISH.....	74
2.8.5.4	Ανίχνευση σήματος FISH	75
2.8.5.5	Χρώση χρωμοσωμάτων με DAPI	75
2.9	<i>In silico</i> ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	76
2.9.1	Ανάκτηση δεδομένων αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών από τη βάση δεδομένων GenBank	76
2.9.2	Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA	76
2.9.3	Εύρεση ομοιοτήτων αλληλουχιών	76
2.9.4	Στοιχισμός αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών και κατασκευή φυλογενετικών δέντρων.....	77
2.9.5	Επεξεργασία νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών DNA με το πρόγραμμα Omega 2.0	77
2.9.6	Υπολογισμός συχνότητας χρήσης κωδικονίων.....	78
2.9.7	Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας.....	78
2.9.8	Κατάθεση ακολουθιών DNA σε βάση δεδομένων	79
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	83
3.1	ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΔΑΚΟΥ	85

3.1.1	Ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της Real-time PCR	85
3.1.2	Υπολογισμός μεγέθους γονιδιώματος	86
3.1.3	Έλεγχος πειραματικής διαδικασίας.....	86
3.2	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΕΤΙΚΕΤΩΝ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ	88
3.2.1	Απομόνωση φαγεμιδίων cDNA αλληλουχιών.....	88
3.2.2	Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης και ανάλυση των ESTs	89
3.2.3	Ανάλυση με PCR αντίστροφης μεταγραφής των απομονωμένων ESTs.....	90
3.2.4	Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας	91
3.2.5	Κυτταρογενετική χαρτογράφηση ESTs μέσω <i>in situ</i> υβριδισμού σε πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου	93
3.2.6	Διερεύνηση συνταινιακότητας.....	95
3.2.7	Ανάλυση συχνοτήτων επιλογής κωδικονίων	97
3.2.8	Ανάπτυξη EPIC δεικτών	99
3.3	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ <i>ACHILLES</i> ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ...102	
3.3.1	Απευθείας διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης	102
3.3.2	Διαλογή προεπιλεγμένων κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης	103
3.3.3	Δομική ανάλυση των απομονωμένων φαγικών κλώνων.....	105
3.3.4	Χαρτογράφηση και ανάλυση πρωτο-διάταξης του φαγικού κλώνου φ443	107
3.3.5	Ανίχνευση της 3' περιοχής του <i>Achilles</i>	110
3.3.6	Καθορισμός της δομής του <i>Achilles</i>	112
3.3.7	Έλεγχος ύπαρξης της περιοχής της RNάσης H	115
3.3.8	Έλεγχος ενεργότητας του <i>Achilles</i>	116
3.3.9	Προσδιορισμός των αντιγράφων του ρετρομεταθετού <i>Achilles</i> στο γονιδίωμα.....	116
3.4	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΡΥΦΟΡΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ BOR300 ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ	119
3.4.1	Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης	119
3.4.2	Δομική ανάλυση και χαρτογράφηση του απομονωμένου φαγικού κλώνου φ276.....	119
3.4.3	Ανάλυση πρωτοδιάταξης του κλώνου υβριδοποίησης.....	121
3.4.4	Απομόνωση και ανάλυση της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας BoR300	123
3.4.5	Καθορισμός των αντιγράφων της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300 στο γονιδίωμα του δάκου	124
3.4.6	Φυσική χαρτογράφηση της αλληλουχίας BoR300 με FISH	128
3.4.7	Ειδο-ειδικότητα της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300	129
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	131
4.1	ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ.....	133

4.2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΤΙΚΕΤΩΝ ΕΚΦΡΑΖΟ-ΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ	134
4.3	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ <i>ACHILLES</i>	141
4.4	ΚΕΝΤΡΟΜΕΡΙΚΗ ΔΟΡΥΦΟΡΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΒΟR300	146
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	151
6	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	169
6.1	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 3.1	171
6.2	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 3.2	171
6.3	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 3.3	187
6.4	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 3.4	190
7	ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ	191

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1-1 Γραφική απεικόνιση α) ποσοστιαίας κατανομής ελαιώνων στο σύνολο των καλλιεργούμενων εκτάσεων των ευρωπαϊκών χωρών της Μεσογείου το έτος 2007, β) της ετήσιας συμμετοχής των ελαιοπαραγωγών χωρών στην παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου	4
Εικόνα 1.2-1 Παγκόσμια κατανομή ελαιοκαλλιέργειας.	4
Εικόνα 1.2-2 Μορφολογική διαφοροποίηση θηλυκού και αρσενικού ατόμου δάκου, βάση της απουσίας του ωαποθέτη από το αρσενικό (αριστερά).....	5
Εικόνα 1.2-3 Βιολογικός κύκλος του <i>B. oleae</i>	6
Εικόνα 1.2-4 Σχηματική συγκριτική αναπαράσταση της κλασσικής SIT με εφαρμογή ακτινοβολίας και της τεχνολογίας RIDL-SIT.	11
Εικόνα 1.3-1 Μιτωτικά μεταφασικά χρωμοσώματα από εγκεφαλικά γάγγλια α) θηλυκής και β) αρσενικής προνύμφης του <i>B. oleae</i> (Mavragani – Tsiroidou 2002)..	14
Εικόνα 1.6-1 Μοριακή οργάνωση γονιδιώματος σε επίπεδο επαναληψιμότητας των αλληλουχιών, στο σύνολο του γενετικού υλικού.	20
Εικόνα 1.6-2 Σχηματική αναπαράσταση της δομής και της επιμέρους κατάταξης των κύριων μεταθετών στοιχείων τάξης I και II.	22
Εικόνα 1.6-3 Επίδραση των ρετρομεταθετών στοιχείων στη γονιδιακή έκφραση.....	26
Εικόνα 1.6-4 Επίδραση των ρετρομεταθετών στοιχείων στη δομή του γονιδιώματος.....	28
Εικόνα 1.6-5 Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων των μεταθετών στοιχείων και του περιβάλλοντος στη δομή και λειτουργία του γονιδιώματος.	29
Εικόνα 3.1-1 Σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων της Real-time PCR.....	87
Εικόνα 3.2-1 Σχηματική συνοπτική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης κλώνων cDNA βιβλιοθήκης υπό μορφή φαγεμιδίων.	88
Εικόνα 3.2-2 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας δημιουργίας των ESTs.	89
Εικόνα 3.2-3 Αποτελέσματα αναζήτησης ομοιοτήτων των απομονωμένων αλληλουχιών μέσω του προγράμματος BLASTX.....	90
Εικόνα 3.2-4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων RT-PCR επτά δυνητικών μεταγράφων του <i>B. oleae</i>	91
Εικόνα 3.2-5 Ποσοστιαία αναλογία των ESTs που επισημειώθηκαν με όρους γονιδιακής οντολογίας (GO).	91

Εικόνα 3.2-6 Ποσοστιαία κατανομή των ESTs στις κατηγορίες GO.	92
Εικόνα 3.2-7 Ενδεικτικά αποτελέσματα <i>in situ</i> υβριδισμού σε πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου με ανιχνευτές τους σημασμένους με διγοξιγενίνη κλώνους α) BoEST_90, β) BoEST_110.....	93
Εικόνα 3.2-8 Κυτταρογενετικός χάρτης των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του <i>B. oleae</i>	93
Εικόνα 3.2-9 Ομολογία πολυταινικών χρωμοσωμάτων <i>B. oleae</i> – <i>C. capitata</i> και <i>C. capitata</i> – <i>D. melanogaster</i> , βάσει των οποίων καθορίστηκε επαγωγικά η ομολογία μεταξύ των χρωμοσωμικών στοιχείων των <i>B. oleae</i> και <i>D. melanogaster</i>	95
Εικόνα 3.2-10 Σχηματική συγκριτική απεικόνιση των ομόλογων πολυταινικών χρωμοσωμάτων του <i>B. oleae</i> και της <i>D. melanogaster</i>	96
Εικόνα 3.2-11 Συγκριτικό διάγραμμα συχνοτήτων χρήσης των κωδικονίων του <i>B. oleae</i> (Bo) και των υπόλοιπων Διπτέρων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση.....	98
Εικόνα 3.2-12 Σχηματική απεικόνιση με τη μορφή δενδρογράμματος των γενετικών αποστάσεων 12 συνολικά ευκαρυωτικών οργανισμών σύμφωνα με τις διαφορές των συχνοτήτων χρήσης των κωδικονίων τους, εφαρμόζοντας τη μέθοδο UPGMA	99
Εικόνα 3.2-13 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας EPIC-PCR.....	99
Εικόνα 3.2-14 Διάγραμμα απεικόνισης της αποτελεσματικότητας της δια-ενίσχυσης των EPIC δεικτών του <i>B. oleae</i> σε 4 γένη της οικογένειας Tephritidae.....	100
Εικόνα 3.2-15 Δενδρογράμματα φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ 12 ειδών της οικογένειας Tephritidae, σύμφωνα με τις διαφορές των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ιντρονίων που ενισχύθηκαν με τους EPIC δείκτες α) <i>epicBo149</i> και β) <i>epicBo215</i>	101
Εικόνα 3.3-1 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας δημιουργίας κλασμάτων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου και διαλογής των προεπιλεγμένων κλασμάτων.....	104
Εικόνα 3.3-2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων ενίσχυσης με PCR των προεπιλεγμένων κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης..	105
Εικόνα 3.3-3 Ανάλυση κατά Southern των προϊόντων ολικής κατάτμησης των βακτηριοφαγικών κλώνων 255, 443, 447 και 448 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες	

EcoRI (E) και *HindIII* (H) μεμονωμένα, αλλά και το συνδυασμό τους (E/H) 106

Εικόνα 3.3-4 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας χαρτογράφησης των θέσεων αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI* σε ένθεμα βακτηριοφαγικού κλώνου..... 106

Εικόνα 3.3-5 Ανάλυση κατά Southern των προϊόντων ολικής κατάτμησης του βακτηριοφάγου φ443 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NotI*, *HindIII* και *EcoRI* (διαδρομές: N, Hc και Ec αντίστοιχα) και των προϊόντων μερικής κατάτμησης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *HindIII* και *EcoRI* (διαδρομές: Hp και Ep αντίστοιχα)..... 107

Εικόνα 3.3-6 α,β) Σχηματική απεικόνιση της επεξεργασίας των σημάτων υβριδοποίησης με τους τελοειδικούς ανιχνευτές T3 και T7, για τον καθορισμό των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *HindIII* (H) και *EcoRI* (E) αντίστοιχα. **γ)** Σχηματικός χάρτης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *HindIII* και *EcoRI* του φαγικού κλώνου φ443. 108

Εικόνα 3.3-7 Σχηματικός χάρτης της μοριακής οργάνωσης του LTR ρετρομεταθετού στοιχείου MAX της *D. melanogaster* 108

Εικόνα 3.3-8 Σχηματική απεικόνιση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των χασμάτων μεταξύ των υποκλώνων 1.9 kb, 1.35 kb και 0.9 kb 109

Εικόνα 3.3-9 Σχηματική απεικόνιση της πορείας βαδίσματος της αλληλουχίας με ανάστροφη κατεύθυνση (3'-5')..... 110

Εικόνα 3.3-10 Συνοπτική παρουσίαση της πειραματικής πορείας ανίχνευσης της 3' περιοχής του *Achilles* 111

Εικόνα 3.3-11 Προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του ORF του *Achilles*..... 112

Εικόνα 3.3-12 Δενδρόγραμμα φυλογενετικών σχέσεων και ομοπαράθεση της αμινοξικής αλληλουχίας του γονιδίου RT μεταξύ ρετρομεταθετών στοιχείων της οικογένειας BEL-Pao (MAX, GATE, BEL, *Achilles*, *Pao*, *ninja*) 113

Εικόνα 3.3-13 Πίνακας συσχέτισης σημείων (Dot-plot) των περιοχών που εκτείνονται από το 5' LTR έως το τέλος της 5' UTR, ακριβώς πριν την έναρξη των ORF των ρετρομεταθετών στοιχείων **α)** *Achilles* και **β)** MAX, όπως προκύπτει μετά από αυτο-ομοπαράθεση μέσω του προγράμματος μοριακής ανάλυσης Omega 2.0 114

Εικόνα 3.3-14 Σχηματική αναπαράσταση του δυνητικού 5' LTR του *Achilles* και της θέσης πρόσδεσης του εκκινητή (PBS)..... 115

Εικόνα 3.3-15 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων PCR ενίσχυσης της περιοχής στην

οποία παρεμβάλλεται η έλλειψη της αλληλουχίας της RH, με μήτρα 1) γονιδιωματικό DNA δάκου, 2) φαγικό DNA του κλώνου φ443..... 115

Εικόνα 3.3-16 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων RT-PCR ενίσχυσης του ολικού RNA, προς διερεύνηση της ενεργότητας του *Achilles* στο γονιδίωμα. 116

Εικόνα 3.3-17 Σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων της Real-time PCR για τον καθορισμό των αντιγράφων του *Achilles* στο γονιδίωμα..... 118

Εικόνα 3.4-1 Σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων διαλογής προεπιλεγμένων κλασμάτων μέσω PCR της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου που οδήγησαν στην απομόνωση του φαγικού κλώνου φ276. 119

Εικόνα 3.4-2 Ανάλυση κατά Southern των προϊόντων ολικής κατάτμησης των βακτηριοφαγικών κλώνων 273, 276 και 278 με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *EcoRI-HindIII* (E/H) και *PstI* (P) 120

Εικόνα 3.4-3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων κατάτμησης του βακτηριοφάγου φ276 με χρήση των ενδονουκλεασών περιορισμού *EcoRI* (E) και *HindIII* (H) μεμονωμένα, αλλά και το συνδυασμό τους (E/H)..... 120

Εικόνα 3.4-4 Ανάλυση κατά Southern των προϊόντων ολικής κατάτμησης του βακτηριοφάγου φ276 με τις *NotI*, *HindIII* και *EcoRI* (διαδρομές: A, Γ1 και Γ2 αντίστοιχα) και των προϊόντων μερικής κατάτμησης με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *HindIII* και *EcoRI* (διαδρομές: B1 και B2 αντίστοιχα), με χρήση του τελοειδικού T7 RNA ανιχνευτή του φ276. 120

Εικόνα 3.4-5 α, β) Σχηματική απεικόνιση της επεξεργασίας των σημάτων υβριδοποίησης με τον τελοειδικό ανιχνευτή T7, για τον καθορισμό των θέσεων αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού *HindIII* (H) και *EcoRI* (E) αντίστοιχα. **γ)** Σχηματικός χάρτης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *HindIII* και *EcoRI* του φαγικού κλώνου φ276..... 121

Εικόνα 3.4-6 Συνοπτική παρουσίαση της πειραματικής πορείας για τη δημιουργία διαδοχικών ελλείψεων του ενθέματος του κλώνου 8.0 kb, με χρήση του ενζύμου εξωνουκλεάση III (ExoIII). 122

Εικόνα 3.4-7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των κλασμάτων που συλλέχθηκαν μετά τη δράση της εξωνουκλεάσης III ανά χρονικά διαστήματα των 2.5 min, με αποτέλεσμα το μέγεθος των πλασμιδιακών υποκλώνων να ελαττώνεται σταδιακά κατά 525 br ... 122

Εικόνα 3.4-8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων κατάτμησης των υποκλώνων 28, 34, και 47 με χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού *PvuII*,

για την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησής τους	123
Εικόνα 3.4-9 Πίνακας συσχέτισης σημείων (Dot-plot) της 5' αλληλουχίας του κλωνοποιημένου ενθέματος των 8.0 kb του βακτηριοφάγου φ276 (276-1), μετά από επεξεργασία μέσω του προγράμματος μοριακής ανάλυσης Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd.).....	123
Εικόνα 3.4-10 Αλληλουχία του κλώνου BoR300	123
Εικόνα 3.4-11 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων PCR ενίσχυσης της αλληλουχίας BoR300 γονιδιωματικού DNA του δάκου (Bo) με τους εκκινητές BoR-F/R	124
Εικόνα 3.4-12 Συγκριτική ομοπαράθεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλήρους επαναλαμβανόμενου μοτίβου σε τέσσερις κλώνους	124
Εικόνα 3.4-13 Σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων της Real-time PCR για τον καθορισμό των αντιγράφων του BoR300 στο γονιδίωμα.....	126
Εικόνα 3.4-14 Γραφική παράσταση των τιμών Ct που προσδιορίστηκαν κατά την ενίσχυση των αλληλουχιών στόχου BoR300 (πολλαπλών αντιγράφων) και αναφοράς <i>ace</i> (μοναδικού αντιγράφου), για τις δεδομένες	

αραιώσεις του γονιδιωματικού DNA (10 pg, 100 pg, 1 ng) εκφρασμένες λογαριθμικά (τιμές 1, 2 και 3 αντίστοιχα).	127
Εικόνα 3.4-15 Αποτελέσματα φθορίζοντος <i>in situ</i> υβριδισμού της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300 σε πολυταινικά και μιτωτικά χρωμοσώματα του εντόμου <i>B. oleae</i>	129
Εικόνα 3.4-16 Έλεγχος της κατανομής της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300, με ανάλυση κατά Southern.....	130
Εικόνα 3.4-17 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% προϊόντων ενίσχυσης της κεντρομερικής αλληλουχίας BoR300 σε γονιδιωματικό DNA τεσσάρων ειδών της οικογένειας Bactrocera	130
Εικόνα 6.2-1.0-1 Δενδρογράμματα φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ ειδών της οικογένειας Tephritidae, σύμφωνα με τις διαφορές των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ιντρονίων που ενισχύθηκαν με τους EPIC δείκτες α) <i>epicBo203</i> , β) <i>epicBo86</i> , γ) <i>epicBo169</i> , δ) <i>epicBo138</i> , ε) <i>epicBo275</i> , στ) <i>epicBo277</i> , ζ) <i>epicBo178</i> , η) <i>epicBo95</i>	187

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 3.1-1 Δεδομένα ανάλυσης Real-time PCR κατά τον προσδιορισμό του μεγέθους των απλοειδών γονιδιωμάτων του <i>B. oleae</i> και της <i>D. melanogaster</i>	86
Πίνακας 3.2-1 Θέσεις χαρτογράφησης 35 EST κλώνων μετά από <i>in situ</i> υβριδισμό σε πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του <i>B. oleae</i>	94
Πίνακας 3.2-2 Πρότυπο συχνοτήτων επιλογής κωδικονίων του <i>B. oleae</i>	97
Πίνακας 3.3-1 Συνολική παρουσίαση των διαφορετικών βακτηριοφαγικών κλώνων που απομονώθηκαν.	103
Πίνακας 3.3-2 Δεδομένα ανάλυσης Real-time PCR κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων του στοιχείου <i>Achilles</i>	117
Πίνακας 3.4-1 Δεδομένα ανάλυσης Real-time PCR κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων του επαναλαμβανόμενου στοιχείου BoR300.	125
Πίνακας 3.4-2 Δεδομένα συγκριτικής ανάλυσης των καμπυλών ενίσχυσης της Real-time PCR, για τον υπολογισμό των αντιγράφων του BoR300 κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων του επαναλαμβανόμενου στοιχείου BoR300.	127

Πίνακας 6.1-1 Χαρακτηριστικά εκκινητών και γονιδίων στόχων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του μεγέθους των γονιδιωμάτων του <i>B. oleae</i> και της <i>D. melanogaster</i> μέσω Real-time PCR.....	171
Πίνακας 6.2-1 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις RT-PCR των δυνητικών <i>B. oleae</i> μεταγράφων.....	171
Πίνακας 6.2-2 Βιολογικοί όροι και κωδικοί επισήμεισης GO.	171
Πίνακας 6.2-3 Αριθμητική κατανομή των ESTs στις κατηγορίες GO.	172
Πίνακας 6.2-4 Προσδιορισμός δυνητικής λειτουργίας και κωδικοί πρόσβασης των 195 ESTs του <i>B. oleae</i> , σύμφωνα με τα αποτελέσματα αναζήτησης ομοιοτήτων με γονίδια της <i>D. melanogaster</i> μετά από σύγκριση μέσω του προγράμματος BLASTX.	173
Πίνακας 6.2-5 Πίνακας συχνοτήτων επιλογής των κωδικονίων για 12 εξεταζόμενους οργανισμούς.....	184
Πίνακας 6.2-6 Χαρακτηριστικά των 17 EPIC δεικτών του <i>B. oleae</i> και δεδομένα δια-ειδικής ενίσχυσης σε 12 είδη της οικογένειας Tephritidae.....	186

Πίνακας 6.3-1 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαλογή των προεπιλεγμένων κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του <i>B. oleae</i>	188
Πίνακας 6.3-2 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση Long-PCR και περαιτέρω στην αλληλούχηση του προϊόντος ενίσχυσης	189
Πίνακας 6.3-3 Αλληλουχίες των προσαρμογών Taq1 και Taq2, από τον υβριδισμό των οποίων σχηματίστηκε ο δίκλωνος προσαρμογέας TaqI-AD.. ..	189
Πίνακας 6.3-4 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR και semi-nested PCR κατά τη διαδικασία ανίχνευσης της 3' περιοχής του <i>Achilles</i>	189
Πίνακας 6.3-5 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των παρεμβαλλόμενων περιοχών μεταξύ των τριών υποκλώνων του βακτηριοφάγου φ443.....	190
Πίνακας 6.4-1 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των επαναλαμβανόμενων μοτίβων BoR300 με συμβατική PCR και Real-time PCR.....	190

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Από αρχαιοτάτων χρόνων, η ελιά εμφανίζεται στους μύθους, στις παραστάσεις και στην ιστορία των λαών στις χώρες όπου φύτευται, αποτελώντας ανέκαθεν σύμβολο ευημερίας, ειρήνης, γονιμότητας και ευφορίας. Στενά συνδεδεμένη με την πορεία των κοινωνιών και των πολιτισμών ανά τους αιώνες, τόσο ουσιαστικά όσο και συμβολικά, η ελιά διαδραματίζει ακόμα και σήμερα σημαντικότατο ρόλο στη ζωή των περιοχών που εντοπίζονται στη ζώνη καλλιέργειάς της.

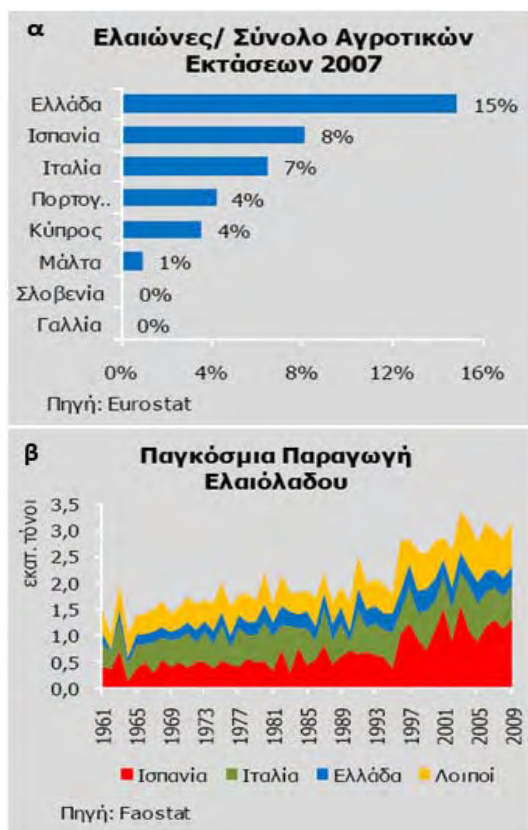
Οι εμπορικοί δρόμοι και οι επαφές μεταξύ των λαών δημιούργησαν τις προϋποθέσεις διάδοσης αυτής της σημαντικής καλλιέργειας. Η παγκόσμια ελαιοκομία περιλαμβάνει περίπου 800-850 εκ. ελαιόδεντρα, εκ των οποίων το 95% εντοπίζεται στις χώρες της Μεσογείου. Οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της λεκάνης της Μεσογείου συνέβαλαν στην ευρύτατη εξάπλωση της ελιάς σ' αυτόν τον γεωγραφικό χώρο. Η καλλιέργειά της έχει μεγάλη κοινωνική, οικονομική, πολιτιστική, πολιτική και οικολογική σημασία για τις παραμεσόγειες χώρες, διότι καλύπτει σημαντικό μέρος της γεωργικής έκτασης. Η εκμετάλλευσή της εξασφαλίζει την παραγωγή ελαιόλαδου και βρώσιμης ελιάς, προϊόντα που αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι της δίαιτας των μεσογειακών λαών. Στα δύο αυτά κυριότερα προϊόντα που προκύπτουν από την καλλιέργεια της ελιάς, πρέπει να προστεθεί και το πυρηνέλαιο που προορίζεται για βιομηχανική χρήση, αλλά και κάποια υποπροϊόντα με οικονομική σημασία, όπως τα φύλλα, ο κορμός, ο πυρήνας κ.α.

Η ελιά (*Olea europaea L.*) κατέχει την πρώτη θέση στη χώρα μας μεταξύ των δενδρωδών καλλιεργειών ως προς το μέγεθος των εκτάσεων που καταλαμβάνει και ως προς τον αριθμό των καλλιεργούμενων δένδρων.

Στη χώρα μας καλλιεργούνται περισσότερα από 150 εκατομμύρια ελαιόδεντρα και παράγονται ετησίως πάνω από 330.000 τόνοι ελαιόλαδου (ΕΛΣΤΑΤ 2006). Η ελαιοκαλλιέργεια, που αναπτύσσεται στα περισσότερα διαμερίσματα της χώρας (ορεινά, ημιορεινά και πεδινά), καλύπτει το

15% της καλλιεργούμενης γης και αναλογεί στο 75% των εκτάσεων των δενδρωδών καλλιεργειών (Εικ. 1.1-1). Η εξέχουσα θέση της καλλιέργειας αυτής στην Ελλάδα οφείλεται στην ύπαρξη ευνοϊκών κλιματικών συνθηκών για την ανάπτυξή της και στη δυνατότητα αξιοποίησης μεγάλων εδαφικών εκτάσεων που θεωρούνται ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες, όπως εκτάσεις με μη αρδευόμενα εδάφη, επικλινή, σχετικά μικρής γονιμότητας, κλπ., ενώ παράλληλα συμβάλλει και στην προστασία των εδαφών από τις διαβρώσεις, αποτρέποντας συνεπώς την ερημοποίηση. Η καλλιέργεια της ελιάς στις περισσότερες περιοχές της χώρας έχει τη μορφή μονοκαλλιέργειας, ενώ η εκμετάλλευση και μεταποίηση των προϊόντων της αποτελεί την αποκλειστική πηγή απασχόλησης και οικονομικής δραστηριότητας των κατοίκων των περιοχών αυτών. Η οικονομική σημασία της καλλιέργειας της ελιάς στην Ελλάδα είναι αδιαμφισβήτητη, με τα προϊόντα της να αποτελούν εκτός από βασικό στοιχείο διατροφής του πληθυσμού της χώρας και αξιόλογο παράγοντα εξασφάλισης συναλλάγματος από τις εξαγωγές, καλύπτοντας το 11% του γεωργικού εισοδήματος και συνεισφέροντας το 0.3% του ΑΕΠ (ΕΤΕ 2011).

Η οικονομική, περιβαλλοντική και διατροφική αξία της ελιάς καθιστά απαραίτητη την προστασία των ελαιώνων από ασθένειες και εχθρούς, εξασφαλίζοντας τη μικρότερη διατάραξη του αγροοικοσυστήματος και την αποτελεσματική αντιμετώπιση των βιολογικών περιοριστικών παραγόντων της καλλιέργειας, όπως διάφορα επιβλαβή έντομα (Katsoyannos 1992). Ο δάκος θεωρείται ο σοβαρότερος εντομολογικός εχθρός για την ελληνική και την παγκόσμια ελαιοκομία. Η κύρια αιτία εστιάζεται στο γεγονός ότι ο δάκος διατηρεί το χαρακτηριστικό της προσβολής καθ' όλο το έτος, σε σχέση με άλλους εχθρούς του ελαιοδέντρου που παρουσιάζουν τοπικό χαρακτήρα και συχνά χρονικό περιορισμό στην περίοδο εμφάνισής τους. Οι ζημιές που ο δάκος προκαλεί στον ελαιόκαρπο δεν είναι μόνο ποσοτικές αλλά και ποιοτικές. Επιφέρει σημαντική μείωση στην ετήσια ελαιοπαραγωγή και



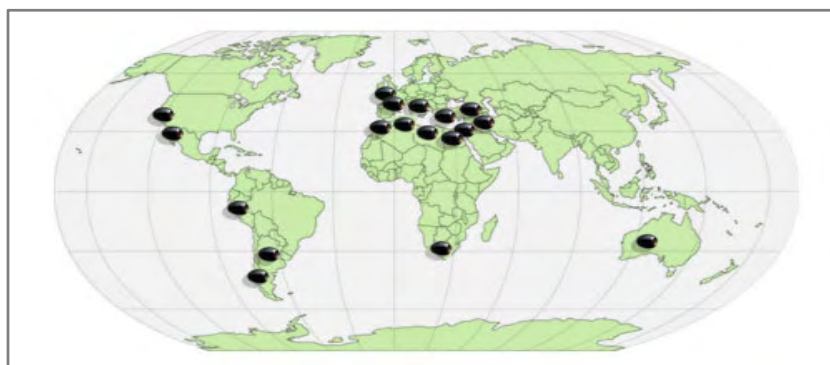
Εικόνα 1.1-1 Γραφική απεικόνιση **α)** ποσοστιαίας κατανομής ελαιώνων στο σύνολο των καλλιεργούμενων εκτάσεων των ευρωπαϊκών χωρών της Μεσογείου το έτος 2007, **β)** της ετήσιας συμμετοχής των ελαιοπαραγωγών χωρών στην παγκόσμια παραγωγή ελαιόλαδου, όπως καταγράφηκε για το χρονικό διάστημα 1961-2009.

υποβαθμίζει ποιοτικά τη βρώσιμη ελιά και το παραγόμενο ελαιόλαδο. Η καταπολέμηση του δάκου είναι αναγκαία και πλέον μια συνεχώς εξελισσόμενη διαδικασία που βασίζεται όχι μόνο στην έρευνα της συμπεριφοράς και της γενετικής του εντόμου αλλά στοχεύει και στη διατήρηση της οικολογικής ισορροπίας.

1.2 Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

1.2.1 Οικονομική σημασία, προέλευση, εξάπλωση

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Rossi), αποτελεί το πιο επιβλαβές έντομο των ελαιοκαλλιεργειών (Mazomenos 1989). Ταξονομικά ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των Διπτέρων εντόμων (Diptera), που περιλαμβάνει τις αποκαλούμενες «μύγες των φρούτων» (fruit flies). Στη συγκεκριμένη οικογένεια συγκαταλέγονται είδη που εντοπίζονται κυρίως στις τροπικές και υποτροπικές περιοχές του πλανήτη και παρουσιάζουν μεγάλη οικονομική σημασία εξαιτίας των καταστροφών που προκαλούν σε γεωργικές καλλιέργειες. Ανάμεσά τους διακρίνονται διάφορα είδη των γενών *Anastrepha* και *Ceratitis*, όπως η μεσογειακή μύγα (*Ceratitis capitata*), ενώ ενδεικτικά του γένους *Bactrocera* είναι τα είδη *tryoni*, *dorsalis* και *cucurbitae*, που προσβάλλουν ποικιλίες φρούτων (White & Elson-Harris 1992). Χαρακτηριστικό τους αποτελεί η εναπόθεση των αυγών τους στους καρπούς των φρούτων και κατ' επέκταση η ανάπτυξη των προνυμφών τους στο εσωτερικό τους, με αποτέλεσμα η παραγωγή να καθίσταται πλέον μη εμπορεύσιμη. Για το λόγο αυτό και η οικονομική σημασία του δάκου εστιάζεται στη σημαντική ποσοτική και ποιοτική ζημία που προκαλεί στην παγκόσμια παραγωγή. Σύμφωνα με εκτιμήσεις, ο δάκος ευθύνεται για την καταστροφή της ολικής ελαιοπαραγωγής σε ποσοστό 5% (30% στις Μεσογειακές χώρες), με άμεσο αντίκτυπο σε οικονομικό επίπεδο την απώλεια 800 εκατομμυρίων δολλαρίων ετησίως



Εικόνα 1.2-1 Παγκόσμια κατανομή ελαιοκαλλιέργειας.

(Montiel Bueno & Jones 2002). Η εξάπλωσή του συμπίπτει γεωγραφικά με εκείνη του ξενιστή του, καθώς αποτελεί έντομο μονοφάγο με αποκλειστική διατροφική πηγή των προνυμφών τον καρπό της ελιάς (Εικ. 1.2-1). Οι πληθυσμοί του δάκου εντοπίζονται τόσο σε περιοχές με εκτεταμένη καλλιέργεια ήμερων ελαιοδέντρων, όσο και σε περιοχές με γηγενείς άγριες ποικιλίες (*Olea europaea*). Ιδιαίτερη εξάπλωση παρατηρείται στις χώρες κατά μήκος της Μεσογειακής λεκάνης, όπου και καταγράφονται τα πρώτα δείγματα εισβολής του παρασίτου από τον 3ο αιώνα π.Χ.. Ωστόσο, παρά την διαδεδομένη εμφάνισή του στις περιοχές αυτές, εντοπίζεται επιπλέον κατά μήκος των ανατολικών ακτών της Αφρικής ως τη Νότιο Αφρική, στα Κανάρια Νησιά, τη Μέση Ανατολή, την Ινδία και την Κεντρική Αμερική, καθώς και στην πολιτεία της Καλιφόρνια των Η.Π.Α. (Rice 2000, Zalom et al. 2008). Μελέτες φυλογενετικής ανάλυσης των πληθυσμών του δάκου προτείνουν ότι η παρουσία του δάκου είναι άμεσα συνυφασμένη με τη διάδοση της ελαιοκαλλιέργειας για γεωργική εκμετάλλευση στις περιοχές αυτές, προσβάλλοντας τις καλλιεργήσιμες ποικιλίες ως αποτέλεσμα είτε παράλληλης προσβολής από προϋπάρχοντα άτομα στα γηγενή ελαιόδεντρα (Nardi et al. 2005), είτε επακόλουθου αποικισμού σε συνάρτηση με την εξάπλωση της καλλιέργειας (Augustinos et al. 2005). Επιπλέον, η ικανότητα που χαρακτηρίζει το δάκο να αποικίζει γρήγορα νέες περιοχές κατορθώνοντας να επιβιώνει και τελικά να αναπτύσσεται, θέτει κάθε χώρα με καλλιέργεια ελαιοδέντρων σε κίνδυνο εισβολής του (USDA, 2001).

1.2.2 Μορφολογία

Ο δάκος της ελιάς αποτελεί ένα από τα μικρότερα σε μέγεθος είδη του γένους *Tephritidae*. Συγκαταλέγεται στα ολομετάβολα έντομα, λόγω των μορφολογικών αλλαγών που υφίσταται κατά την ανάπτυξή του. Συνολικά παρατηρούνται τέσσερα διακριτά στάδια ανάπτυξης του εντόμου, με σαφή διαφοροποίηση των μορφολογικών

χαρακτηριστικών του. Συγκεκριμένα, το στάδιο του αυγού ακολουθούν τρία διαδοχικά προνυμφικά στάδια, μετά την ολοκλήρωση των οποίων επιτελείται η πρώτη μεταμόρφωση σε νύμφη ή βομβύκιο (*rypa*), και τελικά η πλήρης μεταμόρφωση σε ακμαίο ενήλικο άτομο.

Τα αυγά είναι λευκά και εμφανίζουν ελλειψοειδές σχήμα με μήκος 0.7 mm και διάμετρο 0.2 mm. Η προνύμφη έχει δομή άποδης κάμπιας με υπόλευκη χροιά και μήκος 7 mm, ενώ το βομβύκιο εμφανίζεται ως ωοειδής σχηματισμός μήκους περίπου 4 mm σε αποχρώσεις του κίτρινου έως και του καφέ.

Το ακμαίο ενήλικο άτομο έχει συνολικό μήκος σώματος περίπου 5 mm. Η κεφαλή, ο θώρακας και η κοιλία διακρίνονται με ανοιχτό καστανό χρώμα. Χαρακτηριστικοί είναι επίσης οι μεγάλοι σύνθετοι οφθαλμοί πρασινοπορφυρού μεταλλικού χρωματισμού και το ζεύγος των μικρών κεραιών. Κατά μήκος της επιφάνειας του ανώτερου τμήματος του θώρακα διακρίνονται τρεις παράλληλες μαύρες ταινίες, καθώς και μια άσπρη τριγωνική δομή στο οπίσθιο τμήμα του όπου επισυνάπτονται τα φτερά.

Η κοιλία, στις άκρες της οποίας παρατηρούνται σκουρότερες περιοχές, καταλήγει στα θηλυκά άτομα στον προεξέχοντα ωοθήτη, ενώ στα αρσενικά το τελικό της τμήμα είναι αμβλύ. Οι βραχίονες και μια περιοχή εκατέρωθεν της βάσης των φτερών παρουσιάζονται με κίτρινο χρώμα. Τα φτερά έχουν δυνατότητα έκτασης έως 10 mm και είναι συνήθως διαφανή με ιριδίζουσες αποχρώσεις. Χαρακτηριστική είναι η μαύρη κηλίδα στις άκρες τους, που λειτουργεί και ως στοιχείο διαφοροποίησης από τα υπόλοιπα είδη της οικογένειας που εμφανίζουν σκοτεινές ζώνες ή μοτίβα στην επιφάνεια των φτερών τους. Τα πόδια και οι αλτήρες εμφανίζονται με κιτρινο-κόκκινο και λευκό χρωματισμό αντίστοιχα (Katsoyannos 1992).



Εικόνα 1.2-2 Μορφολογική διαφοροποίηση θηλυκού και αρσενικού ατόμου δάκου, βάση της απουσίας του ωαποθήτη από το αρσενικό (αριστερά). Πηγή FAO/ΙΑΕΑ.

1.2.3 Βιολογικός κύκλος

Ο βιολογικός κύκλος του δάκου της ελιάς ακολουθεί τέσσερα διακριτά στάδια ανάπτυξης και επηρεάζεται άμεσα από περιβαλλοντικούς παράγοντες, με πιο αντιπροσωπευτικούς τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία. Ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες κάθε περιοχής, είναι δυνατόν κατά τη διάρκεια ενός έτους να συμπληρώνονται περισσότεροι του ενός βιολογικοί κύκλοι, χαρακτηριστικό που κατατάσσει το δάκο μεταξύ των πολυκυκλικών εντόμων. Οι ευνοϊκότερες συνθήκες ανάπτυξης των πληθυσμών του εντόμου αφορούν σχετική ατμοσφαιρική υγρασία από 60% έως 80% και θερμοκρασίες μεταξύ 20 και 25 °C, με οριακές θερμοκρασιακές τιμές ανάπτυξης τους 32°C και 10°C αντίστοιχα (Tsitsipis 1980, Fletcher & Karatos 1983).

Συγκεκριμένα στις παραμεσόγειες περιοχές παρατηρούνται σε διάστημα ενός έτους από 2 έως 5 γενεές (Karatos & Fletcher 1984). Κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών πληθυσμοί του εντόμου διαχειμάζουν κυρίως ως βομβύκια σε προφυλαγμένες θέσεις στην επιφάνεια του

εδάφους ή στον καρπό. Οι πληθυσμοί των ενήλικων ατόμων που κατορθώνουν να επιβιώσουν όμως ως την άνοιξη είναι ελάχιστοι. Η μείωση του αριθμού τους παρατηρείται κυρίως κατά τους μήνες Φεβρουάριο έως Μάρτιο, κατά τους οποίους παρατηρείται αναπαραγωγική διάπαυση λόγω περιοριστικών παραγόντων που σχετίζονται με τη μειωμένη διαθεσιμότητα των καρπών και τις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως οι χαμηλές θερμοκρασίες (Fletcher et al. 1978). Παρ' όλα αυτά, σε ευνοϊκές συνθήκες ενήλικα άτομα μπορούν να επιβιώσουν για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των έξι μηνών. Επιπλέον, σε ήπια κλίματα που ευνοούνται τόσο το αναπαραγωγικό όσο και τα αναπτυξιακά στάδια, η διαδοχή των γενεών μπορεί να είναι συνεχής σε όλη τη διάρκεια του έτους. Ωστόσο, ο μεγαλύτερος αριθμός ενήλικων ατόμων, που προκύπτουν από βομβύκια που έχουν διατηρηθεί κατά τους χειμερινούς μήνες, εμφανίζεται συνήθως τον Μάρτιο και τον Απρίλιο (Karatos & Fletcher 1984) και εξαρτάται άμεσα από τη θερμοκρασία και το γεωγραφικό πλάτος κάθε περιοχής. Η γενιά αυτή αποτελεί την αφετηρία του



Εικόνα 1.2-3 Βιολογικός κύκλος του *B. oleae*. Διαδοχικά απεικονίζονται: 1) η σύζευξη ενήλικων ατόμων, 2) η ωοαπόθεση θηλυκού ατόμου με διάρρηξη του επικαρπίου μέσω του ωοθέτη και ακολουθούν τα τέσσερα διακριτά στάδια ανάπτυξης 3) αυγό του εντόμου στο μεσοκάρπιο, 4) ανάπτυξη προνύμφης εντός του καρπού, 5-6) σχηματισμός βομβυκίου εντός του καρπού ή στο έδαφος και τελικά 7) μεταμόρφωση σε ακμαίο ενήλικο άτομο (έναρξη αρίθμησης από άνω αριστερά).

οικολογικού κύκλου του εντόμου, γι' αυτό και χαρακτηρίζεται ως πρώτη.

Κάθε θηλυκό άτομο που προκύπτει από αυτή συζεύγνυται μόνο μια φορά και έχει τη δυνατότητα εναπόθεσης 10-12 αυγών ημερησίως (ένα σε κάθε καρπό) ενώ μπορεί να φτάσει τα 400 αυγά καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του (Katsoyannos 1992). Τα ενήλικα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά στο εσωτερικό των καρπών που δεν έχουν συλλεχθεί κατά την προηγούμενη συγκομιδή και έχουν απομείνει στα δένδρα ή περιμένουν έως ότου οι νέοι καρποί φτάσουν σε κατάλληλο μέγεθος ώστε να υποστηρίξουν τη νυμφική ανάπτυξη. Στο διάστημα αυτό είναι δυνατό να λειτουργούν ως ξενιστές του εντόμου φυτά διαφορετικά της ελιάς, χωρίς όμως αρνητικές συνέπειες προς αυτά, καθώς τρέφονται με τις σακχαρούχες ουσίες των ανθέων ή τα μελιτώδη εκκρίματα άλλων εντόμων (Tsigoroulos 1977).

Συνεπώς η ωρίμανση των ωοθηκών στα θηλυκά, ο σχηματισμός των πρώτων αυγών και η έκκριση φερομονών που οδηγούν στη σύζευξη με τα αρσενικά άτομα σηματοδοτούνται από την διαθεσιμότητα των καρπών και τον βαθμό σκληρότητας του μεσοκαρπίου τους (σχετική υγρασία) (Fletcher et al. 1978). Το νύγμα που δημιουργείται από τον ωοθήτη του θηλυκού στην επιφάνεια του περικαρπίου και έχει την εμφάνιση καστανού τριγωνικού σχήματος, αποτελεί την πρώτη ένδειξη εισβολής του εντόμου, ενώ οι ουσίες που εκκρίνονται λειτουργούν αποτρεπτικά για τα υπόλοιπα άτομα, όσον αφορά την ωοαπόθεση στον ίδιο καρπό (Cirio 1971 από Katsoyannos 1992).

Η επόμενη (δεύτερη) γενιά εμφανίζεται στα μέσα του καλοκαιριού και συμπληρώνεται σε διάστημα μόνο 30-35 ημερών, λόγω των ευνοϊκών κλιματολογικών συνθηκών (Tzanakakis 1989). Συγκεκριμένα, τα αυγά εκκολάπτονται σε διάστημα 2 έως 4 ημερών, ενώ η ανάπτυξη των προνυμφών διαρκεί περίπου 20 μέρες και πραγματοποιείται σχεδόν αποκλειστικά στο μεσοκάρπιο του ελαιόκαρπου με ταυτόχρονη διάνοιξη ακανόνιστων στοών. Οι ώριμες προνύμφες βομβυκιώνονται στο εσωτερικό του καρπού κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ το φθινόπωρο εγκαταλείπουν το

θάλαμο νύμφωσης, σχηματίζοντας βομβύκια στο έδαφος. Ο χρόνος που απαιτείται για να αναπτυχθούν τα βομβύκια κυμαίνεται μεταξύ 8 και 10 ημερών. Ανάλογα με τη διαθεσιμότητα της τροφής – ώστε να εξασφαλίζεται η επιβίωση και η αναπαραγωγή των ατόμων – είναι δυνατό να υπάρξουν και επιπλέον γενεές κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου έως και τον Δεκέμβριο, οπότε και καταγράφεται η τελευταία γενιά του έτους. Χαρακτηριστικό της αποτελεί η έξοδος και μετακίνηση των προνυμφών από τον καρπό στο έδαφος όπου και βομβυκιώνονται για να αντεπεξέλθουν στις δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες του χειμώνα και τελικά να αποτελέσουν την απαρχή της γενιάς της άνοιξης. Η μετακίνηση αυτή μπορεί όμως να ερμηνευθεί και εξελικτικά ως προσαρμογή, αν συνυπολογιστεί ότι την εποχή αυτή πραγματοποιείται η συγκομιδή των καρπών.

1.2.4 Προκαλούμενη ζημία

Η προσβολή των ελαιόκαρπων από πληθυσμούς του δάκου είναι δυνατό να οδηγήσει σε καταστροφή της παραγωγής ή μείωση της εμπορευματικής της αξίας είτε σε προνυμφικό, είτε σε στάδιο ενηλικίωσης, με την προκαλούμενη ζημία στις ελαιοκαλλιέργειες να καταγράφεται τόσο σε ποσοτικό όσο και σε ποιοτικό επίπεδο (Daane & Johnson 2010).

Κατά τη διαδικασία της ωοαπόθεσης, τα ενήλικα θηλυκά άτομα τρυπούν το επικάρπιο μέσω του ωοθήτη που φέρουν στην άκρη της κοιλίας τους. Το νύγμα που δημιουργείται αποτελεί την πρώτη ένδειξη εισβολής του εντόμου, μειώνοντας την εμπορική αξία της βρώσιμης ελιάς. Παράλληλα, η ωπή ωοτοκίας είναι δυνατό να λειτουργήσει ως εστία δευτερογενών μόλυνσεων των καρπών από μικροοργανισμούς και μύκητες (Neuenschwander & Michelakis 1978). Η είσοδος των οργανισμών αυτών έχει σαν αποτέλεσμα την αποσύνθεση του ελαιόκαρπου με χαρακτηριστική πλέον οσμή καθώς και την παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων (οξύτητα) σε υψηλά επίπεδα στο λάδι (Muik et al. 2003), γεγονός που υποβαθμίζει

την ποιότητά του. Σε περιόδους έντονης προσβολής παρατηρείται επίσης αλλοίωση των οργανοληπτικών χαρακτήρων (γεύση και χρώμα) του παραγόμενου προϊόντος, λόγω της παρουσίας των προνυμφών στο εσωτερικό των καρπών.

Ωστόσο, η μεγαλύτερη ζημία στην παραγωγή προκαλείται κατά το προνυμφικό στάδιο. Οι προνύμφες αναπτύσσονται με αποκλειστική διατροφική πηγή τους ιστούς του μεσοκαρπίου, με αποτέλεσμα τη δημιουργία στοών στο εσωτερικό του καρπού. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα είτε την πρόωρη πτώση των προσβεβλημένων καρπών σε σχέση με την περίοδο συγκομιδής, είτε τη μείωση της μάζας του ελαιόκαρπου εφόσον καταναλώνεται έως και το ¼ του μεσοκαρπίου για την κάλυψη των διατροφικών αναγκών των προνυμφών (Neuenschwander & Michelakis 1978).

1.2.5 Διαχείριση, καταπολέμηση

Η καταστροφή ή υποβάθμιση του ελαιόκαρπου είναι συνυφασμένη με σημαντικές οικονομικές απώλειες για τις ελαιοπαραγωγούς χώρες, γεγονός που καθιστά αναγκαίο τον αποτελεσματικό έλεγχο των φυσικών πληθυσμών του δάκου. Στα πλαίσια των στρατηγικών φυτοπροστασίας των ελαιοκαλλιιεργειών, η επικρατέστερη μέθοδος καταπολέμησης του εντόμου είναι η χημική, με χρήση συμβατικών εντομοκτόνων με τη μορφή ψεκασμών.

Οι ψεκασμοί μπορεί να είναι οι προληπτικοί (δολωματικού τύπου, bait sprays) ή καλύψεως (θεραπευτικού τύπου, cover sprays) ανάλογα με το αν αποσκοπούν αντίστοιχα στην αντιμετώπιση ενήλικων ατόμων ή προνυμφών που έχουν ήδη προσβάλει τον καρπό, οπότε και επιλέγονται διαφορετικού τύπου εντομοκτόνα. Στην περίπτωση των προληπτικών ψεκασμών, σε συνδυασμό με τα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται και προσελκυστικές ουσίες, όπως προϊόντα υδρόλυσης πρωτεϊνών (Economidou et al. 1986). Οι δολωματικοί ψεκασμοί αποσκοπούν στην προσέλκυση και ακολούθως στη θανάτωση των ακμαίων ατόμων του δάκου πριν την έναρξη της ωοαπόθεσης στον

ελαιόκαρπο. Με τον τρόπο αυτό ανακόπτεται η αναπαραγωγική εξέλιξη του εντόμου και κατά συνέπεια αποφεύγεται η προσβολή του ελαιόκαρπου. Οι επαναληπτικές εφαρμογές των δολωματικών ψεκασμών καθορίζονται ανάλογα με τον πληθυσμό των ακμαίων που εκτιμάται με σύλληψή τους σε δίκτυο δακοπαγίδων παρακολούθησης.

Ωστόσο η χημική καταπολέμηση αμφισβητήθηκε ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια, λόγω της σπουδαιότητας των δυσμενών συνεπειών που προέκυψαν στη γεωργία και το περιβάλλον. Η μονομερής και αλόγιστη χρήση των χημικών εντομοκτόνων εμπλέκεται στην ευρεία περιβαλλοντική ρύπανση, στην παρουσία χημικών καταλοίπων στα προϊόντα και το περιβάλλον της ελιάς, καθώς και στη διατάραξη της τροφικής αλυσίδας με δυσάρεστες συνέπειες για την ανθρώπινη υγεία (Denholm & Rowland 1992).

Επιπλέον, οι κατά συρροή ψεκασμοί είχαν σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη μηχανισμών ανθεκτικότητας στα χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα. Στα ανθεκτικά αυτά άτομα, αλλά και στους απογόνους τους, εντοπίστηκαν μεταλλάξεις σε γονίδια που τους επέτρεπαν να επιβιώσουν, με αποτέλεσμα κάθε επακόλουθη εφαρμογή των εντομοκτόνων να είναι αναποτελεσματική στην ταυτόχρονη αύξηση της συχνότητας των ανθεκτικών ατόμων (Vontas et al. 2001; 2002, Kakani et al. 2008).

Επίσης, πρέπει να συνυπολογιστεί το γεγονός ότι τα χημικά εντομοκτόνα δεν παρουσιάζουν εκλεκτικό τρόπο δράσης (species-specific), με αποτέλεσμα να βλάπτονται εκτός των εντόμων – στόχων και άλλα ωφέλιμα είδη του οικοσυστήματος των ελαιοκαλλιιεργειών. Όλα όσα αναφέρθηκαν παραπάνω, καθιστούν ιδιαίτερα επιτακτικό τον περιορισμό της χρήσης εντομοκτόνων και συνιστούν την αναγκαιότητα ανάπτυξης εναλλακτικών, πιο ήπιων και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων καταπολέμησης του εντόμου.

Ως εναλλακτική αντιμετώπιση προτείνεται η χρήση δακοπαγίδων, οι οποίες εκτός της παρακολούθησης των φυσικών πληθυσμών είναι

δυνατό να μετατραπούν σε μέσο καταπολέμησης μετά από μαζική εφαρμογή τους (Varela et al. 2005). Η λειτουργία τους βασίζεται στην αξιοποίηση διαφόρων ερεθισμάτων με στόχο την προσέλκυση και τελικά την παγίδευση του εντόμου. Τα ερεθίσματα μπορεί να είναι είτε οπτικά, είτε ουσίες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του εντόμου όπως η σεξουαλική φερομόνη ή τροφικά προσελκυστικά (υδρολυμένη πρωτεΐνη), είτε συνδυασμός τους, εξασφαλίζοντας πιο αποτελεσματικά επίπεδα αντιμετώπισης (Montiel-Bueno & Jones 2002).

Η επιτακτική ανάγκη για την εξεύρεση μεθόδων ασφαλούς καταπολέμησης του δάκου έδωσε νέα ώθηση στην έρευνα για τον βιολογικό έλεγχο του εντόμου, ώστε να εξασφαλίζεται η αυτορρύθμιση των πληθυσμών στο ευρύτερο οικοσύστημα των ελαιοκαλλιεργειών. Ο βιολογικός έλεγχος συνίσταται στη διαχείριση των φυσικών εχθρών του εντόμου, δηλαδή παρασιτοειδών και αρπακτικών καθώς και παθογόνων μικροοργανισμών, με απώτερο στόχο το φυσικό περιορισμό του (για ανασκόπηση Daane & Johnson 2010). Συγκεκριμένα, η διαχείριση αφορά τη διατήρηση ή εξαπόλυση ωφελίμων οργανισμών με σκοπό την εγκατάστασή τους σε μία καλλιέργεια ή την αύξηση του πληθυσμού των ήδη υπάρχοντων. Ωστόσο, η αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής επηρεάζεται από περιοριστικούς παράγοντες που σχετίζονται με τα βιολογικά – οικολογικά χαρακτηριστικά των οργανισμών που χρησιμοποιούνται, όπως η μείωση της πυκνότητας του πληθυσμού τους τις περιόδους εμφάνισης του δάκου (εκτοπαράσιτα της προνύμφης, *Eupelmus urozomus* και *Pnigalio mediterraneus*) (Karatos & Fletcher 1986) ή η αδυναμία μόνιμης εγκατάστασής τους λόγω κλιματολογικών συνθηκών (ενδοπαράσιτο της προνύμφης, *Opius concolor*) (Karatos & Fletcher 1984).

Οι σύγχρονες τάσεις φυτοπροστασίας προτείνουν την ολοκληρωμένη καταπολέμηση των εντόμων (Integrated Pest Management, IPM). Πρόκειται για το συνδυασμό μεθόδων και τεχνολογιών, ώστε να διατηρούνται οι πληθυσμοί-στόχοι σε μια πυκνότητα κατώτερη από εκείνη που

προκαλεί οικονομική ζημιά, εξασφαλίζοντας παράλληλα τις οικονομικές, οικολογικές και τοξικολογικές παραμέτρους όσον αφορά την προστασία του φυτού (Montiel-Bueno & Jones 2002). Στις επιμέρους μεθόδους που συγκροτούν αυτή τη στρατηγική συμπεριλαμβάνονται καλλιεργητικά μέτρα περιορισμού των προκαλούμενων ζημιών, ουσίες που επηρεάζουν τη συμπεριφορά του εντόμου με δράση προσελκυστική ή απωθητική, η δυνατότητα χρήσης βελτιωμένων – εκλεκτικών εντομοκτόνων, καθώς και ο βιολογικός έλεγχος του παρασίτου.

Εναλλακτικά, μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση βιολογικής αντιμετώπισης του δάκου, φιλικής προς το περιβάλλον και απόλυτα ειδικής προς το είδος στόχο, αποτελεί η τεχνική στείρωσης των εντόμων (Sterile Insect Technique, SIT). Η μέθοδος SIT βασίζεται στη μαζική εργαστηριακή εκτροφή ατόμων, τα οποία αφού στερηθούν μετά από έκθεση σε ακτινοβολία γ, απελευθερώνονται ελεγχόμενα στο φυσικό τους περιβάλλον. Κατά τη σύζευξη τα άτομα αυτά ανταγωνίζονται τα αγρίου τύπου μειώνοντας τελικά το αναπαραγωγικό δυναμικό, αφού καταλήγουν σε στείρα ωοτοκία (Econoμπορούλος 1972, Robinson 2002). Ωστόσο, ακόμα και αν επιτευχθούν κάποιες γόνιμες διασταυρώσεις, τα άτομα που προκύπτουν παρουσιάζουν μειωμένη ζωτικότητα εξαιτίας δομικών μεταλλάξεων στο γενετικό υλικό των γαμετών μετά την εφαρμογή της ακτινοβολίας. Προσπάθειες εφαρμογής της κλασσικής αυτής προσέγγισης SIT έχουν πραγματοποιηθεί μεταξύ πολλών εντόμων οικονομικής σημασίας με σκοπό τη μείωση του πληθυσμού τους (για ανασκόπηση Robinson 2002, Morrison et al. 2010). Για ορισμένα από αυτά τα αποτελέσματα της μεθόδου ήταν ενθαρρυντικά όπως τα *Cochliomyia hominivorax* (Wyss 2000) και *Glossina austeni* (Vreysen et al. 2000), για τα οποία επιτεύχθηκε πλήρης εξολόθρευση σε απομονωμένα πεδία και τα *Ceratitis capitata* (Hendricks et al. 1983), *Bactrocera cucurbitae* (Iwahasi 1977) και *Bactrocera tryoni* (Fisher 1994). Ωστόσο στις υπόλοιπες περιπτώσεις που δοκιμάστηκε παρόμοια εξαπόλυση οι προσπάθειες ήταν ατελέσφορες. Η μέθοδος

εφαρμόστηκε και στο δάκο τη δεκαετία του '70, χωρίς όμως ιδιαίτερη επιτυχία. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε πρωτίστως στη διαφοροποίηση της φυσιολογίας και της συμπεριφοράς σύζευξης των εργαστηριακών στεírων πληθυσμών σε σχέση με τους φυσικούς (Econoμopoulos 1972, Econoμopoulos et al. 1978; 1982, για ανασκόπηση Econoμopoulos 2002). Επίσης η αδυναμία διαχωρισμού των στεírων αρσενικών ατόμων από τα αντίστοιχα θηλυκά πριν την εξαπόλυση, αποτέλεσε έναν επιπλέον περιοριστικό παράγοντα για την μειωμένη αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Η απελευθέρωση θηλυκών ατόμων είναι ανεπιθύμητη εξαιτίας των επιζήμιων επιπτώσεων που προκαλούν, λόγω των δευτερογενών μολύνσεων στα σημεία των νυγμάτων. Επιπλέον η δυνατότητα φυλο-διαχωρισμού στα πρώτα αναπτυξιακά στάδια θα συνέβαλε στη μείωση του κόστους των μαζικών εκτροφών.

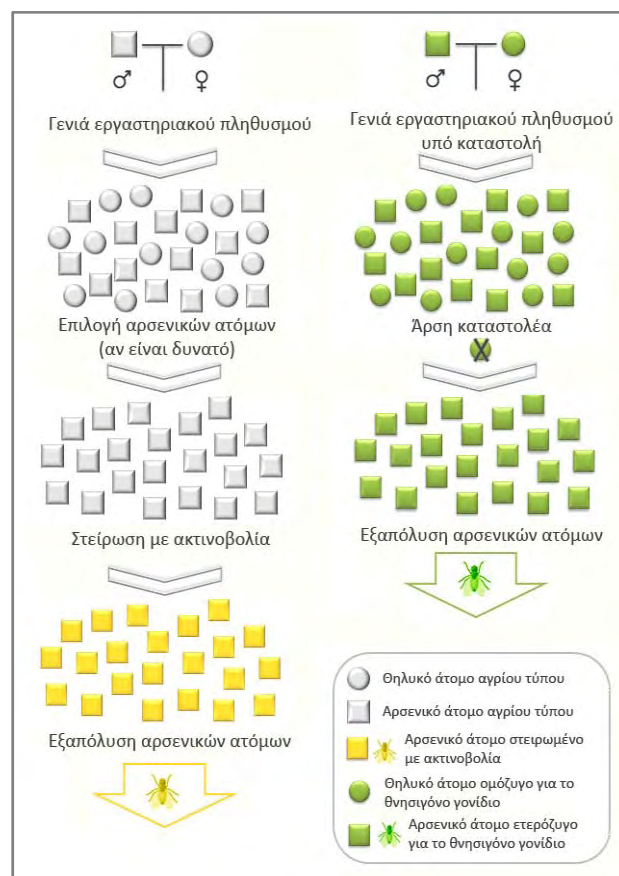
Οι εντατικές έρευνες που ακολούθησαν τις πρώτες προσπάθειες εφαρμογής της κλασικής SIT οδήγησαν στον καθορισμό των απαιτήσεων που θεμελιώνουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου και στις οποίες περιλαμβάνονται: i) η καλλιέργεια και εκτροφή αυξημένου αριθμού εντόμων για μαζική απελευθέρωση, ii) ο αποτελεσματικός διαχωρισμός αρσενικών και θηλυκών ατόμων, iii) η εφαρμογή μεθόδου με υψηλά ποσοστά στείρωσης των προς εξαπόλυση εντόμων με ταυτόχρονα μειωμένη επίδραση στην αρμοστικότητα τους, iv) η αποτελεσματική εξαπόλυση και διασπορά των στεírων αρσενικών ατόμων και v) η εύκολη παρακολούθηση και ταυτοποίηση των απελευθερωμένων ατόμων (Alrhey 2007, Scolari et al. 2011).

Η ανάπτυξη νέων μοριακών προσεγγίσεων και τεχνικών έδωσε νέα ώθηση στην έρευνα για την αποτελεσματικότερη εφαρμογή της μεθόδου. Την εποχή της κλασικής SIT, κατά την οποία επικρατούσε η ραδιενεργός στείρωση του προς εξαπόλυση πληθυσμού συνοδευόμενη από τα μειωμένα ποσοστά ζωτικότητας και τα πεπαλαιωμένα συστήματα παρακολούθησης (Robinson 2004, Alrhey 2007), διαδέχθηκε η εποχή της γενετικής SIT (Robinson & Franz 2000).

Πληθώρα αναφορών που σχετίζονται με την ανάπτυξη γενετικών εργαλείων με απώτερο σκοπό την εφαρμογή τους σε προσπάθειες SIT, είναι διαθέσιμες στη βιβλιογραφία. Η πλειοψηφία των αναφορών αυτών αφορούν στο έντομο *C. capitata*, που θα μπορούσε να χαρακτηριστεί ως οργανισμός – μοντέλο στην έρευνα της SIT. Τα πρώτα βήματα προς την κατεύθυνση εισαγωγής γενετικών μηχανισμών φυλετικού διαχωρισμού αφορούσαν τη δημιουργία φυλο-γενετικών στελεχών (genetic sexing strain, GSS) με σκοπό την επιλεκτική απομάκρυνση των θηλυκών ατόμων πριν την απελευθέρωση των εντόμων ή τη θανάτωσή τους σε κάποιο αναπτυξιακό στάδιο (Robinson 1999). Τα στελέχη GSS φέρουν επαγόμενες μέσω ακτινοβολίας μεταθέσεις ενός υπολειπόμενου δείκτη επιλογής συνδεδεμένου με το Y χρωμόσωμα των αρσενικών ατόμων (Robinson 2002). Η φυλετικά – συνδεδεμένη διαφοροποίηση βασίζεται είτε σε κάποιο φαινοτυπικό χαρακτηριστικό όπως το χρώμα της νύμφης (Robinson 2000), είτε στην ανθεκτικότητα σε κάποιο εντομοκτόνο ή χημικό (πχ. dieldrin, malathion, αλκοόλη) (Meats et al. 2002), είτε στην διαφορετική θερμοκρασιακή ευαισθητοποίηση (Hendrics et al. 1995, Franz 2005). Ωστόσο τα συστήματα αυτά εμφανίζουν αρκετά μειονεκτήματα που σχετίζονται κυρίως με τη βιωσιμότητα των εντόμων, την αστάθεια των χρωμοσωμικών μεταθέσεων που χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία των GSS και συνεπώς την επαγωγή γενετικών ανασυνδυασμών κατά τη μαζική εκτροφή των εντόμων. Επίσης, ανάλογα στελέχη για οποιοδήποτε νέο είδος – στόχο πρέπει να δημιουργηθούν *de novo*, εφόσον η ανάπτυξη γενετικών εργαλείων σε ένα είδος μέσω της τεχνολογίας κλασικής μεταλλαξιγένεσης δεν επιτρέπει τη μεταφορά τους σε άλλο είδος (Alrhey 2002).

Για να ξεπεραστούν οι περιορισμοί που ανέκυψαν από την εφαρμογή της SIT μέσω προσεγγίσεων κλασικής γενετικής, οι έρευνες στράφηκαν σε διαγονιδιακό επίπεδο αξιοποιώντας τις εξελίξεις της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA. Οι εναλλακτικές προσπάθειες για τη δημιουργία βελτιστοποιημένων GSS στελεχών μέσω

γενετικής μηχανικής εστιάζουν στη μεταφορά γενετικού υλικού χρησιμοποιώντας μεταθετά στοιχεία ως φορείς, με σκοπό την ανάπτυξη ευρέως εφαρμόσιμων διαγονιδιακών συστημάτων και στα τρία επίπεδα ενδιαφέροντος: το φυλετικό διαχωρισμό, τη στέρωση και την παρακολούθηση του πληθυσμού (για ανασκόπηση Scolari et al. 2008). Τα συστήματα αυτά, όσον αφορά το φυλετικό διαχωρισμό, αξιοποιούν φυλο – ειδικούς και συνθηκο – ρυθμιζόμενους (conditional) υποκινητές, αλλά και ρυθμιστικά στοιχεία που επάγουν την έκφραση γονιδίων – στόχων με αποτέλεσμα είτε τη θνησιμότητα των θηλυκών ατόμων, είτε τη διάκριση των αρσενικών ή τη στέρωσή τους (Komitoroulou et al. 2004, Alrhey 2007). Επιπλέον χρησιμοποιούνται ιδιοστατικοί (constitutive) υποκινητές που επάγουν κυρίως την έκφραση φθοριζόντων πρωτεϊνών για την ανάπτυξη ευαίσθητων δεικτών, οι οποίοι επιτρέπουν την ανίχνευση και ταυτοποίηση των μετασχηματισμένων εντόμων (Koukidou et al. 2006, Alrhey 2007). Εναλλακτικά η μείωση των θηλυκών ατόμων του προς εξαπόλυση πληθυσμού στο έντομο *C. capitata* έχει επίσης επιτευχθεί μέσω αρρενοποίησης τους με αποσιώπηση του γονιδίου *transformer* μέσω παρεμβολής RNA (RNAi) (Pane et al. 2002). Επιπλέον, έχει αναπτυχθεί η τεχνική απελευθέρωσης εντόμων που φέρουν ένα επικρατές θνησιγόνο γονίδιο (Release of Insects carrying a Dominant Lethal, RIDL). Η τεχνική RIDL ουσιαστικά βασίζεται στη δημιουργία ενός διαγονιδιακού στελέχους που φέρει ένα ρυθμιζόμενο επικρατές και θνησιγόνο γονίδιο, σε ένα σύστημα που διατηρείται σε καταστολή σε εργαστηριακές συνθήκες και το οποίο δεν απαντάται φυσιολογικά στο περιβάλλον (Alrhey 2002; 2007, Morrison et al. 2010). Η απελευθέρωση των ατόμων αυτών σηματοδοτεί ταυτόχρονα και την άρση της καταστολής και παρ' ότι δεν είναι στείρα, από τη σύζευξή τους με τα αγρίου τύπου έντομα του αντίθετου φύλου προκύπτουν ετερόζυγοι απόγονοι που δεν επιβιώνουν (Gong et al. 2005, Fu et al. 2007, Schetelig et al. 2009). Στο συγκεκριμένο σύστημα εάν το θνησιγόνο γονίδιο είναι θηλεο-ειδικό, τότε λαμβάνει χώρα επιλεκτική



Εικόνα 1.2-4 Σχηματική συγκριτική αναπαράσταση της κλασικής SIT με εφαρμογή ακτινοβολίας και της τεχνολογίας RIDL-SIT. Στην κλασική SIT (αριστερή στήλη) τα αρσενικά άτομα διαχωρίζονται από τα θηλυκά, στειρώνονται με ακτινοβολία και απελευθερώνονται στο περιβάλλον με αποτέλεσμα τη μη γόνιμη διασταύρωσή τους με τα αγρίου τύπου θηλυκά άτομα. Στην RIDL-SIT ο πληθυσμός φέρει ένα ρυθμιζόμενο θηλεο-ειδικό επικρατές θνησιγόνο γονίδιο, σε σύστημα που διατηρείται σε καταστολή σε εργαστηριακές συνθήκες (Alrhey et al. 2007). Άρση του καταστολέα κατά την εκτροφή οδηγεί σε θνησιμότητα των θηλυκών ατόμων και τελικά την απελευθέρωση αποκλειστικά αρσενικών ατόμων. Αν και μη στείρα, από την ακόλουθη σύζευξή τους με τα αγρίου τύπου έντομα του αντίθετου φύλου, οι ετερόζυγοι θηλυκοί απόγονοι δεν επιβιώνουν.

θηλυκή θνησιμότητα σε αντίθεση με τα αρσενικά άτομα που επιβιώνουν, λειτουργώντας με τον τρόπο αυτό και ως «δικλείδα ασφαλείας» όσον αφορά την ελεγχόμενη εξάπλωση του διαγονιδίου, εφόσον παρατηρείται παράλληλη απομάκρυνση του συστήματος από τον αγρίου τύπου πληθυσμό.

Η χρήση διαγονιδιακών εντόμων μπορεί να εφαρμοστεί σε δύο διακριτές στρατηγικές που αφορούν αντίστοιχα την καταστολή ενός

πληθυσμού (population suppression) ή την αντικατάστασή του (population replacement) (Scolari et al. 2011). Η τελευταία, έχει προταθεί ως δυναμική μέθοδος για την αποτελεσματική αντιμετώπιση εντόμων που σχετίζονται με τη δημόσια υγεία, όπως τα κουνούπια, παρά για έντομα αγροτικής σημασίας. Η συγκεκριμένη τεχνολογία στοχεύει στην αντικατάσταση των ατόμων αγρίου τύπου μετά από σύζευξή τους με διαγονιδιακά, ώστε να εισαχθούν νέα γονίδια στον πληθυσμό που θα παρέχουν μηχανισμούς ανθεκτικότητας έναντι της προσβολής τους από παράσιτα, αποτρέποντας τελικά τη μετάδοση ασθενειών.

Τα τελευταία χρόνια οι συγκεκριμένες τεχνολογίες εξελίσσονται με ολόένα και ταχύτερο ρυθμό και εφαρμόζονται πιλοτικά σε διάφορα είδη εντόμων οικονομικής σημασίας με ικανοποιητικά αποτελέσματα (Morrison et al. 2010). Συνεπώς, έχοντας πλέον καθοριστεί οι προϋποθέσεις και τα χαρακτηριστικά που συνιστούν αποδοτική την παραπάνω τεχνολογία, στοιχειοθετείται η αναγκαιότητα ανάπτυξης κατάλληλων εργαλείων που απαιτούνται για την εφαρμογή της στον οργανισμό – στόχο.

Εναλλακτικά προς την SIT, από τη σκοπιά της μείωσης της γονιμότητας του πληθυσμού, ενδιαφέρον έχει επικεντρώσει η τεχνική του ασύμβατου εντόμου (Incompatible Insect Technique, IIT) (Boller & Bush 1976, Bourtzis & Robinson 2006). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην κυτταροπλασματική ασυμβατότητα που επάγεται από τη *Wolbachia*, ένα υποχρεωτικά ενδοκυττάριο, μητρικά κληρονομούμενο βακτήριο των εντόμων. Η *Wolbachia* αναπτύσσει συμβιωτικές σχέσεις αναπαραγωγικού παρασιτισμού στα έντομα, με αποτέλεσμα να προκύπτουν ανωμαλίες όπως η κυτταροπλασματική ασυμβατότητα, η παρθενογένεση, η θηλυκοποίηση και η θανάτωση των αρσενικών ατόμων. Ακριβώς αυτή την ικανότητα αξιοποιεί η IIT, της επαγόμενης κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που οδηγεί σε εμβρυονική θανάτωση, όταν εξαπολούνται αρσενικά άτομα μολυσμένα με *Wolbachia* τα οποία ακολούθως θα συζευχθούν με θηλυκά μη

μολυσμένα ή που φέρουν ασύμβατο στέλεχος του βακτηρίου (Bourtzis et al. 2003). Επίσης λόγω του ότι δεν κληρονομείται πατρικά, εξασφαλίζεται ότι το στέλεχος που εξαπολύεται δεν εγκαθιδρύεται στον φυσικό πληθυσμό. Στο δάκο όπως επίσης και άλλα έντομα οικονομικής και υγειονομικής σημασίας (*C. capitata*, *A. aegypti*, *A. gambiae*) δεν έχει διαπιστωθεί η φυσική παρουσία του βακτηρίου. Για αυτούς τους οργανισμούς προτείνεται η τεχνητή επιμόλυνση με μικροένθεση στο κυτταρόπλασμα εμβρύων, στελεχών της *Wolbachia* που προέρχονται από διαφορετικό ξενιστή. Επιστέγασμα τέτοιων προσπαθειών ήταν η δημιουργία στελέχους στην *C. capitata* και η επιτυχής επαγωγή κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας σε εργαστηριακό πληθυσμό (Zabalou et al. 2004; 2009). Πρόσφατα έχει επιτευχθεί η δημιουργία αντίστοιχου στελέχους στο δάκο (Apostolaki et al. 2011) δημιουργώντας ευνοϊκές προϋποθέσεις για δυνητική χρήση του σε μεθόδους καταπολέμησης του εντόμου.

1.3 ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΤΟ ΔΑΚΟ

1.3.1 Δομή μιτωτικών χρωμοσωμάτων

Το γενετικό υλικό ενός οργανισμού οργανώνεται στα χρωμοσώματα του πυρήνα των κυττάρων του. Στους πυρήνες των ευκαρυωτικών οργανισμών, το γενετικό υλικό υφίσταται ως μάζα χρωματίνης, η οποία συνίσταται από το γραμμικό δίκλωνο DNA συνδεδεμένο με πρωτεΐνες. Εξαιτίας της δυναμικής οργάνωσης της χρωματίνης και της δυνατότητάς της να αλλάζει μορφή κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου, παρατηρείται έντονη συσπείρωση του γενετικού υλικού κατά την κυτταρική διαίρεση, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό διακριτών χρωμοσωμάτων (Moser & Swedlow 2011).

Στα ευκαρυωτικά κύτταρα, τόσο η μεσοφασική χρωματίνη όσο και τα μεταφασικά χρωμοσώματα οργανώνονται με μεγάλους βρόχους που συνιστούν ανεξάρτητα υπερελικωμένες περιοχές ινιδίων

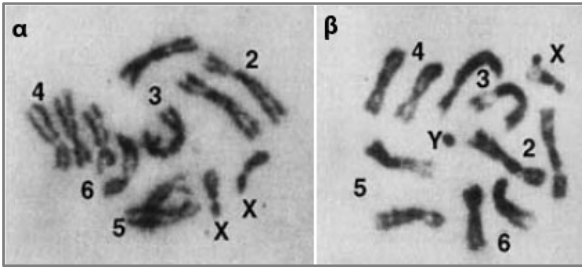
(Stack & Anderson 2001). Κάθε βρόχος περιέχει μόνο ενεργό ευχρωματίνη ή ανενεργό (διαζευκτική) ετεροχρωματίνη η οποία παρουσιάζει υψηλό βαθμό συμπύκνωσης. Οι περιοχές της ευχρωματίνης καταλαμβάνουν το μεγαλύτερο μέρος του πυρήνα και σ' αυτές εντοπίζονται οι μεταγραφικά ενεργές αλληλουχίες. Αντίθετα, οι περιοχές της ετεροχρωματίνης περιέχουν λίγα ενεργά γονίδια, αντιγράφονται με καθυστέρηση κατά τη διάρκεια της φάσης S και παρουσιάζουν μειωμένη συχνότητα γενετικού ανασυνδυασμού, ενώ συχνά περιέχουν αντίγραφα μη μεταγραφόμενων και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών DNA.

Κάθε είδος έχει χαρακτηριστική χρωμοσωμική σύσταση, όπως αυτή καθορίζεται από τη μορφολογία και το συνολικό αριθμό των μεταφασικών του χρωμοσωμάτων, η οποία συνιστά τον καρυότυπο. Τα χρωμοσώματα κατά τη διάρκεια της μίτωσης εμφανίζονται κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση ως συμπυκνωμένες δομές, κάθε μια από τις οποίες αποτελείται από δύο χρωματίδες ενωμένες στο κεντρομέρος. Το κεντρομέρος παίζει βασικό ρόλο στην κυτταρική διαίρεση διότι αποτελεί τη θέση σχηματισμού του κινητοχώρου, της δομής στην οποία προσδένονται τα ινίδια (μικροσωληνίσκοι) της ατράκτου και ελέγχεται η κίνηση των χρωμοσωμάτων. Μορφολογικά το κεντρομέρος αποτελεί μια πρωτογενή περίσφυξη, η οποία διαιρεί το χρωμόσωμα σε δύο βραχίονες. Ανάλογα με τη θέση του κεντρομέρους και συνεπώς τη σχετική αναλογία των βραχιόνων τους, τα χρωμοσώματα κατατάσσονται σε τέσσερις τύπους: i) τα μετακεντρικά, στα οποία το κεντρομέρος εντοπίζεται στο κέντρο και οι δύο βραχίονες παρουσιάζονται σχεδόν ισομήκεις, ii) τα υπομετακεντρικά, στα οποία το κεντρομέρος δεν βρίσκεται στο κέντρο και οι βραχίονες εμφανίζουν διακριτή διαφοροποίηση μεγέθους, iii) τα ακροκεντρικά, όπου το κεντρομέρος εντοπίζεται κοντά στο ένα άκρο του χρωμοσώματος με αποτέλεσμα οι δυο βραχίονες να διαφέρουν σημαντικά ως προς το μέγεθός τους, iv) καθώς επίσης και τα τελοκεντρικά, στα οποία το κεντρομέρος εντοπίζεται ακριβώς στην άκρη του

χρωμοσώματος. Επιπλέον η μορφολογία ορισμένων χρωμοσωμάτων διαφοροποιείται ανάλογα με τη δημιουργία ή μη δευτερογενών περισφίξεων κοντά στο άκρο του μικρού τους βραχίονα και συγκεκριμένα στις περιοχές του οργανωτή του πυρηνίσκου (nucleolar organizer regions, NORs). Σημαντικό επίσης χαρακτηριστικό των χρωμοσωμάτων αποτελούν τα τελομερή, δηλαδή τα τελικά τμήματά τους. Η εξειδικευμένη δομή και η οργάνωσή τους διατηρεί την αυτονομία των χρωμοσωμάτων εμποδίζοντας την αποδόμησή τους και τη σύντηξή τους με τα άκρα άλλων χρωμοσωμάτων. Τόσο τα κεντρομερή όσο και τα τελομερή συνιστούν δομικά χαρακτηριστικές ετεροχρωματινικές περιοχές των χρωμοσωμάτων (για ανασκόπηση Murray 1985).

1.3.2 Μιτωτικά χρωμοσώματα στο δάκο

Ο καρυότυπος του μεταφασικού διπλοειδή πυρήνα του *B. oleae*, που απομονώθηκε από κύτταρα των εγκεφαλικών γαγγλίων, αποτελείται από 6 ζεύγη χρωμοσωμάτων ($2n=12$) εκ των οποίων τα 5 αντιστοιχούν στα υπομετακεντρικά αυτοσωμικά χρωμοσώματα και ένα στα φυλετικά (Εικ. 1.3-1) (Frizzi & Springetti 1953, Krimbas 1963, Mavragani-Tsipidou et al. 1992). Το αρσενικό φύλο καθορίστηκε ως ετερογαμετικό, λόγω της παρουσίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων X και Y. Τα δύο φυλετικά αποτελούν τα μικρότερα χρωμοσώματα στο σύνολο του καρυότυπου και η φύση τους είναι υψηλά ετεροχρωματινική, σε αντίθεση με τα αυτοσωμικά που η ετεροχρωματίνη περιορίζεται κυρίως στο κεντρομέρος. Το Y χρωμόσωμα παρουσιάζεται με το σχήμα τελείας (dot chromosome), ενώ το X εμφανίζεται με μέγεθος σχεδόν το μισό του μικρότερου αυτοσώματος, με τη μεταξύ τους αναλογία μήκους Y/X να ισούται με 0.20 (Mavragani-Tsipidou 2002). Το σύστημα αρίθμησης που ακολουθήθηκε για την αναγνώριση των χρωμοσωμάτων βασίστηκε στο αντίστοιχο που υποδείχθηκε από τους Redu et al. (1975) για την *Ceratitidis capitata*, σύμφωνα με το οποίο καθορίζεται ως πρώτο το φυλετικό ζεύγος,



Εικόνα 1.3-1 Μιτωτικά μεταφασικά χρωμοσώματα από εγκεφαλικά γάγγλια α) θηλυκής και β) αρσενικής προνύμφης του *B. oleae* (Mavragani – Tsipidou 2002).

ακολουθούμενο από τα υπόλοιπα αυτοσωμικά σε σειρά μειούμενου μεγέθους (2 έως 6). Μεταξύ των αυτοσωμικών, τα δύο μεγαλύτερα χρωμοσώματα 2 και 3 εμφανίζουν ελάχιστες διαφορές στο μέγεθός τους, ενώ τα τρία μικρότερα (4, 5 και 6) παρουσιάζονται σχεδόν ισομεγέθη. Κατά την κυτταρολογική ανάλυση του μεταφασικού πυρήνα του δάκου, τα ομόλογα χρωμοσώματα δεν είναι διάσπαρτα στο παρασκεύασμα, αλλά εμφανίζουν σωματική σύναψη και εντοπίζονται το ένα δίπλα στο άλλο, ένα γνώρισμα χαρακτηριστικό της τάξης των Διπτέρων (Kounatidis et al. 2008).

1.3.3 Προέλευση και δομή πολυταινικών χρωμοσωμάτων

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα παρατηρήθηκαν για πρώτη φορά το 1881 από τον Balbiani κατά την ιστολογική ανάλυση των σιελογόνων αδένων των προνυμφών του *Chironomus plumosus*, με την επιστημονική κοινότητα να επικεντρώνει το ενδιαφέρον της ξανά το 1933 σε μια αντίστοιχη μελέτη του Painter στη *D. melanogaster*. Έκτοτε τα χρωμοσώματα αυτά, με τη χαρακτηριστική μορφολογία και την κυλινδρική επιμήκη δομή, έχουν αναφερθεί σε συγκεκριμένους ιστούς διαφόρων οργανισμών, μεταξύ των οποίων και μη Δίπτερα (κολλέμβολα έντομα, πρωτόζωα, αγγειόσπερμα φυτά), υστερώντας ωστόσο στην ποιότητα της δομής τους (Clark & Wall 1996). Το φαινόμενο της πολυταινικότητας εντοπίζεται σε κύτταρα τόσο προνυμφικών ιστών που ιστολούνται κατά τη διάρκεια της μεταμόρφωσης (π.χ.

σιελογόνοι αδένες, λιπαρά σωματίδια), όσο και ιστών που παραμένουν άθικτοι ως την ενηλικίωση (π.χ. μαλπιγγειανά σωληνάκια) (για ανασκόπηση Zhimulev et al. 2004).

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα αναπτύσσονται ως αποτέλεσμα της ενδομίτωσης, μιας μορφής πυρηνοδιαίρεσης. Δημιουργούνται από διαδοχικές φάσεις αντιγραφής του γενετικού υλικού ενός μιτωτικού διπλοειδούς πυρήνα, χωρίς αποχωρισμό των ομόλογων χρωματίδων σχηματίζοντας μια δέσμη χρωμονημάτων. Στις γιγαντιαίες δομές που προκύπτουν, τα χρωμοσωμικά νημάτια παραμένουν σε στενή σύζευξη και είναι απόλυτα ευθυγραμμισμένα στις ομόλογες θέσεις τους. Ωστόσο ο βαθμός πολυταινισμού των χρωμοσωμάτων διαφοροποιείται ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης και τον ιστό, έχοντας επίσης παρατηρηθεί διαφοροποίηση ακόμα και μεταξύ περιοχών της ίδιας χρωματίδας. Στην τελευταία περίπτωση συμπεριλαμβάνονται περιοχές περικεντρομερικές, τελομερικές ή πλούσιες σε διαζευκτική ετεροχρωματίνη, στις οποίες η μειωμένη αντιγραφή του γενετικού υλικού οδηγεί σε χαμηλά ποσοστά πολυταινισμού.

Η διεύθεση των χρωμονημάτων κατά μήκος ενός πολυταινικού χρωμοσώματος έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό μιας ορατής διαδοχής σκουρόχρωμων περιοχών, των ζωνών (bands), που αντιστοιχούν στα χρωμομερή και των ενδιάμεσων ανοιχτόχρωμων περιοχών τους, τις μεσοζώνες (interbands). Η εναλλασσόμενη αυτή σειρά ζωνών και μεσοζωνών δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό πρότυπο ζώνωσης. Ο αριθμός, η μορφή και η κατανομή των ζωνών σε κάθε πολυταινικό χρωμοσώμα, χαρακτηρίζει το είδος, τον ιστό και το αναπτυξιακό στάδιο. Έτσι, ενώ το πρότυπο των ζωνών είναι χαρακτηριστικό για κάθε στέλεχος ενός είδους, ο βαθμός της πολυταινικότητας μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ιστών του. Επιπλέον, κατά μήκος των πολυταινικών χρωμοσωμάτων ορισμένες ζώνες μεταπίπτουν παροδικά σε μια ιδιαίτερη δομική διαμόρφωση, στην οποία η χρωματίνη αποσυσπειρώνεται και προβάλλει από τον άξονα του χρωμοσώματος σχηματίζοντας χαρακτηριστικές διογκώσεις που ονομάζονται βρόχοι (puffs). Οι

βρόχοι αντιστοιχούν σε θέσεις σύνθεσης RNA και αντανακλούν μορφολογικά τη γονιδιακή έκφραση. Όσον αφορά τα κεντρομερή των πολυταινικών χρωμοσωμάτων, σε ορισμένα είδη (π.χ. *Drosophila*) συναθροίζονται για να σχηματίσουν μια χαρακτηριστική δομή, το χρωμόκεντρο, το οποίο αποτελείται κυρίως από ετεροχρωματίνη. Αντίθετα σε είδη της οικογένειας Terphritidae δεν παρατηρείται η δομή αυτή.

Ο σταθερός αριθμός και η γραμμική διευθέτηση των ζωνών παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1930 σε στελέχη της *D. melanogaster*, όταν ανακαλύφθηκε ότι σχηματίζουν έναν κυτταρολογικό χάρτη των χρωμοσωμάτων. Οι αναδιατάξεις, όπως ελλείμματα, αναστροφές και διπλασιασμοί, έχουν ως συνέπεια την αλλαγή της γραμμικής διάταξης των ζωνών η οποία αντιστοιχεί στη γραμμική διάταξη των γονιδίων. Έτσι οι γενετικές αναδιατάξεις, όπως φαίνονται σε ένα χάρτη σύνδεσης, είναι δυνατόν να συσχετιστούν με μορφολογικές αναδιατάξεις στον κυτταρολογικό χάρτη.

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

των πολυταινικών χρωμοσωμάτων μέσω του *in situ* υβριδισμού συσχετίζοντας μοριακά και γενετικά δεδομένα (Gariou – Papalexίου et al. 2002).

1.3.4 Πολυταινικά χρωμοσώματα στο δάκο

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου, αναγνωρίστηκαν για πρώτη φορά το 1963 (Krimbas) οπότε και περιγράφηκαν 10 πολυταινικοί βραχίονες μεγάλου μήκους και δύο πολύ μικρότεροι. Ωστόσο τα αποτελέσματα αυτής της περιγραφής ήταν δύσκολο να χρησιμοποιηθούν σε κυτταρογενετικές μελέτες. Νέα ώθηση στο επίπεδο αυτό δόθηκε τρεις δεκαετίες αργότερα, όταν ήταν πλέον διαθέσιμοι φωτογραφικοί χάρτες των πολυταινικών χρωμοσωμάτων διαφορετικής ιστικής προέλευσης: του λιπώδους ιστού (Mavragani – Tsiroidou et al. 1992), των σιελογόνων αδένων και των μαλπιγγειανών σωληναρίων (Zampetaki et al. 1995). Από τις παραπάνω μελέτες διαπιστώθηκε η ύπαρξη 5 χρωμοσωμάτων, καθένα από τα οποία περιλαμβάνει δύο βραχίονες ενωμένους στο κεντρομέρος, που παρουσιάζουν αντιστοιχία με τα πέντε αυτοσωμικά χρωμοσώματα των πυρήνων της μίτωσης, καθώς και μια δομή ετεροχρωματίνης που πιθανολογείται ότι αντιστοιχεί στα φυλετικά χρωμοσώματα. Η δομή αυτή διαφοροποιείται όσον αφορά το μέγεθος και την πυκνότητα, ανάλογα με το φύλο καθώς στα θηλυκά εμφανίζεται μεγαλύτερη και περισσότερο συμπαγής (Zampetaki et al. 1995). Άλλα χαρακτηριστικά των πολυταινικών χρωμοσωμάτων που ανέδειξαν οι έρευνες ήταν η σταθερότητα του προτύπου ζωνώσεων μεταξύ διαφορετικών ιστών του ίδιου στελέχους και η απουσία ενός τυπικού χρωμόκεντρου ως συσσώρευση ετεροχρωματίνης, με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται η μεταξύ των χρωμοσωμάτων ανεξαρτησία και συνεπώς ο σαφής διαχωρισμός τους. Επιπλέον διαπιστώθηκε η ύπαρξη αντίστροφων διαδοχικών διπλασιασμών καθώς και η παρουσία δακτυλιοειδών άκρων στους χρωμοσωμικούς βραχίονες (Mavragani – Tsiroidou 2002).

Τα κυτταρογενετικά αυτά δεδομένα αποτέλεσαν τη βάση για την περαιτέρω αξιοποίησή τους σε τεχνικές όπως ο *in situ* υβριδισμός. Η εφαρμογή της παραπάνω μεθόδου έδωσε τη δυνατότητα χαρτογράφησης 10 αλληλουχιών DNA στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου, χρησιμοποιώντας εννιά ετερόλογους δείκτες της *C. capitata* και ενός της *D. melanogaster*, ώστε να είναι πλέον διαθέσιμοι μοριακοί δείκτες για όλα τα σωματικά χρωμοσώματα (Zampetaki et al. 1999). Με τον τρόπο αυτό έγινε εφικτή η συσχέτιση γενετικών και μοριακών πληροφοριών μεταξύ των στελεχών του εντόμου καθώς και ο καθορισμός ομολογιών με άλλα είδη της οικογένειάς του. Με την ίδια τεχνική χαρτογραφήθηκαν αργότερα 13 μικροδορυφορικοί δείκτες του *B. oleae* (Augustinos et al. 2008). Επιπλέον, μελέτες με πεδίο έρευνας την απόκριση του δάκου στο περιβαλλοντικό στρες, επικεντρώθηκαν στο πρότυπο των θερμοεπαγόμενων διογκώσεων που προκαλούνται στα χρωμοσώματα και οδήγησαν στην απομόνωση και χαρτογράφηση γονιδίων θερμικού σοκ (Zampetaki et al. 2000, Drosopoulou et al. 2009).

1.3.5 Δομή Υ χρωμοσώματος

Το Υ χρωμόσωμα εμφανίζει σαφή μορφολογική και γενετική διαφοροποίηση συγκριτικά με το έτερο φυλετικό χρωμόσωμα Χ, όσο και με τα υπόλοιπα αυτοσωμικά χρωμοσώματα ενός ετερογαμετικού οργανισμού (Charlesworth 1996). Τα κύρια χαρακτηριστικά των Υ χρωμοσωμάτων που παρουσιάζονται κοινά σε όλους τους ετερογαμετικούς οργανισμούς είναι η ετεροχρωματική τους φύση, ο μικρός αριθμός γονιδίων που κωδικοποιούν λειτουργικά προϊόντα αναλογικά με τα αυτοσωμικά χρωμοσώματα και ο εμπλουτισμός τους σε αλληλουχίες χαμηλής πολυπλοκότητας.

Τα πιο εις βάθος μελετημένα Υ χρωμοσώματα είναι του ανθρώπου και της *Drosophila melanogaster* (Lahn et al. 2001, Carvalho 2002). Το Υ χρωμόσωμα του ανθρώπου μεγέθους ~60 Mb συνίσταται κατά το ήμισυ από ετεροχρωματίνη, ενώ το ποσοστό που αντιστοιχεί σε ευχρωματίνη εμφανίζει μια μωσαϊκή δομή, αποτελούμενη από αλληλουχίες που έχουν προκύψει από τον εκφυλισμό και τη μετάθεση αλληλουχιών του Χ (Χ-

Προέλευση Υ χρωμοσώματος

Η κυρίαρχη άποψη σχετικά με την προέλευση των φυλετικών χρωμοσωμάτων υποστηρίζει ότι προέκυψαν από ένα ομόλογο ζεύγος χρωμοσωμάτων (πρωτο-Υ και πρωτο-Χ), τα οποία σταδιακά διαφοροποιήθηκαν εξαιτίας του περιορισμένου γενετικού ανασυνδυασμού μεταξύ των γονιδίων τους, οδηγώντας τελικά στον εκφυλισμό του Υ (Rice 1994). Στη μη αναστρέψιμη αυτή διαδικασία εμπλέκονται σημειακές μεταλλάξεις, ελλείψεις, προσθήκες, διαδοχικοί διπλασιασμοί και μαζική συσσώρευση μεταθετών στοιχείων, με αποτέλεσμα την απενεργοποίηση ή απώλεια της πλειονότητας των γονιδίων που εντοπίζονται στο πρωτο-Υ (Steinemann & Steinemann 2000). Με τον τρόπο αυτό τελικά παρέμειναν λειτουργικά μόνο τα γονίδια ζωτικής σημασίας για την γονιμότητα ή και τον καθορισμό του φύλου στα αρσενικά άτομα (Carvalho 2000). Οι μηχανισμοί που οδηγούν στον εκφυλισμό του Υ χρωμοσώματος αποτελούν ακόμα και σήμερα πεδίο έρευνας των εξελικτικών βιολόγων. Αρκετές θεωρίες έχουν αναπτυχθεί σχετικά με τις αιτίες που προκαλούν τον εκφυλισμό όπως το μοντέλο του οδοντωτού τροχού της Muller (Muller's ratchet), της επιλογής υποστρώματος (background selection), του φαινομένου "Hill Robertson" της ασθενούς επιλογής, καθώς και το μοντέλο συμπαράσυρσης (hitchhiking) επιβλαβών αλληλομόρφων συνδεδεμένων με επιλεγόμενες μεταλλάξεις (για ανασκόπηση Charlesworth & Charlesworth 2000). Ωστόσο σε όλες γίνεται σαφές ότι στον εκφυλισμό εμπλέκεται η μείωση του δραστικού μεγέθους του πληθυσμού σαν αποτέλεσμα των επιλεκτικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα σε περιοχές μειωμένου ανασυνδυασμού, με επακόλουθο την ασθενή επίδραση της φυσικής επιλογής.

degenerated and X-transposed sequences) καθώς και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (amplicons) της αρρενοειδικής μη-ανασυνδυαζόμενης περιοχής (Male Specific Region, MSY) (Skaletsky et al. 2003). Παρόμοια, στη *D. melanogaster* το Y χρωμόσωμα είναι εξ ολοκλήρου ετεροχρωματινικό μεγέθους ~40 Mb, περιλαμβάνοντας μόλις 15 γονίδια και αλληλουχίες υψηλής και μέτριας επαναληψιμότητας, όπως επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και μεταθετά στοιχεία (Carvalho 2002).

Σε πολλά είδη της τάξης των Διπτέρων, συμπεριλαμβανομένης της οικογένειας Tephritidae, στο Y χρωμόσωμα εντοπίζεται ο παράγοντας αρρενοποίησης (male-determining factor, M). Ο παράγοντας αυτός ρυθμίζει τον φυλοκαθορισμό στα αρσενικά άτομα παρεμποδίζοντας τη ρυθμιστική λειτουργία ζωτικών φυλοκαθοριστικών γονιδίων. Ωστόσο, η μοριακή του φύση και ο ακριβής του ρόλος δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί (Saccone et al. 2002, Shearman 2002). Ειδικότερα στο είδος *C. capitata* ο παράγοντας M εντοπίζεται στο πρώτο τρίτο του μεγάλου βραχίονα γειτονικά του κεντρομερούς, σε περιοχή που συνιστά το 15% του συνολικού μεγέθους του Y χρωμοσώματος (Willhoeft & Franz 1996). Επίσης, δεν εντοπίστηκαν ομόλογα γονίδια που ρυθμίζουν τη γονιμότητα, όπως για παράδειγμα στη *Drosophila*, ενώ απομονώθηκαν Y-ειδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Anleitner & Haymer 1992, Zhou et al. 2000).

Αντίστοιχη θεωρείται και η δομή του Y χρωμοσώματος του δάκου, η μελέτη του οποίου υστερεί σημαντικά συγκριτικά με εκείνη της συγγενικής *C. capitata*, με τις ελάχιστες διαθέσιμες πληροφορίες να αφορούν την απομόνωση Y-ειδικών επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Gabrieli et al. 2011).

1.4 ΜΟΡΙΑΚΗ & ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Όπως διατυπώθηκε παραπάνω, για την ανάπτυξη εναλλακτικών, εκλεκτικών και φιλικών

προς το περιβάλλον μεθόδων ελέγχου του εντόμου, απαιτείται η έρευνα και η κατανόηση όχι μόνο της βιολογίας – οικολογίας του αλλά και της γενετικής του. Πλήθος δημοσιεύσεων είναι διαθέσιμες σχετικά με τη βιολογία και συμπεριφορά του δάκου, όσον αφορά τους παράγοντες που επηρεάζουν τη διατροφή και διαβίωσή του, τη σύζευξη και την ωτοκία (για ανασκόπηση Danee and Johnson 2010) καθώς και τις τεχνικές παραμέτρους που εμπλέκονται στην εργαστηριακή μαζική ανάπτυξη των στελεχών του (Mazomenos 1989, Tzanakakis 1989).

Οι πρώτες γενετικές πληροφορίες καταγράφηκαν σε επίπεδο ενζυμικών πολυμορφισμών σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου (Zougos et al. 1982). Περαιτέρω αναλύσεις στο γενετικό τόπο της αλκοολικής αφυδρογονάσης (*Adh*) οδήγησαν στο βιοχημικό χαρακτηρισμό του μορίου (Mazi et al. 1998) και την κλωνοποίηση των γονιδίων της *Adh*, προτείνοντας τη δυνατότητα χρήσης τους ως δείκτες για το μετασηματισμό του εντόμου (Benos et al. 2000, Goulielmos et al. 2001; 2003).

Επιπλέον μοριακές προσεγγίσεις είχαν σαν αποτέλεσμα την κατασκευή μιας γονιδιωματικής και δύο cDNA βιβλιοθηκών που προέρχονταν από ενήλικα άτομα δάκου και των δύο φύλων και την κλωνοποίηση των γονιδίων *Sxl* (*Sex-lethal*), *dsx* (*double sex*) και *tra* (*transformer*) που εμπλέκονται στα μονοπάτια φυλοκαθορισμού (Lagos et al. 2005; 2007), καθώς και την κλωνοποίηση του γονιδίου *Ovo/svb* (*Ovo/shavenbaby*) που κωδικοποιεί μεταγραφικούς παράγοντες που ελέγχουν τη διαφοροποίηση των γαμετικών κυττάρων στα θηλυκά άτομα καθώς και κυττάρων της επιδερμίδας (Khila et al. 2003).

Το ενδιαφέρον των ερευνητών στράφηκε επίσης στη διερεύνηση της ανθεκτικότητας των πληθυσμών του δάκου που υπόκεινται στη δράση κλασικών εντομοκτόνων, όπως τα οργανοφωσφορικά, με κύριο πεδίο μελέτης το γενετικό τόπο της ακετυλοχολινεστεράσης, με αποτέλεσμα την κλωνοποίηση και ανάλυσή του καθώς και την ανίχνευση μεταλλάξεων που εμπλέκονται στην ανάπτυξη της ανθεκτικότητας

(Vontas et al. 2001; 2002, Hawkes et al. 2005, Kakani et al. 2008; 2011). Πρόσφατες έρευνες έχουν εστιάσει επιπλέον και στη διερεύνηση της ανθεκτικότητας των πληθυσμών του δάκου στο φυσικό νατουραλίτη *spinosad* που κατατάσσεται στα νέας γενιάς εντομοκτόνα (Kakani et al. 2010).

Επιπλέον, η διαθεσιμότητα της πλήρους αλληλουχίας του μιτοχονδριακού DNA (Nardi et al. 2003) παράλληλα με την απομόνωση και το χαρακτηρισμό 64 αλληλουχικών μικροδορυφορικών δεικτών, έδωσαν νέα ώθηση σε αναλύσεις της πληθυσμιακής δομής και της γενετικής ροής των φυσικών πληθυσμών του εντόμου, καθώς και στη διερεύνηση της πορείας εξάπλωσής του στη λεκάνη της Μεσογείου και την Καλιφόρνια (Augustinos et al. 2002; 2005; 2008, Nardi et al. 2005, Zygouridis et al. 2009). Τέλος, χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερης σημασίας η επίτευξη του γενετικού μετασχηματισμού του δάκου με χρήση του μεταθετού στοιχείου *Minos* (Koukidou et al. 2006) παρέχοντας πλέον νέες προοπτικές και δυνατότητες προς την κατεύθυνση της επιτυχούς εφαρμογής της SIT.

Οι τελευταίες αυτές ανακαλύψεις παρέχουν την ελπίδα ότι ο δάκος θα μπορούσε σε σύντομο χρονικό διάστημα να καταστεί στόχος των εναλλακτικών μεθόδων ελέγχου που περιγράφηκαν νωρίτερα. Η έρευνα που παρουσιάζεται στην παρούσα διατριβή ευελπιστεί να συνεισφέρει στο επίπεδο της γονιδιωματικής ανάλυσης του εντόμου, πεδίο ουσιαστικά ανεξερεύνητο. Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν επιλεγμένα στοιχεία γονιδιωματικής που αφορούν την οργάνωση των γονιδιωμάτων, την κατανομή και ταξινόμηση των μεταγραφικών μονάδων, τα μεταθετά τους στοιχεία και άλλες επαναλήψεις και, τέλος, τη φυσική χαρτογράφηση του γονιδιώματος.

1.5 ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Ο όρος «γονιδιωματική» (genomics) εισήχθηκε κατά τη δεκαετία του 1990 οπότε και αναπτύχθηκαν τεχνικές αλληλούχησης και

χαρτογράφησης μεγάλης κλίμακας. Παράλληλα την περίοδο αυτή δημιουργήθηκε και ο κλάδος της βιοπληροφορικής για την ερμηνεία, διαχείριση και αποθήκευση του όγκου δεδομένων και πληροφοριών που συσσωρεύονταν εκθετικά. Καθιερώθηκε επομένως ως γονιδιωματική, η πειραματική και υπολογιστική ανάλυση μεγάλης κλίμακας (holistic and systematic), σε επίπεδο ολόκληρου γονιδιώματος και όχι μεμονωμένων γονιδίων, με μεθόδους υψηλής παραγωγικότητας (high-throughput).

Ο καθορισμός μιας γονιδιωματικής αλληλουχίας αποτελεί παρ' όλα αυτά την απαρχή μιας γονιδιακής ανάλυσης. Εφόσον αυτός έχει ολοκληρωθεί, η γονιδιωματική αλληλουχία χρησιμοποιείται περαιτέρω για τη μελέτη και τον χαρακτηρισμό λειτουργικών γνωρισμάτων των γονιδίων και των γονιδιωμάτων (functional genomics), τη σύγκριση αλληλουχιών ανάμεσα σε διαφορετικούς οργανισμούς για την κατανόηση των βιολογικών διεργασιών και την εξαγωγή συμπερασμάτων τόσο σε εξελικτικό όσο και σε λειτουργικό επίπεδο (comparative genomics) ή τη διερεύνηση τριτοταγών πρωτεϊνικών δομών και κατ' επέκταση της λειτουργίας τους (structural genomics).

Η ανάπτυξη της γονιδιωματικής έχει δώσει νέα ώθηση στη βιολογική έρευνα, καθιστώντας ιδιαίτερη πρόκληση την αξιοποίηση των διαθέσιμων πληροφοριών σε πληθώρα εφαρμοσμένων πεδίων της επιστήμης. Στη μοριακή εντομολογία συγκεκριμένα (Chilana et al. 2012), οι γονιδιωματικές αναλύσεις δρώντας συνεργιστικά με κλασσικές γενετικές προσεγγίσεις, βρίσκουν εφαρμογή στη μελέτη σημαντικών αγρονομικών ή υγειονομικών χαρακτηριστικών βοηθώντας στην αποτελεσματική αντιμετώπιση των πληθυσμών των εντόμων.

1.6 ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Ο χαρακτηρισμός των χρωμοσωμάτων ενός οργανισμού είναι βασική προϋπόθεση για την

οποιαδήποτε προσπάθεια διερεύνησης της μοριακής οργάνωσης του γονιδιώματός του. Παράλληλα όμως, απαιτείται και η ανάλυση και μελέτη στοιχείων του γονιδιώματός του, με σκοπό τη διαλεύκανση βιολογικών και εξελικτικών μηχανισμών και αλληλεπιδράσεων. Μέχρι σήμερα έχουν χαρακτηριστεί ή βρίσκονται υπό ανάλυση γονιδιώματα πολλών οργανισμών, μεταξύ των οποίων και περισσότερα των 70 εντόμων (NCBI Genome_list:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genoms/leuks.cgi>), είτε λόγω της υψηλής σημασίας τους στην αγρο-οικονομία και τη δημόσια υγεία, είτε επειδή συγκαταλέγονται σε οργανισμούς – μοντέλα, παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά τη δομή και την οργάνωση των γονιδιωμάτων τους, αλλά και καθιστώντας εφικτές συγκριτικές αναλύσεις με άλλα συγγενικά είδη που υστερούν στην μοριακή και γενετική τους ανάλυση.

1.6.1 Μέγεθος και πολυπλοκότητα του γονιδιώματος

Απαραίτητη προϋπόθεση της ανάλυσης του γονιδιώματος ενός οργανισμού είναι η εκτίμηση του μεγέθους του. Το μέγεθος ενός γονιδιώματος αποτελεί το απλοειδές ποσό του γενετικού υλικού που περιέχεται σε ένα κύτταρό του και αναφέρεται ως τιμή C (C-value). Οι κλασικές μέθοδοι εκτίμησης του μεγέθους, βασίζονται είτε στην κινητική επανασύνδεσης μεγαλομοριακού DNA (Cot assay), είτε στον καθορισμό των φωσφορικών ομάδων του DNA που απομονώνεται από συγκεκριμένο αριθμό κυττάρων. Στην τελευταία περίπτωση, ωστόσο, διαπιστώθηκε συχνά υπερεκτίμηση του υπολογιζόμενου μεγέθους του υπό εξέταση γονιδιώματος, λόγω της ταυτόχρονης μέτρησης και φωσφορικών ομάδων που προέρχονταν από άλλες πηγές (RNA και νουκλεοτίδια του πυρήνα). Πιο πρόσφατες τεχνικές αξιοποιούν φθορίζουσες χρωστικές ειδικές προς το DNA σε αναλύσεις κυτταρομετρίας ροής ή κυτταρομετρίας απορρόφησης μετά από χρώση Feulgen. Εντούτοις, τελευταία έχουν αναπτυχθεί και νέες πιο ευέλικτες προσεγγίσεις που βασίζονται

στην ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (real-time PCR) για την απόλυτη ποσοτικοποίηση γενετικών στοιχείων σε δεδομένη ποσότητα γονιδιωματικού DNA (Wilhelm et al. 2003).

Τα ευκαρυωτικά γονιδιώματα απαντώνται σε μεγάλο εύρος μεγεθών και επηρεάζονται από ποικίλες εξελικτικές διαδικασίες (για ανασκόπηση Petron 2001). Ωστόσο η γενετική πολυπλοκότητα και ο αριθμός γονιδίων ενός οργανισμού δεν σχετίζονται άμεσα με το μέγεθος του γονιδιώματός του, εφόσον έχει διαπιστωθεί μεγάλη διακύμανση μεγέθους μεταξύ οργανισμών του ίδιου φύλου ή και οικογένειας (Kidwell 2002). Στα περισσότερα από εβδομήντα είδη εντόμων των οποίων έχει ήδη ολοκληρωθεί ο προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής τους αλληλουχίας ή βρίσκεται υπό εξέλιξη, έχει παρατηρηθεί μεγάλη ποικιλομορφία ως προς το μέγεθος των γονιδιωμάτων τους (NCBI Genome list: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>).

Το εύρος της διακύμανσης αυτής συμπίπτει με το αντίστοιχο παρατηρούμενο εύρος στα είδη της τάξης των Διπτέρων: μέχρι σήμερα, τα είδη του γένους *Drosophila* αντιπροσωπεύουν το χαμηλότερο όριο [120 Mb, (0.14 pg) (Gregory 2011)], ενώ το κουνούπι *Aedes aegypti* το υψηλότερο (1374 Mb, Severson et al. 2004). Επιπλέον, σημαντικές αποκλίσεις παρατηρούνται ακόμα και σε επίπεδο οικογένειας με χαρακτηριστικά παραδείγματα τα είδη *Anopheles gambiae* (278 Mb) και *Aedes aegypti* (1374 Mb) (Severson et al. 2004). Αν και δεν υπάρχουν σαφή στοιχεία που να ερμηνεύουν αυτή τη διαφοροποίηση ανάμεσα στα μεγέθη των δύο γονιδιωμάτων, ωστόσο ίσως το γεγονός αυτό δεν προκαλεί έκπληξη δεδομένης της εξελικτικής απόστασης μεταξύ των ειδών της οικογένειας Culicidae των κουνουπιών, από το διαχωρισμό των οποίων έχει υπολογιστεί ότι έχουν μεσολαβήσει 95 εκατ. χρόνια (Myr) (Krzywinski et al. 2001). Παρόμοιες διαπιστώσεις προέκυψαν και κατά τη σύγκριση των μεγεθών των γονιδιωμάτων μεταξύ των υποειδών της *Drosophila melanogaster* (Boulesteix et al. 2006, Gregory & Johnston 2008), τα οποία έχει υπολογιστεί ότι διαχωρίστηκαν από

τον πιο κοντινό κοινό τους πρόγονό 10-15 Myr (Lachaise & Silvain 2004).

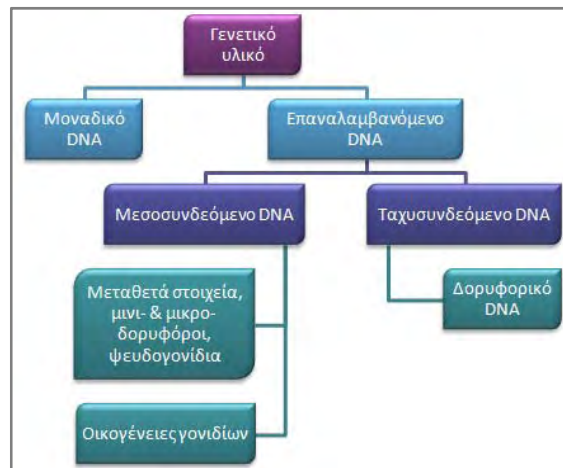
Η εμφανής αυτή παραδοξότητα (C-value paradox) αποσαφηνίστηκε με βάση τα δεδομένα ανάλυσης της πλήρους νουκλεοτιδικής αλληλουχίας διαφόρων ευκαρυωτικών οργανισμών, σύμφωνα με τα οποία η πολυπλοκότητα προκύπτει σε μεγάλο βαθμό από τις διαφορές σε μη κωδικές και επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και όχι στον αριθμό των λειτουργικών γονιδίων (Hartl 2000, Petron 2001).

Τα δεδομένα που αφορούν το μέγεθος του γονιδιώματος ενός οργανισμού συνιστούν σημαντικές πληροφορίες που είναι επιθυμητό να συνοδεύουν κάθε γονιδιωματική προσέγγιση, ώστε να παρέχεται μια πρώτη εκτίμηση της πολυπλοκότητάς του. Επιπλέον η γνώση του μεγέθους του γονιδιώματος μπορεί να συνεισφέρει στην αποδοτικότερη εφαρμογή μοριακών τεχνικών, όπως για παράδειγμα στην αποτελεσματική εκτίμηση του βαθμού κάλυψης κατά την ανάλυση βιβλιοθηκών, ώστε ο αριθμός των προς διερεύνηση κλώνων να εξασφαλίζει την πλήρη αντιπροσώπευση των αλληλουχιών του γονιδιώματος. Παράλληλα αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση σε αναλύσεις που αφορούν επαναλαμβανόμενα στοιχεία και ειδικότερα τον καθορισμό του βαθμού συμμετοχής τους στη δομή του γονιδιώματος.

1.6.2 Οργάνωση γονιδιώματος

Τα γονιδιώματα αποτελούν καθόλα δυναμικά, παρά στατικά σύνολα με ιδιαίτερη πολυπλοκότητα. Η μοριακή οργάνωση των γονιδιωμάτων μπορεί να προσεγγιστεί σε διάφορα επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της νουκλεοτιδικής σύστασής της αλλά και της λειτουργικότητας των στοιχείων τους.

Στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς το γενετικό υλικό χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, το μοναδικό και το επαναλαμβανόμενο DNA, όπως αποδεικνύουν πειράματα κινητικής επανασύνδεσης. Το μοναδικό DNA (unique DNA)



Εικόνα 1.6-1 Μοριακή οργάνωση γονιδιώματος σε επίπεδο επαναληψιμότητας των αλληλουχιών, στο σύνολο του γενετικού υλικού.

αποτελεί σχετικά μικρό ποσοστό του συνολικού γονιδιώματος. Στη δεύτερη κατηγορία κατατάσσεται το επαναλαμβανόμενο DNA, που συνιστά το μεγαλύτερο ποσοστό του γονιδιώματος και διακρίνεται περαιτέρω στο μεσοσυνδεδεμένο και το ταχυσυνδεδεμένο DNA (Golubovskiy & Manton 2005).

Το μεσοσυνδεδεμένο DNA (moderately repetitive DNA) χαρακτηρίζεται από μέτρια επαναληψιμότητα των αλληλουχιών. Περιλαμβάνει επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες λειτουργικές ή μη, που συγκροτούν οικογένειες διάσπαρτες ή εν σειρά στο γονιδίωμα, καταλαμβάνοντας περιοχές έως 30 Kb. Κάθε οικογένεια συνήθως αποτελείται από παρόμοια και όχι απαραίτητα πανομοιότυπα αντίγραφα. Στο λειτουργικό μεσοσυνδεδεμένο DNA υπάγονται τα tRNA γονίδια, τα rDNA, τα γονίδια ιστονών, καθώς και ρυθμιστικές αλληλουχίες και ψευδογονίδια. Η ύπαρξη πολλαπλών αντιγράφων των γονιδίων αυτών, ερμηνεύεται ως αποτέλεσμα της ανάγκης των κυττάρων για διαθεσιμότητα ιδιαίτερα μεγάλων ποσοτήτων των γονιδιακών προϊόντων. Το μεσοσυνδεδεμένο DNA στο οποίο δεν έχει αποδοθεί κάποιος λειτουργικός ρόλος, αναφέρεται στις μικροδορυφορικές και μινιδορυφορικές αλληλουχίες, όπως επίσης και στα μεταθετά στοιχεία που εντοπίζονται σε διάσπαρτες θέσεις στο γονιδίωμα. Αντίθετα στο ταχυσυνδεδεμένο DNA (highly repetitive DNA), η

επαναληψιμότητα των αλληλουχιών είναι ιδιαίτερα υψηλή, που μπορεί να φτάσει πολλά εκατομμύρια αντίγραφα σε κάθε απλοειδή χρωμοσωματική σειρά και ουσιαστικά αναφέρεται στο δορυφορικό DNA (satellite DNA).

1.6.3 Κατανομή & ταξινόμηση γονιδίων

Στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς η κατανομή των γονιδίων δεν είναι διόλου τυχαία, αν και εμφανίζονται σημαντικές διακυμάνσεις ως προς την πυκνότητά τους σε διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος. Η ολοκλήρωση της αλληλούχισης των γονιδιωμάτων του ανθρώπου και της *Drosophila* επιβεβαίωσε τις ενδείξεις που πρότειναν αυτή την ανομοιογένεια, υποστηρίζοντας ότι προκύπτει ως απόρροια της ποικιλότητας της νουκλεοτιδικής σύστασης κατά μήκος των χρωμοσωμάτων των οργανισμών.

Έχουν αναπτυχθεί αρκετοί τρόποι για την κατηγοριοποίηση των γονιδίων σε ένα ευκαρυωτικό γονιδίωμα, ανάμεσα στους οποίους κυριαρχεί η ταξινόμησή τους σε κατηγορίες σύμφωνα με την λειτουργία τους. Εναλλακτικά τα γονίδια κατηγοριοποιούνται βάσει των δομικών χαρακτηριστικών των πρωτεϊνικών προϊόντων που κωδικοποιούν.

Τα πρότυπα κατάταξης που προκύπτουν με βάση τη λειτουργία των γονιδίων προτείνουν ότι οι βασικές κατηγορίες των γονιδίων είναι κοινές ανάμεσα σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, με τους πιο σύνθετους από αυτούς να παρουσιάζουν αυξημένο αριθμό γονιδίων ανά κατηγορία και συνεπώς οι παρατηρούμενες διαφορές στην οργάνωση των κατηγοριών να αντικατοπτρίζουν τελικά διαφορές σε οργανισμικό επίπεδο. Παράλληλα ανάμεσα στα είδη παρατηρείται αξιοσημείωτη διακύμανση και στην κατανομή των κωδικών τους περιοχών, στον αριθμό των εξόνων ανά γονίδιο και στο εύρος των μηκών τους, όπως επίσης και στη σύσταση των κωδικονίων τους με αποτέλεσμα τη διαφορετική συχνότητα χρήσης και των αμινοξέων στα πρωτεϊνικά προϊόντα που κωδικοποιούν.

Η συσσώρευση πληροφοριών από τα προγράμματα αλληλούχισης σε συνάρτηση με την ανάπτυξη βιοπληροφορικών συστημάτων διευκόλυνε τη διαδικασία ταξινόμησης των γονιδίων σε λειτουργικές ομάδες. Πλέον η διαθεσιμότητα στις βάσεις δεδομένων της πλήρους αλληλουχίας γονιδίων επιτρέπει τη σύγκριση και κατ' επέκταση τον *in silico* χαρακτηρισμό ορθόλογων γονιδίων μεταξύ των ειδών και της λειτουργίας των πρωτεϊνών που κωδικοποιούν. Προς την κατεύθυνση αυτή αναπτύχθηκε η Βάση Δεδομένων της Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology, GO). Πρόκειται για ένα δομημένο και ιεραρχημένο λεξιλόγιο βιολογικών όρων, η χρήση των οποίων διευκολύνει την περιγραφή και τον ορισμό των βιολογικών στοιχείων που χαρακτηρίζουν ένα γονιδίωμα (The Gene Ontology Consortium 2000). Χρησιμοποιείται για την απεικόνιση των λειτουργικών ιδιοτήτων των γονιδίων και των προϊόντων έκφρασής τους σε διάφορες βάσεις δεδομένων, σχετικά με τις λειτουργίες που επιτελούν σε μοριακό επίπεδο, τις βιολογικές διεργασίες στις οποίες συμβάλλουν και τα μέρη του κυττάρου στα οποία επιδρούν. Δομικά η GO διαιρείται σε τρεις οντολογίες, οι κορυφαίοι κόμβοι (έννοιες) ταξινόμησης των οποίων είναι η βιολογική διαδικασία (biological process), η μοριακή λειτουργία (molecular function) και το κυτταρικό συστατικό (cellular component). Η καθολική χρήση ενός κοινού και τυποποιημένου λεξιλογίου ως προς τη γονιδιακή οντολογία διευκολύνει την ταυτοποίηση των σχέσεων και των ιδιοτήτων μεταξύ των πρωτεϊνικών προϊόντων ανάμεσα σε διαφορετικά είδη, ενώ αποδεικνύεται πολύτιμη στις περιπτώσεις επισημείωσης μη πειραματικά χαρακτηρισμένων γονιδίων.

1.6.4 Μεταθετά Στοιχεία

Βασικό συστατικό του επαναλαμβανόμενου DNA ενός γονιδιώματος αποτελούν τα μεταθετά στοιχεία. Τα μεταθετά στοιχεία ή τρανσποζόνια (Transposable Elements, TEs) αποτελούν διακριτές αλληλουχίες που έχουν την ικανότητα μετακίνησης

και ένθεσης σε διαφορετικές θέσεις του γονιδιώματος. Ανακαλύφθηκαν από τη Barbara McClintock στα τέλη της δεκαετίας του 1940 σε γενετικές μελέτες της χρωματικής απόκλισης των σπόρων του καλαμποκιού, χαρακτηρίζοντάς τα ως γενετικά ρυθμιστικά στοιχεία ικανά να μετατεθούν μέσα στο γονιδίωμα και να τροποποιήσουν την έκφραση των παρακείμενων γονιδίων. Ανάλογα με τον τρόπο μετάθεσής τους, μέσω DNA ή RNA ενδιάμεσων, κατατάσσονται σε δυο κύριες τάξεις (Finnegan 1992) και ακολούθως διαφοροποιούνται σύμφωνα με τα δομικά χαρακτηριστικά τους. Επίσης ανάλογα με την ικανότητά τους να κωδικοποιούν τις απαραίτητες για τη μετάθεσή τους λειτουργίες χαρακτηρίζονται ως αυτόνομα ή μη. Ο βαθμός ενσωμάτωσής τους, η διασπορά τους και ο βαθμός συντήρησής τους μας δίνουν σημαντικές πληροφορίες καθώς διαφέρουν σημαντικά ανάμεσα στα διάφορα γονιδιώματα αλλά και σε διαφορετικές περιοχές εντός των ίδιων γονιδιωμάτων (Eickbush & Malik 2002).

Τα στοιχεία τάξης I απαντώνται μόνο στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς και περιλαμβάνουν τα ρετροτρανσποζόνια (retrotransposons), των οποίων η μετάθεση προϋποθέτει τη σύνθεση ενός

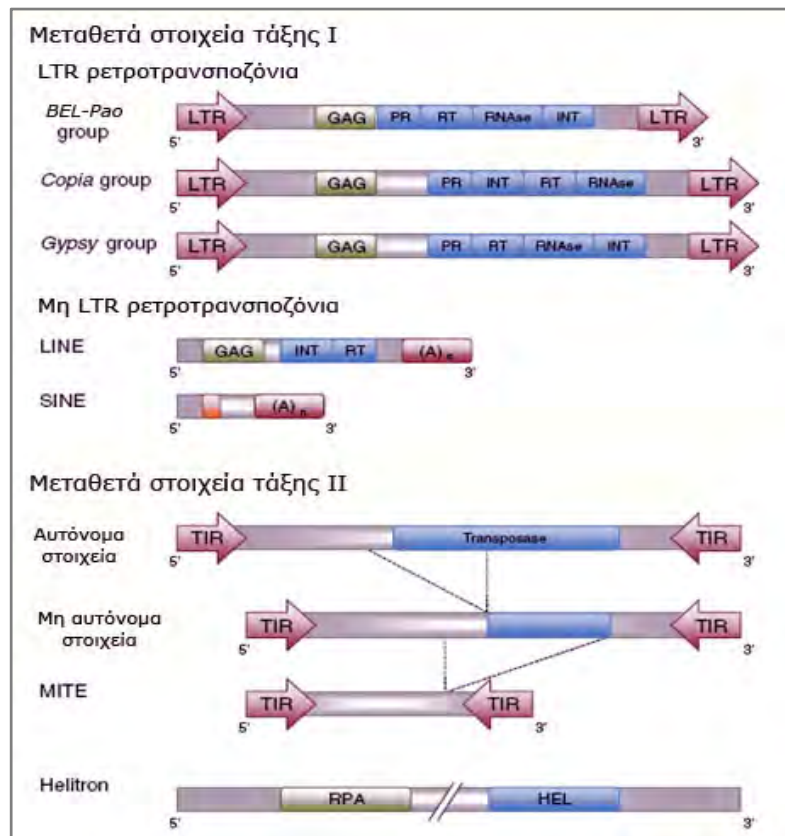
ενδιάμεσου μορίου RNA μέσω αντίστροφης μεταγραφής. Διαχωρίζονται περαιτέρω σε δύο κύριες κατηγορίες ανάλογα με την παρουσία ή μη ομόροπων μακρών τερματικών επαναλήψεων (Long Terminal Repeats, LTRs), οπότε χαρακτηρίζονται ως LTR ή μη-LTR (non-LTR) ρετροτρανσποζόνια αντίστοιχα. Στα τελευταία περιλαμβάνονται τα αυτόνομα στοιχεία LINES (Long Interspersed Nucleotide Elements) και τα μη αυτόνομα στοιχεία SINES (Short Interspersed Nucleotide Elements) (Eickbush & Malik 2002).

Τα στοιχεία τάξης II περιλαμβάνουν τα DNA-τρασποζόνια, τα οποία ενθέτονται απευθείας μέσω ενδιάμεσων μορίων DNA και απαντώνται τόσο σε προκαρυωτικούς όσο και ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Η μετάθεση του στοιχείου σε νέα θέση πραγματοποιείται είτε απευθείας με το μηχανισμό «εκτομής και ένθεσης» (cut and paste transposition), είτε αφού προηγηθεί η αντιγραφή του με αποτέλεσμα τη διατήρηση της αρχικής του θέσης (copy and paste transposition) (Eickbush & Malik 2002).

Εικόνα 1.6-2

Σχηματική αναπαράσταση της δομής και της επιμέρους κατάταξης των κύριων μεταθετών στοιχείων τάξης I και II.

[LTRs, ομόροπες μακρές τερματικές επαναλήψεις; TIRs, ακραίες ανάστροφες επαναλήψεις; GAG, καψιδιακή πρωτεΐνη; PR, πρωτεάση; INT, ιντεγκράση; RT, αντίστροφη μεταγραφή; RNase, ριβονουκλεάση H; RPA, πρωτεΐνη έναρξης αντιγραφής A; HEL, ελικάση]



1.6.4.1 DNA τρανσποζόνια

Τα DNA τρανσποζόνια φέρουν βραχείες ανάστροφες επαναλήψεις (Inverted repeats, IRs) στα άκρα τους (μήκους 10–200 bp), εκατέρωθεν του γονιδίου της τρανσποζάσης που κωδικοποιούν, ενώ χαρακτηριστικές είναι οι ομόρροπες επαναλήψεις που χαρακτηρίζουν τις θέσεις ένθεσής τους (insertion sequences, IS) (Finnegan 1992).

Η τρανσποζάση (transposase) είναι ένα ένζυμο που αναγνωρίζει την θέση – στόχο και δημιουργεί εγκοπές στα άκρα της, αλλά και στα αντίστοιχα του τρανσποζονίου, ώστε να εξασφαλιστεί η μετάθεση. Υπάρχουν τρανσποζάσες που αναγνωρίζουν εξειδικευμένες αλληλουχίες στη θέση στόχο και άλλες που μπορούν να μεταθέσουν το τρανσποζόνιο σε οποιαδήποτε θέση του γονιδιώματος. Στην κατηγορία αυτή κατατάσσονται επίσης τα μη – αυτόνομα στοιχεία MITEs (Miniature Inverted repeat Transposable Elements) μήκους περίπου 600 bp, τα οποία δεν φέρουν κωδικές αλληλουχίες για το γονίδιο της τρανσποζάσης, αλλά το ένζυμο κωδικοποιείται *in trans*. Η αλληλουχία τους είναι πλούσια σε A-T, διαθέτουν ανεστραμμένες αλληλουχίες στα άκρα (TIRs-Terminal Inverted Repeats), θέσεις αντιγραφής (TSDs-Target Sites Duplications) και μια εσωτερική μη-κωδικοποιούσα περιοχή. Επιπλέον, πρόσφατα προστέθηκε μια ακόμα κατηγορία στα DNA τρανσποζόνια, τα στοιχεία Helitrons, τα οποία κωδικοποιούν πρωτεΐνες με δράση ελικάσης (helicase, HEL) και έναρξης της αντιγραφής (replication protein, RPA), ενώ επίσης φέρουν στα άκρα τους χαρακτηριστικές δομές φουρκέτας, επιτρέποντάς τους να μεταθέτονται μέσω ενός μηχανισμού κυλιόμενου κύκλου (Kapitonov & Jurka 2007). Στα έντομα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί και οι τρεις κατηγορίες DNA μεταθετών στοιχείων (Tu & Coates 2003, Tu 2005).

1.6.4.2 Ρετρανσποζόνια μη-LTR

Στην κατηγορία αυτή των ρετροτρανσποζονίων χωρίς LTR (non-LTR retrotransposons)

κατατάσσονται οι μακρές διάσπαρτες αλληλουχίες (long interspersed nuclear elements, LINES). Τα αυτόνομα στοιχεία LINES μήκους 3–8 kb, φέρουν μια 5' αμετάφραστη περιοχή (UTR) που λειτουργεί ως εσωτερικός υποκινητής για τη δράση μιας RNA πολυμεράσης II, δύο ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης που κωδικοποιούν τις απαραίτητες πρωτεΐνες για τη μετάθεσή τους και μια πολύ(A) αλληλουχία στο 3' άκρο τους. Η πρωτεΐνη που παράγεται από το ORF1 έχει την ικανότητα να δεσμεύει το μονόκλωνο RNA σχηματίζοντας ριβονουκλεο-πρωτεϊνικά σύμπλοκα, ενώ η πρωτεΐνη που κωδικοποιείται από το ORF2 παρουσιάζει ενεργότητα αντίστροφης μεταγραφάσης και ενδονουκλεάσης. Ο μηχανισμός μετάθεσής τους διαφέρει συγκριτικά με εκείνον που χρησιμοποιείται από τα LTR ρετροτρανσποζόνια, καθώς η αντίστροφη μεταγραφή είναι εκκινούμενη από τη θέση – στόχο αφού προηγηθεί θραύση από την ενδονουκλεάση (Eickbush & Malik 2002).

Στη συγκεκριμένη κατηγορία ταξινομούνται επίσης και τα μη αυτόνομα μεταθετά στοιχεία SINES (Short Interspersed Nuclear Elements), τα οποία αποτελούν βραχείες διάσπαρτες αλληλουχίες μήκους 100 έως 500 bp. Τα στοιχεία αυτά εμφανίζουν δομικές ομοιότητες με τα στοιχεία LINES, χωρίς ωστόσο να κωδικοποιούν τις απαιτούμενες πρωτεΐνες για τη μετάθεσή τους. Αντίθετα, εμπεριέχουν έναν εσωτερικό υποκινητή RNA πολυμεράσης III, με αποτέλεσμα η αντίστροφη μεταγραφή και τελικά η ένθεση τους στο γονιδίωμα να βασίζεται στην ενζυμική δράση των στοιχείων LINES. Χαρακτηριστική οικογένεια SINES είναι τα στοιχεία Alu στον άνθρωπο τα οποία παράγονται από 7SL RNA, ενώ η πλειοψηφία των υπολοίπων SINES προκύπτουν από τη μεταγραφή tRNA γονιδίων (Jurka et al. 2007).

1.6.4.3 LTR ρετροτρανσποζόνια

Η οργάνωση των αυτόνομων LTR ρετροτρανσποζονίων προσομοιάζει με αυτή των προϊών των ρετροϊών, που φέρουν μια κεντρική κωδική περιοχή εκατέρωθεν τις οποίας εντοπίζονται τα LTR άκρα. Τα LTR εμφανίζουν

μεγάλη ποικιλομορφία τόσο στο μέγεθος όσο και στην αλληλουχία τους. Κάθε LTR έχει μήκος συνήθως από 100-1000 bp και παρουσιάζει τη χαρακτηριστική δομή U3-R-U5. Η περιοχή U3 περιλαμβάνει αλληλουχίες με ρυθμιστική δράση, υποκινητή και ενισχυτή. Τα στοιχεία R (Repeats) αποτελούν επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που δρουν ως σήματα έναρξης και λήξης της μεταγραφής (Eickbush & Malik 2002).

Μεταξύ των δύο LTR ενός ρετροτρανσποζονίου παρεμβάλλεται ένα ενιαίο ή δύο επικαλυπτόμενα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs) που κωδικοποιούν την πολυπρωτεΐνη gag-pol. Το γονίδιο gag εντοπίζεται πρώτο, φέρει μοτίβα δακτύλων ψευδαργύρου (zinc fingers) και κωδικοποιεί μια δομική καψιδιακή πρωτεΐνη με ενεργότητα δέσμευσης νουκλεϊκού οξέος. Η πρωτεΐνη αυτή απαιτείται για τη συγκρότηση των μορίων RNA σε κυτταροπλασματικά ψευδοϊικά σωματίδια (virus-like particles, VLPs) εντός των οποίων θα πραγματοποιηθεί η αντίστροφη μεταγραφή (Voff 2006, Havecker et al. 2004). Το γονίδιο pol ακολουθεί το gag και η μετάφρασή του επιτυγχάνεται με μειωμένη ωστόσο απόδοση είτε με καταστολή (bypassing) του κωδικονίου λήξης, είτε με μετατόπιση του αναγνωστικού πλαισίου (frameshift) από το ριβόσωμα. Το γονίδιο αυτό κωδικοποιεί τις ενζυμικές λειτουργίες που σχετίζονται με τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων και τον ανασυνδυασμό. Συγκεκριμένα κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη με τις ακόλουθες ενεργότητες: i) πρωτεάσης (protease, PRO) που απαιτείται για τη μετα-μεταγραφική επεξεργασία της παραγόμενης πολυπρωτεΐνης, ii) αντίστροφης μεταγραφάσης (reverse transcriptase, RT) που αντιγράφει το ενδιάμεσο RNA του ρετρομεταθετού σε cDNA, iii) ριβονουκλεάσης H (RnaseH, RH) για την αποικοδόμηση της αλυσίδας RNA του ετεροδιμερούς DNA/RNA μετά την αντίστροφη μεταγραφή και iv) ιντεγκράσης (integrase, INT) της οικογένειας DDE (ασπαρτικό-ασπαρτικό-γλουταμινικό) που καταλύει την ενσωμάτωση του νεοσυντιθέμενου ρετροτρανσποζονίου δημιουργώντας διπλασιασμούς στις αλληλουχίες στόχους

(target site duplications, TSDs) (Eickbush & Malik 2002, Zdobnov et al. 2005).

Η φυλογενετική σύγκριση των LTR ρετροτρανσποζονίων με βάση την αλληλουχία της RT, τα κατατάσσει σε τέσσερις οικογένειες που περιλαμβάνουν αντίστοιχα τα στοιχεία Ty1/copia, Ty3/gypsy, BEL/PAO και τα ιδιαίτερης δομής στοιχεία DIRS (Eickbush & Malik 2002). Τα στοιχεία DIRS φέρουν μια ιντεγκράση τυροσίνης αντί της DDE, ενώ απουσιάζει και η αλληλουχία της πρωτεάσης. Η διευθέτηση των πρωτεϊνικών επικρατειών του γονιδίου pol διαφέρει μεταξύ των οικογενειών, με την περιοχή της INT να εντοπίζεται ανοδικά των RT και RH προς το αμινο-τελικό άκρο για τα στοιχεία Ty1/copia, ενώ στα Ty3/gypsy και BEL/PAO ο εντοπισμός της είναι στο καρβοξυ-τελικό άκρο του γονιδίου.

Τα LTR ρετροτρανσποζόνια εμφανίζουν στοιχεία ομοιότητας τόσο δομικά όσο και φυλογενετικά με τους ρετροϊούς. Ωστόσο οι τελευταίοι φέρουν επιπρόσθετα το γονίδιο *env* που κωδικοποιεί γλυκοπρωτεϊνικά συστατικά που συγκροτούν τον φάκελο του ιοσωματίου, ο οποίος αναγνωρίζεται από τους κυτταροπλασματικούς μεμβρανικούς υποδοχείς του ξενιστή εκκινώντας τη διαδικασία της μόλυνσης. Το γονίδιο αυτό εντοπίζεται μόνο στα ρετροτρανσποζόνια Ty3/gypsy, προσδίδοντάς τους μολυσματική ικανότητα και δυνατότητα οριζόντιας μεταφοράς.

1.6.5 Κατανομή και ρόλος μεταθετών στοιχείων

Χρειάστηκε να περάσουν σχεδόν τρεις δεκαετίες μέχρι να εκτιμηθεί και αποσαφηνιστεί η μοριακή βάση των ευρημάτων της McClintock για τα κινητά ρυθμιστικά στοιχεία, με την επιστημονική κοινότητα να της απονέμει τελικά το βραβείο Νόμπελ το 1983. Η αρχική αντίληψη για τα μεταθετά στοιχεία, δεδομένης της κυριαρχούσας τότε θεωρίας περί της στατικότητας των γονιδιωμάτων, τα θεωρούσε ως «εγωιστικό» (selfish) ή «άχρηστο» (junk) ή «παρασιτικό» (parasite) DNA, με αποκλειστικό σκοπό τη διατήρηση και διαιώνισή του στο γονιδίωμα που

εντοπίζεται, επιβαρύνοντας το κύτταρο με το κόστος της αντιγραφής τους και προκαλώντας επιβλαβείς επιπτώσεις (Orgel and Crick 1980, Hickey 1982). Ωστόσο σήμερα είναι πλέον παραδεκτό και αποδεδειγμένο με βάση τις πληροφορίες που απορρέουν από τις αναλύσεις αλληλουχιών διαφόρων γονιδιωμάτων, με κύριες πηγές αυτές του ανθρώπου και της *D.melanogaster*, ότι τα γονιδιώματα αποτελούν δυναμικές οντότητες με χαρακτηριστική πλαστικότητα, που συγκροτούν ένα δίκτυο γενετικών, επιγενετικών και κυτταρικών αλληλεπιδράσεων (Hua-Van et al. 2011). Σε αυτό το δίκτυο ο ρόλος των μεταθετών κάθε άλλο παρά ασήμαντος μπορεί να χαρακτηριστεί. Πλήθος μελετών αποδεικνύουν τη συνεισφορά τους στη γενετική ποικιλομορφία, μέσω της ενεργούς συμμετοχής τους στη δομική και λειτουργική εξέλιξη των γονιδίων, επηρεάζοντας τη γονιδιακή έκφραση και προκαλώντας μεταλλάξεις, αλλά και αναδιοργανώνοντας τη δομή των γονιδιωμάτων. Η επιβλαβής ή ωφέλιμη δράση τους καθορίζεται τελικά από τη φυσική επιλογή ανάλογα με το αν επηρεάζει ή όχι την αρμοστικότητα των ατόμων ή των πληθυσμών, ή αν δημιουργεί νέα χαρακτηριστικά διευκολύνοντας την επιβίωσή τους σε περιβαλλοντικές ή βιοτικές αλλαγές (για ανασκόπηση Oliver & Green 2009).

Τα μεταθετά στοιχεία εντοπίζονται σε αφθονία στα ευκαρυωτικά γονιδιώματα, καταλαμβάνοντας περιοχές που αντιστοιχούν στο 46% του ανθρώπινου γονιδιώματος (Lander et al. 2001), 28% της *D. melanogaster* (Karitonov & Jurka 2003) και 16% της ευχρωματινικής περιοχής του *An. gambiae* (Holt et al. 2002). Ωστόσο ιδιαίτερη ποικιλομορφία είναι δυνατόν να παρατηρηθεί όσον αφορά το ποσοστό των μεταθετών στοιχείων ανάμεσα στα γονιδιώματα διαφορετικών πληθυσμών, ή και διαφορετικών ατόμων σε ένα πληθυσμό, όπως έχουν αποκαλύψει πειράματα *in situ* υβριδισμού στη *D. melanogaster* (Charlesworth et al. 1994).

Τα μεταθετά στοιχεία εντοπίζονται τόσο σε ευχρωματινικές όσο και ετεροχρωματινικές περιοχές, σχηματίζοντας σε ορισμένες περιπτώσεις συστοιχίες (Dimitri 1997). Παρ' ότι βρίσκονται σε διάσπαρτες θέσεις στο γονιδίωμα, η κατανομή τους

δεν είναι τυχαία. Αντίθετα παρατηρείται έντονη συσσώρευση μεταθετών στοιχείων στην ετεροχρωματινή, αν και η υποκείμενη δυναμική αυτής της κατανομής δεν είναι εξακριβωμένη (Charlesworth et al. 1994, Pimpinelli et al. 1995). Η υψηλή συχνότητα εμφάνισής τους σε ετεροχρωματινικές περιοχές ερμηνεύεται πιθανότατα ως αποτέλεσμα της χαμηλής γονιδιακής πυκνότητας σε συνάρτηση με τον μειωμένο ρυθμό μειωτικών ανταλλαγών λόγω ανασυνδυασμού (meiotic recombinational exchange) που χαρακτηρίζουν αυτές τις περιοχές (Biemont & Vieira 2005). Εναλλακτικά οι περιοχές αυτές είναι δυνατόν να αναγνωρίζονται από τα μεταθετά ως προνομιακές θέσεις ένθεσης, ή να ευνοείται η μετάθεση σε αυτές λόγω της ύπαρξης δίκλωνων ρήξεων (unpaired breaks) (Dimitri 1997, Dimitri et al. 2005). Με τον ένα ή τον άλλο τρόπο οι ετεροχρωματινικές περιοχές τελικά εξασφαλίζουν τη διατήρηση των μεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα καθώς δεν υπόκεινται άμεσα σε επιλογή, η οποία δρα με σκοπό την απομάκρυνσή τους (Biemont & Vieira 2005).

Μεταξύ των ειδών παρατηρείται σημαντική διακύμανση του αριθμού αντιγράφων ανά τύπο και οικογένεια των μεταθετών. Ωστόσο ο συνολικά μεγάλος αριθμός αντιγράφων των μεταθετών στοιχείων υποδηλώνει αφενός ότι η μετάθεση δεν επιφέρει πάντοτε επιβλαβείς επιπτώσεις για τα κύτταρα-ξενιστές, καθιστώντας την παρουσία τους επιλεκτικά συμφέρουσα, και αφ' ετέρου ότι η αντιγραφή τους δεν είναι ανεξέλεγκτη, αλλά διατηρείται σε επίπεδα δυναμικής ισορροπίας μεταξύ της δράσης τους και της συχνότητας εξάλειψής τους.

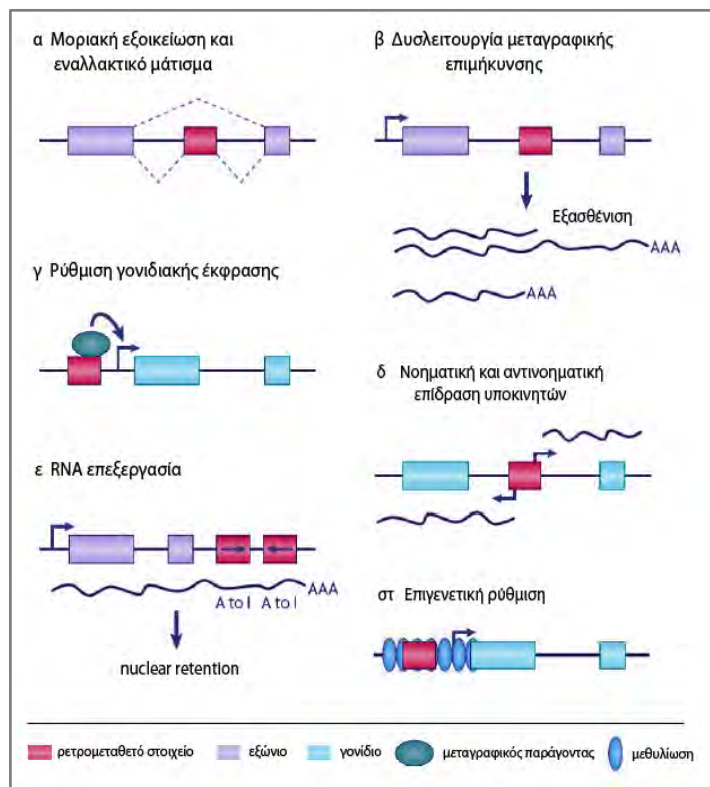
Η ισορροπία αυτή αποκαθίσταται είτε με αυτορυθμιστικούς μηχανισμούς που επάγονται από τα ίδια τα μεταθετά, είτε με μηχανισμούς που αναπτύχθηκαν από τα γονιδιώματα-ξενιστές με σκοπό την εξασφάλιση της αρμοστικότητάς τους, μειώνοντας τα ποσοστά των μεταθέσεων ή περιορίζοντας τις επιπτώσεις τους (Kidwell & Lisch 1997; 2002). Οι αυτορυθμιστικοί μηχανισμοί συνιστούν την προσωρινή ή μόνιμη αδρανοποίηση των στοιχείων ή ακόμα και την οριστική απώλειά

τους. Στην περίπτωση των LTR ρετρομεταθετών η απώλεια των λειτουργικών τους περιοχών μέσω άνισων ομόλογων ανασυνδυασμών οδηγεί στη διατήρηση μόνο των LTR επαναλήψεών τους, ενώ το στοιχείο *P* της *Drosophila* καθίσταται ανενεργό μέσω καταστολέων που το ίδιο κωδικοποιεί.

Η ρύθμιση της μετάθεσης από τον ξενιστή βασίζεται κυρίως σε επιγενετικούς μηχανισμούς (μεθυλίωση, συγκαταστολή, αποσιώπηση, παρεμβολή RNA), γεγονός που οδήγησε στην διατύπωση της υπόθεσης ότι οι συγκεκριμένες στρατηγικές αναπτύχθηκαν αρχικά ως άμυνα σε εξωγενή DNA και μεταθετά, πριν εξελιχθούν σε μηχανισμούς ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Fedoroff 2002). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο γονιδιακός τόπος *flamenco* που εντοπίζεται στο X χρωμόσωμα της *D. melanogaster*. Στα γαμετικά κύτταρα των θηλυκών ατόμων όταν το υπολειπόμενο αλληλόμορφο του γονιδίου βρίσκεται σε ομοζυγωτία, παρατηρείται καταστολή της έκφρασης του γονιδίου *en* του ρετρομεταθετού *gypsy* στα σωματικά κύτταρα των ωαρίων της επόμενης γενιάς και συνεπώς

αναστολή της ρετρομετάθεσης μέσω του μονοπατιού αποσιώπησης piRNA (piwi-interacting RNA) (Bucheton 1995, Sarot et al. 2004). Αντίστοιχος μηχανισμός με ιστοειδικότητα αναστολής παρατηρήθηκε και για το στοιχείο *P* της *Drosophila*, του οποίου η μετάθεση πραγματοποιείται μόνο στη γαμετική σειρά όπου εξασφαλίζεται το σωστό μάτισμα του μεταγράφου του, προκαλώντας υβριδική δυσγένεση. Αντίθετα στα σωματικά κύτταρα, παρουσία συγκεκριμένων μεταγραφικών παραγόντων, προκαλείται εναλλακτικό μάτισμα, που παρεμποδίζει τη σύνθεση της τρικοζύνης (Siebel et al. 1992). Οι παραπάνω κυτταρικοί μηχανισμοί ρύθμισης συμβάλουν στη μείωση των καταστροφικών συνεπειών της δράσης των μεταθετών στοιχείων στα σωματικά κύτταρα, ενώ παράλληλα επιτρέπουν την κάθετη μεταφορά της προκαλούμενης γενετικής ποικιλομορφίας στις επόμενες γενεές μέσω της γαμετικής σειράς, υποδηλώνοντας ότι τα μακροπρόθεσμα πλεονεκτήματα που προσδίδονται σε μια γενιά υπερέχουν προς το ατομικό κόστος. Ωστόσο τα μεταθετά στοιχεία για να εξασφαλίσουν

Εικόνα 1.6-3 Επίδραση των ρετρομεταθετών στοιχείων στη γονιδιακή έκφραση **α)** Η ένθεση ενός ρετρομεταθετού στοιχείου εντός ενός γονιδίου δημιουργεί μπορεί να οδηγήσει στη μοριακή εξοικείωσή του ή στην επαγωγή εναλλακτικού ματίσματος (διακοπτόμενες γραμμές). **β)** Η παρουσία ενός ρετρομεταθετού στην ιντρονική περιοχή ενός γονιδίου μπορεί να επηρεάσει μεταγραφική επιμήκυνση, με αποτέλεσμα την εξασθένηση (attenuation) ή τον πρόωρο τερματισμό της. **γ)** Λόγω των θέσεων πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που φέρουν, τα ρετρομεταθετά μπορούν να ρυθμίσουν την έκφραση (θετικά ή αρνητικά) γειτονικών γονιδίων. **δ)** Οι ισχυροί (νοηματικοί και μη νοηματικοί) υποκινητές των ρετρομεταθετών μπορούν να επάγουν τη μεταγραφή γονιδίων που εντοπίζονται είτε ανοδικά, είτε καθοδικά αυτών. **ε)** Η παρουσία δύο ρετρομεταθετών στοιχείων *Alu* με αντίθετη κατεύθυνση στο εσωτερικό γονιδιακών μεταγράφων μπορεί να οδηγήσει στη μετατροπή των A (αδενίνη) σε I (ινουίνη) σε RNA μόρια (RNA editing) με αποτέλεσμα την καταστολή της έκφρασης των επεξεργασμένων RNA μεταγράφων λόγω κατακράτησης τους στον πυρήνα. **στ)** Η μεθυλίωση των ρετρομεταθετών στοιχείων μπορεί να σηματοδοτήσει την έναρξη σχηματισμού και επέκτασης της ετεροχρωματινής και συνεπώς να μεταβάλει την έκφραση γειτονικών γονιδίων (Cordaux et al. 2010).



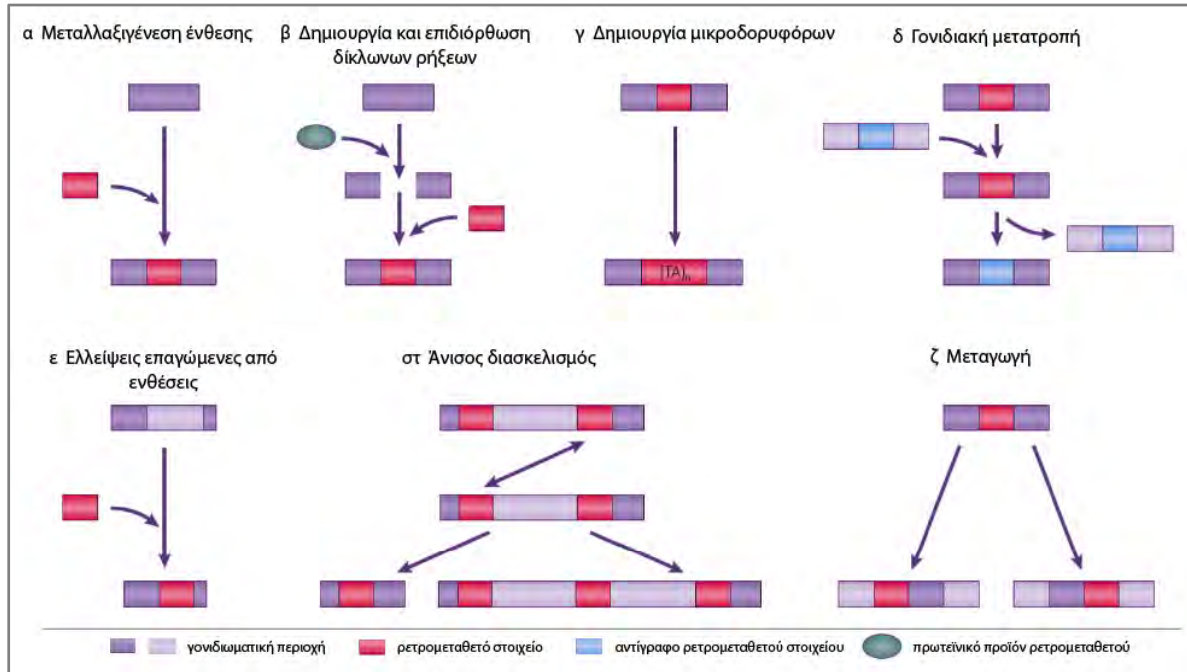
την ενεργότητά τους ενάντια στους φραγμούς που δημιουργούν η αυτορρύθμιση στην οποία υπόκεινται αλλά και οι μηχανισμοί ρύθμισης του ξενιστή, έχουν αναπτύξει την ικανότητα μετάθεσής τους μέσω οριζόντιας μεταφοράς σε νέα γονιδιώματα. Περιπτώσεις οριζόντιας μεταφοράς έχουν περιγραφεί σε διάφορους οργανισμούς συμπεριλαμβανομένων των εντόμων τόσο για DNA μεταθετά στοιχεία των οικογενειών *P*, *mariner*, *hobo* όσο και για ρετρομεταθετά (*coria*, *gypsy*) (Tu 2005).

Η γενετική ποικιλομορφία που προκύπτει από τη μετάθεση των τρανσποζονίων σχετίζεται με τη δημιουργία μεταλλάξεων, που αφορούν από απλές νουκλεοτιδικές αλλαγές μέχρι εκτεταμένες αλλαγές στο μέγεθος και την οργάνωση του γονιδιώματος. Η δράση τους αυτή συχνά επάγει είτε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά ή ουδέτερες αλλαγές ανιχνεύσιμες μόνο σε επίπεδο νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Οι μεταλλάξεις δημιουργούνται τόσο κατά την ένθεση όσο και κατά την εκτομή κάποιων μεταθετών σε συγκεκριμένες χρωμοσωμικές θέσεις με μη ακριβή τρόπο, με αποτέλεσμα την απομάκρυνση αναγνωρίσιμων αλληλουχιών ή τη δημιουργία αποτυπωμάτων (“footprints”) που υποδηλώνουν την προηγούμενη παρουσία τους (Kidwell & Lisch 1997). Συνήθως όμως κατά τη δημιουργία μεταλλάξεων σε ρυθμιστικές περιοχές του γονιδιώματος επάγονται επιβλαβείς επιπτώσεις.

Κατά τη διαδικασία μετάθεσης, μέσω της ενσωμάτωσης της αλληλουχίας ενός μεταθετού στοιχείου εντός ενός γονιδίου ή των ρυθμιστικών περιοχών του, ή ακόμα και ανοδικά αυτών, είναι δυνατό να προκληθεί διακοπή ή αλλαγή της γονιδιακής λειτουργίας (Εικ. 1.6-3). Η εισαγωγή ενός μεταθετού στοιχείου εντός του εξονίου ενός γονιδίου, οδηγεί στη δημιουργία εκμηδενιστικών (null) μεταλλάξεων και αλλαγή της γονιδιακής έκφρασης, όπως χαρακτηριστικά παρατηρήθηκε στην περίπτωση των στοιχείων *P* και *coria* στη *Drosophila*, τα οποία εισήχθησαν σε κωδικές αλληλουχίες του γενετικού τόπου *white*, με εμφανή τροποποίηση του φαινότυπου. Αντίθετα, η ενσωμάτωση τρανσποζονίων σε ιντρονικές αλληλουχίες, αυξάνει τις πιθανότητες διατήρησής

τους καθώς διαφεύγουν της επίδρασης της φυσικής επιλογής, εφόσον αποκόπτονται από το ώριμο mRNA και δεν έχουν λειτουργικές επιπτώσεις στο γονίδιο (Kidwell & Lisch 1997). Τέλος, το γεγονός ότι τα μεταθετά στοιχεία φέρουν μοτίβα ισχυρών υποκινητών και ενισχυτών, όταν εισάγονται στις ρυθμιστικές περιοχές ενός γονιδίου, επιδρούν καθοριστικά στην έκφρασή του. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ένθεση του ρετρομεταθετού στοιχείου *gypsy* στην 5' ανοδική περιοχή του γονιδίου *yellow* στη *Drosophila*, με αποτέλεσμα την ιστοειδική μείωση της έκφρασής του. Η γονιδιακή ρύθμιση και λειτουργία μπορεί να επηρεάζεται από τη δράση των μεταθετών στοιχείων επάγοντας επιγενετικές αλλαγές στην επικράτεια ενός γονιδίου ή τροποποιώντας την κατάσταση της χρωματίνης (Biemont & Viera 2006).

Η ύπαρξη πολλαπλών αντιγράφων των μεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα, τους παρέχει τη δυνατότητα να εξυπηρετούν και ως σημεία ανασυνδυασμού. Η ύπαρξη ομόλογων τους αλληλουχιών υποκινεί ίσους και άνισους διασκελισμούς, τμηματικούς διπλασιασμούς (segmental duplication), μετατροπές γονιδίων (gene conversion) αλλά και αναδιατάξεις γονιδίων (exon shuffling) (Kazazian 2004) (Εικ. 1.6-4). Επιπλέον τα μεταθετά στοιχεία είναι δυνατόν να συνεισφέρουν ως πηγές νέων κυτταρικών λειτουργιών και διαδικασιών μέσω της ενσωμάτωσης τμημάτων των κωδικών αλληλουχιών τους στα γονίδια – στόχους τους και τη δημιουργία χιμαιρικών (υβριδικών) γονιδίων, ή μέσω της ένθεσης ολόκληρων των αναγνωστικών πλαισίων τους και την επακόλουθη προσάρτησή τους στο γονιδίωμα του ξενιστή για την περάτωση νέων λειτουργιών. Το φαινόμενο αυτό καλείται μοριακή εξοικείωση (molecular domestication) και καταδεικνύει το σημαντικό ρόλο των τρανσποζονίων στη δημιουργία επιλεκτικά συμφερόντων αλλαγών από τη δράση τους (Vollf 2006). Μεγάλος αριθμός μελετών απέδειξαν ότι γονίδια των μεταθετών στοιχείων που κωδικοποιούν τρανσποζάσες, ιντεγκράσες, αντίστροφες μεταγραφάσες, αλλά και δομικές (gag) καθώς και πρωτεΐνες φακέλου έχουν προσαρτηθεί



Εικόνα 1.6-4 Επίδραση των ρετρομεταθετών στοιχείων στη δομή του γονιδιώματος.

α) Τυπική ένθεση ενός ρετρομεταθετού στοιχείου σε νέα γονιδιωματική θέση. Η ένθεση μπορεί να οδηγήσει σε μεταλαξίγνευση, αν η νέα θέση εντοπίζεται στο εσωτερικό ενός γονιδίου. **β)** Τα πρωτεϊνικά προϊόντα του μεταθετού (μπλε κύκλος) μπορεί να δημιουργήσει ρήξεις σε δίκλιωνα μόρια DNA. Εναλλακτικά μια ήδη υπάρχουσα ρήξη μπορεί να επιδιορθωθεί, βάσει μιας μη κλασσικής, ανεξάρτητης ενδονουκλεασών, ένθεσης ενός ρετρομεταθετού. **γ)** Ενδογενείς επαναλήψεις των ρετρομεταθετών μπορούν να λειτουργήσουν ως πηγές δημιουργίας μικροδορυφώρων. **δ)** Η γονιδιακή μετατροπή μπορεί να τροποποιήσει τη νουκλεοτιδική σύσταση ομόλογων αντιγράφων ενός ρετρομεταθετού. **ε)** Η ένθεση ενός μεταθετού μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια αλληλοχίων των γονιδιωματικών περιοχών – στόχων. **στ)** Άνισος διασκελισμός (διπλό βέλος) ομόλογων ρετρομεταθετών στοιχείων μεταξύ μη αδελφικών χρωματίδων, μπορεί να προκαλέσει ανακατατάξεις όπως ελλείψεις (αριστερά) ή διπλασιασμούς (δεξιά) των ενδιάμεσων γονιδιωματικών περιοχών. **ζ)** Μεταγωγή 5' ή 3' κατεύθυνσης οδηγεί στη ρετρομετάθεση ανοδικά ή καθοδικά γειτονικών περιοχών ταυτόχρονα με το ρετρομεταθετό (Cordaux et al. 2010).

κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ευκαρυωτών (για ανασκόπηση Volff 2006).

Το πιο μελετημένο παράδειγμα μοριακής εξοικείωσης τρανσποζάσης αποτελεί το σύστημα ανασυνδυασμού V(D)J, το οποίο εξασφαλίζει την ανοσολογική ποικιλομορφία των σπονδυλωτών (Agrawal et al. 1998). Το σύμπλεγμα των γονιδίων *Rag 1/2* που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή, καταλύει τη δημιουργία εγκοπών στο DNA με μηχανισμό παρόμοιο με τον αντίστοιχο των τρανσποζασών των μεταθετών στοιχείων hAT. Παράλληλα παρουσιάζουν και αρκετές δομικές ομοιότητες, προτείνοντας ότι τα γονίδια *Rag 1* και *Rag 2* έχουν παραχθεί από την ένθεση των hAT DNA τρανσποζονίων περίπου πριν από 500 εκατομμύρια χρόνια (Roth et al. 1998). Μια επίσης χαρακτηριστική περίπτωση μοριακής εξοικείωσης

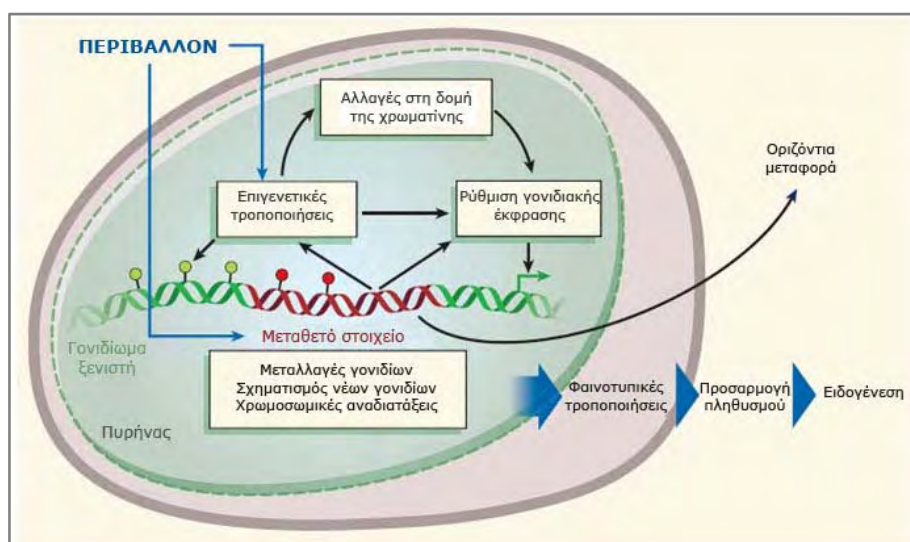
αποτελεί η χρήση των μη LTR ρετροτρανσποζονίων *HeT-A* και *TART* από τη *Drosophila* για τη διατήρηση των τελομερών των χρωμοσωμάτων της. Φυσιολογικά η ακεραιότητα των χρωμοσωμικών άκρων εξασφαλίζεται από τη δράση του συμπλόκου της τελομεράσης, μιας αντίστροφης μεταγραφάσης, το γονίδιο της οποίας ωστόσο χάθηκε σε κάποια φάση της εξέλιξης του εντόμου, με αποτέλεσμα την απόλυτη προσαρμογή των παραπάνω μεταθετών στοιχείων για την αποκατάσταση της ζωτικής αυτής λειτουργίας (Pardue et al. 2005). Παράλληλα με τις παρατηρούμενες ενθέσεις και αποκοπές σε γονιδιακό επίπεδο, η δράση των μεταθετών μπορεί να επάγει και δομικές χρωμοσωμικές ανακατατάξεις σε ευρεία κλίμακα, όπως μετατοπίσεις και αναστροφές, μέσω εκτοπικών ανασυνδυασμών και άλλων μηχανισμών με

σημαντικό εξελικτικό αντίκτυπο (Gray 2000). Το τάξης II στοιχείο *Odysseus* απομονώθηκε γειτονικά του απομακρυσμένου (ως προς το κεντρομέρες) σημείου θραύσης μιας φυσικά επαγόμενης περικεντρικής αναστροφής που χαρακτηρίζει το κρυπτικό είδος *A. arabiensis* του συμπλέγματος *A. gambiae* (Mathiopoulos et al. 1998). Η συμμετοχή των μεταθετών στη δημιουργία χρωμοσωμικών ανακατατάξεων στη φύση, υποδηλώνει την πιθανή εμπλοκή τους στην αναπαραγωγική απομόνωση και την επαγωγή γενετικών αλλαγών που επιτρέπουν την προσαρμογή του *An. gambiae* σε ένα εύρος οικολογικών θώκων (ecological niches) (Mathiopoulos et al. 1999). Επιπλέον, κάτω από στρεσογόνες συνθήκες, προάγεται η ενεργοποίηση ορισμένων μεταθετών στοιχείων, εικάζοντας ότι αυξημένα επίπεδα μετάθεσης πιθανόν να δρουν ωφέλιμα, συμβάλλοντας στην αύξηση του ρυθμού ανασυγκρότησης του γονιδιώματος και δυνητικά στη γενετική ποικιλότητα ενός πληθυσμού (Oliver & Greene 2009). Με τον τρόπο αυτό αυξάνεται η αρμοστικότητα κάποιων ατόμων και εξασφαλίζεται η επιβίωσή τους στις βιοτικές και περιβαλλοντικές

ανάγκες που ανακύπτουν. Όλα τα παραπάνω υποστηρίζουν το σημαντικό ρόλο των μεταθετών στοιχείων στη γονιδιακή έκφραση καθώς και την αναδόμηση και εξέλιξη των γονιδιωμάτων, καθιστώντας τα αναντικατάστατες πηγές γενετικής καινοτομίας (genetic novelty) (Biemont & Vieiria 2006) (Εικ. 1.6-5).

1.6.6 Δορυφορικό DNA

Μια από τις κατηγορίες επαναλαμβανόμενου DNA, αφορά αλληλουχίες των οποίων τα πολλαπλά αντίγραφα απαντώνται εν σειρά, καταλαμβάνουν σημαντικό ποσοστό των γονιδιωμάτων των ευκαρυωτικών οργανισμών και χαρακτηρίζεται ως δορυφορικό DNA. Η ονομασία του προέρχεται από την ικανότητα αυτών των αλληλουχιών να απομονώνονται με φυγοκέντρηση σε διαβάθμιση πυκνότητας σαν δορυφορικά κλάσματα DNA, ως αποτέλεσμα της διαφορετικής αντιπροσώπευσης των βάσεων τους σε σχέση με το υπόλοιπο γονιδίωμα. Αντιπροσωπεύουν αλληλουχίες που δεν



Εικόνα 1.6-5 Σχηματική αναπαράσταση των αλληλεπιδράσεων των μεταθετών στοιχείων και του περιβάλλοντος στη δομή και λειτουργία του γονιδιώματος.

Τα μεταθετά στοιχεία στοιχειοθετούν πηγές γενετικής ποικιλομορφίας, επιτρέποντας την προσαρμογή των πληθυσμών στις αλλαγές και την εξέλιξη των ειδών. Επιπλέον χαρακτηρίζονται από την ικανότητα μετακίνησης μεταξύ διαφορετικών ειδών, με αποτέλεσμα να διατηρούν την ενεργότητά τους ενάντια στους μηχανισμούς ρύθμισής τους. Η φυσική επιλογή αν και δρα ενάντια στις προκαλούμενες αλλαγές, σε επίπεδο πληθυσμού είναι δυνατό να τις καταστήσει συμφέρουσες παρά το ατομικό κόστος. Ανάλογα με το βαθμό επίδρασής της παρατηρείται επομένως είτε τάση απώλειας είτε συσσώρευσης μεταθετών στοιχείων, συνεισφέροντας μακροπρόθεσμα στην αναδόμηση των γονιδιωμάτων (Biemont & Vieira 2006).

κωδικοποιούν κάποιο πρωτεϊνικό προϊόν, οι οποίες οργανώνονται σε μεγάλες συστοιχίες σε ετεροχρωματινικές περιοχές, κυρίως κεντρομερικές ή/και τελομερικές (Charlesworth et al. 1994). Το μονομερές του δορυφορικού DNA, δηλαδή η βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα του, είναι πλούσια σε βάσεις A και T, ενώ το μήκος της ποικίλει από μερικές έως και περισσότερες των χιλίων βάσεις, δημιουργώντας συστοιχίες συνολικής έκτασης μπορεί και μεγαλύτερης των 100 Mb. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των οικογενειών του δορυφορικού DNA όσον αφορά τις θέσεις εντοπισμού τους στο γονιδίωμα, τη συνολική έκταση που καταλαμβάνουν αλλά και το μήκος της αλληλουχίας που επαναλαμβάνεται, αποτελούν τις κύριες πηγές διαφοροποίησης τους από τις υπόλοιπες κατηγορίες επαναλαμβανόμενου μη κωδικού DNA. Στις παραπάνω ταξινομούνται οι μικρο- και μινι- δορυφόροι, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από μικρές επαναλαμβανόμενες μονάδες 2-6 bp και 16-60 bp αντίστοιχα, αντιπροσωπεύουν μικρότερους βαθμούς επανάληψης και είναι διάσπαρτοι, κυρίως σε ευχρωματινικές περιοχές του γονιδιώματος.

Παράλληλα με την ειδικότητα που εμφανίζει το δορυφορικό DNA σχετικά με τις περιοχές εντοπισμού του, παρουσιάζει συχνά και ειδικότητα σχετικά με το είδος από το οποίο απομονώνεται (Palomeque & Lorite 2008). Επιπλέον, παρά το γεγονός ότι μια οικογένεια δορυφορικού DNA εντοπίζεται κατά κανόνα σε όλα τα χρωμοσώματα ενός οργανισμού, δεν λείπουν οι εξαιρέσεις όπου παρουσιάζεται ειδικότητα ως προς κάποιο χρωμόσωμα, όπως στην περίπτωση της *D. melanogaster* της οποίας οι κεντρομερικές περιοχές των χρωμοσωμάτων χαρακτηρίζονται από διαφορετικές δορυφορικές αλληλουχίες (Bonaccorsi & Lohe 1991).

Οι οικογένειες δορυφορικού DNA υπόκεινται στην επίδραση της γονιδιακής μετατροπής (gene conversion) και του άνισου διασκελισμού (unequal crossing over) (Charlesworth 1994). Αυτοί οι μηχανισμοί ανασυνδυασμού ευθύνονται για την ταχεία οριζόντια εξάπλωση των μεταλλάξεων ανάμεσα στα επαναλαμβανόμενα μονομερή στο

γονιδίωμα, μέσα από τη διαδικασία ομογενοποίησης. Ακολούθως οι μεταλλάξεις εγκαθιδρύονται στον αναπαραγωγικό πληθυσμό (Dover 1986) μέσω της διαδικασίας μοριακής καθοδήγησης (molecular drive). Ως αποτέλεσμα των διαδικασιών αυτών που δρουν σε δυο επίπεδα επιτυγχάνεται τελικά η εναρμονισμένη εξέλιξη της δορυφορικής αλληλουχίας και η διατήρηση της ταυτότητάς της μεταξύ μιας οικογένειας. Επιπλέον οι παραπάνω μηχανισμοί ανασυνδυασμού συνεισφέρουν και στη διακύμανση του αριθμού των αντιγράφων των δορυφορικών αλληλουχιών μεταξύ των ειδών (Ugarkovic & Plohl 2002).

1.6.7 Ρόλος δορυφορικού DNA

Η αρχική υπόθεση για το ρόλο του δορυφορικού DNA, εφόσον δεν είχε αποδοθεί κάποια λειτουργία που να σχετίζεται με την κωδικοποίηση πρωτεϊνών, χαρακτήριζε τη συσσώρευση αυτών των αλληλουχιών ως «άχρηστο» DNA (Ohno 1972), όπως και στην περίπτωση των μεταθετών στοιχείων. Μια αντίθετη άποψη που εξέφρασαν το 1979 οι John και Miklos, πρότεινε ότι οι δορυφορικές αλληλουχίες εμπλέκονται σε μια σειρά λειτουργιών που αφορούν από την οργάνωση και τη σύζευξη των χρωμοσωμάτων, έως τον κυτταρικό μεταβολισμό και την ειδογένεση. Πιο πρόσφατες αναφορές υποστηρίζουν την παραπάνω άποψη και συσχετίζουν τις δορυφορικές αλληλουχίες με σύνθετα οργανωτικά χαρακτηριστικά που απαιτούνται για τη λειτουργία των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων, όπως ο σχηματισμός ετεροχρωματινικών περιοχών στο γονιδίωμα (Henikoff 2001, Ugarkovic & Plohl 2002). Άλλωστε οι αλληλουχίες αυτές συγκροτούν επί το πλείστον την κεντρομερική και περικεντρομερική ετεροχρωματινή, περιοχές που καθορίζονται επιγενετικά και εξασφαλίζουν τη σωστή συμπεριφορά των χρωμοσωμάτων κατά την κυτταρική διαίρεση. Η εξαιρετικά μεγάλη ποικιλομορφία των δορυφορικών DNA όσον αφορά την νουκλεοτιδική τους αλληλουχία, την πολυπλοκότητά τους, την

αφθονία τους στο γονιδίωμα, αλλά και την ύπαρξη πολυάριθμων ανεξάρτητων οικογενειών, καθιστά αδιευκρίνιστη τη βιολογική τους σημασία (Plohl et al. 2007). Παρά την προοδευτική συσσώρευση δεδομένων, η απουσία άμεσων πειραματικών αποδείξεων σχετικά με τη λειτουργία των συγκεκριμένων αλληλουχιών και τους μηχανισμούς δράσης τους σε συγκεκριμένες διαδικασίες, έχει σαν αποτέλεσμα ο καθορισμός του ρόλου τους να βασίζεται σε έμμεσες ενδείξεις και υποθέσεις.

Ως κύρια συστατικά της ετεροχρωματίνης, οι δορυφορικές αλληλουχίες λειτουργούν ως δομικά στοιχεία των κεντρομερών, αλληλεπιδρώντας με διάφορες πρωτεΐνες για το σχηματισμό της κεντρομερικής ετεροχρωματινικής περιοχής (Henikoff & Dalal 2005). Η ικανότητα αλληλεπίδρασής τους οφείλεται στην παρουσία χαρακτηριστικών μοτίβων, όπως για παράδειγμα η αλληλουχία CENP-B box που δεσμεύεται με την ιστόνη CEN-B για το σχηματισμό του κινητοχώρου (Schueler et al. 2005). Παρ' όλα αυτά η παρουσία τους στο μηχανισμό συγκρότησης των κεντρομερών δεν αποτελεί αναγκαία προϋπόθεση, αλλά προτείνεται ότι μάλλον δρουν καθοδηγητικά στην προσαρμοσμένη εξέλιξη (adaptive evolution) των κεντρομερικών ιστονών, συμμετέχοντας επομένως συμπληρωματικά σε επιγενετικές διαδικασίες ανεξαρτήτως αλληλουχίας (Cooper & Henikoff 2004, Plohl et al. 2007). Επίσης, δομικά χαρακτηριστικά που σχετίζονται με το μήκος της αλληλουχίας του μονομερούς, τη σύνθεση και την περιοδικότητά του σε βάσεις A και T, επάγουν την κυρτότητα του άξονα της έλικας του DNA, με αποτέλεσμα τη δημιουργία υπερελικωμένων τριτοταγών δομών, που θεωρείται ως ιδιαίτερης σημασίας για το συμπαγές πακετάρισμα του DNA και των πρωτεϊνών της ετεροχρωματίνης (για ανασκόπηση Ugarkovic 2005). Επιπλέον, η παρουσία ομόρροπων και ανάστροφων αλληλουχιών επαναλαμβανόμενων στοιχείων εντός των δορυφορικών μονομερών, πιθανόν να σχετίζονται με φαινόμενα μετάθεσης τα οποία δρουν ως μηχανισμοί επαγωγής της εναρμονισμένης εξέλιξης (Dover 2002). Άλλωστε διαφορετικές τάξεις μεταθετών στοιχείων έχουν

χαρακτηριστεί ως πηγές κεντρομερικών δορυφορικών αλληλουχιών σε διάφορους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων, όπως στη *Drosophila* (Miller et al. 2002) αλλά και την *C. capitata* (Stratikopoulos et al. 2002).

Μια αξιοσημείωτη πληροφορία που ανέτρεψε τα δεδομένα για το δορυφορικό DNA, ήταν η ύπαρξη μεταγράφων του με ειδικότητα ως προς την αλυσίδα, τον ιστό ή το στάδιο ανάπτυξης, τα οποία ωστόσο δεν μεταφράζονται, υποδηλώνοντας την εμπλοκή τους σε ρυθμιστικές λειτουργίες (Ugarkovic 2005). Μετάγραφα δορυφορικών επαναλήψεων έχουν βρεθεί να σχετίζονται με τα ιντρόνια των γονιδίων που κωδικοποιούν τη δυνείνη στο Y χρωμόσωμα της *D. melanogaster*, *D. hydei* και *D. eohydei* (Kurek et al. 2004). Επίσης τα δορυφορικά μετάγραφα ορισμένων εντόμων λειτουργούν ως ριβοένζυμα με αυτό-καταλυτική δράση, με το φυσιολογικό τους ρόλο ωστόσο να παραμένει αδιευκρίνιστος (Rojas et al. 2000).

Μια ακόμη προτεινόμενη λειτουργία των δορυφορικών μεταγράφων που κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος τα τελευταία χρόνια, αφορά τη συμμετοχή τους στους επιγενετικούς μηχανισμούς τροποποίησης της χρωματίνης που συμπεριλαμβάνουν την έναρξη της μεθυλίωσης της ιστόνης H3, αλλά και τη μετα-μεταγραφική ρύθμιση γονιδίων μέσω της δράσης του RNA – επαγόμενου συμπλέγματος αποσιώπησης (RNA-induced silencing complex, RISC) (για ανασκόπηση Ugarkovic 2005).

Τέλος ανάμεσα στους διαφορετικούς, αν και έμμεσους, ρόλους που αποδίδονται στο δορυφορικό DNA θα πρέπει επίσης να προστεθεί η επίδρασή του στη δυναμική των χρωμοσωμάτων και την πλαστικότητα του γονιδιώματος (Plohl et al. 2008). Αν και δεν έχει αποδειχθεί ότι οι καρυστυπικές αλλαγές οδηγούν σε ειδογένεση *per se*, ωστόσο η αναδιοργάνωση των χρωμοσωμάτων (chromosomal repatterning) θα μπορούσε να ενισχύει την αναπαραγωγική απομόνωση (Coghlan et al. 2005). Παράλληλα η ανάμιξη των δορυφορικών αλληλουχιών στην αναδιάρθρωση του γονιδιώματος κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των οργανισμών μέσω της διαδικασίας απαλειφής

DNA με RNAi μηχανισμούς, τις καθιστά θερμά σημεία (“hot-spots”) ανασυνδυασμού.

1.7 ΧΑΡΤΟΓΡΑΦΗΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ

Η χαρτογράφηση του γονιδιώματος ενός οργανισμού ουσιαστικά αναφέρεται στον χαρακτηρισμό του περιεχομένου των χρωμοσωμάτων του μέσω της διάταξής του σε ένα χάρτη. Η συνεισφορά της είναι ιδιαίτερα σημαντική στην κατανόηση της οργάνωσης του γονιδιώματος, της σχετικής θέσης των γονιδίων πάνω σε αυτό, της κατανομής των συντηρημένων μοναδικών αλλά και των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών, στον έλεγχο της γονιδιακής ρύθμισης, την κατανόηση της εξελικτικής βιολογίας του οργανισμού αλλά και τη μελέτη φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ συγγενικών ειδών (Ashburner 1992). Στην τελευταία αυτή περίπτωση, η χαρτογράφηση χαρακτηρίζεται ως συγκριτική και βασίζεται στην τάση που παρουσιάζουν τα γονιδιώματα συγγενικών ειδών να εμφανίζουν συνταινιακότητα, που ερμηνεύεται ως πλήρης ή μερική διατήρηση της διάταξης των ομόλογων γονιδίων και δεικτών τους. Μέσω αυτών των συγκρίσεων είναι δυνατόν να διαπιστωθούν συντηρημένες περιοχές ομολογίας ή χρωμοσωματικές ανακατατάξεις, συνεισφέροντας στην αποκάλυψη των μηχανισμών που εμπλέκονται στη δημιουργία τους και, πιθανόν, τη διαφοροποίηση των ειδών (Zdobnov & Bork 2007).

Ένας χρωμοσωμικός χάρτης, ανάλογα με τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την κατασκευή του, χαρακτηρίζεται ως γενετικός ή φυσικός. Οι δύο αυτοί κύριοι τύποι χαρτογράφησης διαφέρουν ως προς τον καθορισμό των αποστάσεων μεταξύ των δεικτών τους, αλλά και τη διακριτική τους ικανότητα, με τη χαμηλότερη να αποδίδεται στη γενετική και την υψηλότερη στην απόλυτη φυσική χαρτογράφηση που περιλαμβάνει τον χάρτη αλληλουχίας, δηλαδή την ακριβή διαδοχή των βάσεων του DNA στα χρωμοσώματα (Casey 1992).

Παρά την έλευση της «Εποχής των Αλληλουχιών» (“sequence era”), τόσο οι φυσικοί όσο και οι γενετικοί χάρτες (ή ακόμα και οι ενοποιημένοι όπου είναι διαθέσιμοι) παραμένουν πολύτιμες και ευρέως χρησιμοποιούμενες πηγές γονιδιωματικής πληροφορίας στις χρωμοσωμικές αναλύσεις. Επιπλέον, σε προγράμματα προσδιορισμού της πλήρους αλληλουχίας ενός γονιδιώματος, λειτουργούν συμπληρωματικά προς τις μεθοδολογίες διευθέτησης και συναρμολόγησης (assembly) των ακολουθιών DNA, ως ικρίωματα προσανατολισμού.

1.7.1 Γενετικοί χάρτες

Οι γενετικοί τόποι διευθετούνται σύμφωνα με τα ποσοστά συγκληρονόμησής τους κατά τον ανασυνδυασμό των ομόλογων χρωμοσωμάτων κατά τη μείωση. Οι πρώτες προσπάθειες δημιουργίας γενετικών χαρτών στη *Drosophila* στηρίζονταν σε γονίδια και επομένως σε διασταυρώσεις διαφορετικών μεταλλαγμάτων ώστε να διαπιστωθεί εάν υφίσταται σύνδεση μεταξύ των δύο γενετικών τόπων. Συνεπώς, ένας γενετικός χάρτης ή χάρτης σύνδεσης απεικονίζει τη σχετική απόσταση ανάμεσα σε γονίδια ή/και πολυμορφικούς δείκτες πάνω στο γονιδίωμα των χρωμοσωμάτων, με βάση τη σχετική συχνότητα του μεταξύ τους ανασυνδυασμού. Η απόσταση δύο γενετικών τόπων καθορίζεται γενετικά σε μονάδες centimorgan (cM) βάσει των αποτελεσμάτων από μελέτες γενετικής σύνδεσης. Δύο γονίδια απέχουν 1 cM, αν υπάρχει 1% πιθανότητα ανασυνδυασμού μεταξύ τους σε μια μειωτική διαίρεση. Ένας γενετικός χάρτης μπορεί να περιλαμβάνει τόσο γονοτυπικούς όσο και φαινοτυπικούς δείκτες, αρκεί αυτοί να είναι πολυμορφικοί. Ο πολυμορφισμός μπορεί να παρατηρηθεί σε επίπεδο φαινοτύπου, αν επηρεάζει μια γονιδιακή λειτουργία, σε επίπεδο τμημάτων περιορισμού (RFLPs, AFLPs), αν επηρεάζει μια θέση – στόχο ενός ενζύμου περιορισμού, καθώς και σε επίπεδο αλληλουχίας (VNTRs, microsatellites, SNPs), με απευθείας ανάλυση της αλληλουχίας του DNA.

1.7.2 Φυσικοί χάρτες

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

Στην πρώτη περίπτωση συμπεριλαμβάνονται οι χρωμοσωμικοί και οι cDNA χάρτες. Οι χρωμοσωμικοί ή κυτταρογενετικοί χάρτες βασίζονται στον προσδιορισμό της θέσης γονιδίων ή τμημάτων DNA πάνω σε ένα χρωμόσωμα, σύμφωνα με το διακριτό πρότυπο ζωνών που δημιουργείται, μέσω του *in situ* υβριδισμού. Οι cDNA χάρτες ή χάρτες γονιδίων καθορίζουν τη θέση εξονίων σε χρωμοσωμικούς χάρτες, καθώς η κατασκευή τους στηρίζεται στον εντοπισμό αλληλουχιών cDNA πάνω στα χρωμοσώματα, γνωστών ως ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs). Για την ανίχνευσή τους χρησιμοποιούνται ως δείκτες είτε απευθείας κλώνοι ESTs, ή αλληλουχίες που προκύπτουν ως προϊόντα ενίσχυσής τους και καλούνται *sequence tagged sites* (STS).

Όσον αφορά τη χαρτογράφηση υψηλής ανάλυσης, σ' αυτούς συμπεριλαμβάνονται οι μακροπεριοριστικοί (macrorestriction) και οι συνεχείς χάρτες (contig). Η πρώτη κατηγορία αναφέρεται στον καθορισμό της σχετικής θέσης και της απόστασης μεταξύ τμημάτων που έχουν προκύψει από κατάτμηση του χρωμοσωμικού DNA με ένζυμα περιορισμού, ενώ η δεύτερη στη συναρμολόγηση ενιαίας αλληλουχίας μικρών αλληλεπικαλυπτόμενων τμημάτων DNA (Casey, 1992).

1.7.3 Δείκτες χαρτογράφησης

Στις μελέτες χαρτογράφησης ως δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε χαρακτηριστικά έχουν την ικανότητα να ανιχνευτούν είτε φυσικά σε επίπεδο φαινοτύπου, είτε με χρήση μοριακών τεχνικών. Εκτός από τη

χρήση γονιδίων και συνεπώς την παρατήρηση μορφολογικών μεταλλάξεων, έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν και βιοχημικοί δείκτες, κυρίως ισοένζυμα, που βασίζονταν στις διαφορές της ηλεκτροφορητικής τους κινητικότητας. Ωστόσο οι περιορισμοί που συνόδευαν τη χρήση τους, με χαρακτηριστικότερη τη μονομορφικότητά τους, οδήγησαν στην εγκατάλειψή τους.

Η ανάγκη ύπαρξης πολυμορφικών και συνάμα διάσπαρτων δεικτών στο γονιδίωμα ικανοποιήθηκε με την ανάπτυξη DNA δεικτών με χρήση μοριακών τεχνικών, οι οποίοι στην ουσία συνιστούν πολυμορφισμούς σε επίπεδο DNA.

Ανάμεσα στους πρώτους DNA δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι πολυμορφισμοί μήκους περιοριστικού θραύσματος (Restriction Fragment Length Polymorphisms, RFLPs) που αφορούν πολυμορφισμούς σε θέσεις αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού στα δύο αλληλόμορφα. Οι πολυμορφισμοί αυτοί προκύπτουν από απλές σημειακές μεταλλάξεις με αποτέλεσμα τη δημιουργία ή/και καταστροφή θέσεων περιορισμού και ανιχνεύονται μέσω ηλεκτροφόρησης βάσει της διαφοράς μεγέθους των θραυσμάτων DNA μετά από κατάτμηση του με τις αντίστοιχες ενδονουκλεάσες περιορισμού. Η τυχαία κατανομή των πολυμορφικών θέσεων περιορισμού στο γονιδίωμα, η μεγάλη συχνότητα με την οποία απαντώνται καθώς και η κληρονόμησή τους ως συνυπερέχοντες Μεντελικόι δείκτες, τους καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμους στη γενετική χαρτογράφηση.

Από τις πιο σύγχρονες και διαδοσμένες κατηγορίες δεικτών αποτελεί η ανίχνευση απλών νουκλεοτιδικών πολυμορφισμών (Single Nucleotide Polymorphisms, SNPs) (Wang et al. 1998). Αφορά αλλαγές ενός μόνο νουκλεοτιδίου και η ανάλυσή τους στηρίζεται είτε στην απευθείας σύγκριση αλληλουχιών, είτε στην υβριδοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων με την αλληλουχία στόχο. Η ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων εμποδίζει την υβριδοποίηση, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί σε μικροσυστοιχίες DNA (microarrays). Αυτού του είδους οι πολυμορφικές θέσεις αφθονούν στο γονιδίωμα και αντανακλούν την ποικιλομορφία της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των αλληλομόρφων,

προϋποθέτει ωστόσο καλή γνώση της αλληλουχίας του γονιδιώματος.

Η ανάπτυξη της τεχνικής PCR επέτρεψε τη χρήση μιας άλλης κατηγορίας δεικτών, τους πολυμορφισμούς μήκους απλών αλληλουχιών ή απλώς επαναλήψεις απλών αλληλουχιών ή απλές διαδοχικές επαναλήψεις (Simple Sequence Length Polymorphisms, SSLPs ή Simple Sequence Repeats, SSRs, ή Simple Tandem Repeats STRs) (Schletterer 1998). Ουσιαστικά οι δείκτες αυτοί αφορούν τις διαδοχικές επαναλήψεις μιας συγκεκριμένης αλληλουχίας, με αποτέλεσμα οι πολυμορφισμοί να ανιχνεύονται ως διαφοροποίηση του μεγέθους της μεταξύ των διαφορετικών αλληλομόρφων εξαιτίας του διαφορετικού αριθμού των επαναλαμβανόμενων μονάδων και να κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες Μεντελικοί χαρακτήρες. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι μινι- και μικροδορυφόροι, αλληλουχίες ιδιαίτερα ασταθείς και επιρρεπείς στις μεταλλάξεις που εντοπίζονται σε διάσπαρτες, κυρίως μη κωδικοποιητικές περιοχές. Οι μινιδορυφόροι χαρακτηρίζονται και ως εν σειρά επαναλήψεις μεταβλητού αριθμού (Variable Number of Tandem Repeats, VNTRs), με επαναλαμβανόμενο μοτίβο μήκους συνήθως από 10-60 bp, σε αντίθεση με τους μικροδορυφόρους που χαρακτηρίζονται από επαναλήψεις 1-6 bp. Οι τελευταίοι λόγω της ευκολίας απομόνωσής τους και της δυνατότητας χαρτογράφησης τους με *in situ* υβριδισμό, αποτελούν ιδιαίτερα χρήσιμους δείκτες σε γενετικές και πληθυσμιακές αναλύσεις (Ashburner 1992).

Τέλος, σημαντικά εργαλεία στα χέρια των γενετιστών αποτελούν οι δείκτες EST οι οποίοι χρησιμοποιούνται με ικανοποιητικά αποτελέσματα στις μελέτες χαρτογράφησης των γονιδιωμάτων καθορίζοντας τις θέσεις των γονιδίων στα χρωμοσώματα. Τα χαρακτηριστικά των δεικτών αυτών αναλύονται στην επόμενη ενότητα.

1.7.4 Ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs)

Οι ετικέτες εκφραζόμενων αλληλουχιών (ESTs) αντιστοιχούν σε τμήματα DNA με δυνατότητα

έκφρασης (Parkinson & Blaxter 2009). Η χρήση των δεικτών αυτών αποδείχθηκε ιδιαίτερα σημαντική όσον αφορά τη χαρτογράφηση γονιδίων αλλά και την ταυτοποίησή τους, καθώς αποτελούν cDNA αλληλουχίες που αντιπροσωπεύουν ένα γονίδιο μερικώς ή στο σύνολό του. Οι ESTs είναι αλληλουχίες μέσου μήκους περίπου 500 bp, που προκύπτουν από τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής του 5' ή/και του 3' άκρου τμημάτων cDNA τυχαίας επιλογής (Εικ. 3.2.1).

Ο ρόλος τους ως δείκτες στην ανίχνευση γονιδίων απορρέει από την ικανότητά τους να προσδένονται συμπληρωματικά σε μοναδικές περιοχές του γονιδιώματος. Η αποτελεσματικότητά τους προς την κατεύθυνση αυτή περιορίζεται ανάλογα με το είδος του οργανισμού, το μέγεθος του γονιδιώματος αλλά και αυτής καθ' αυτής της αλληλουχίας EST, καθώς επίσης και από την παρουσία ή απουσία ιντρονίων που παρεμβάλλονται μεταξύ των μεταγραφόμενων περιοχών του γονιδίου.

Επιπλέον, όσον αφορά τη μοριακή μελέτη ενός οργανισμού, η ανάλυση των ESTs αποτελεί μια αποτελεσματική και ταυτόχρονα οικονομική προσέγγιση για την ανεύρεση και ταυτοποίηση γονιδίων (Adams et al. 2001, Deng et al. 2006, Gomulski et al. 2008), την ανίχνευση γονιδιακής έκφρασης (Whitfield et al. 2002), τη φυσική χαρτογράφηση του γονιδιώματος (della Torre et al. 1996, Hirosawa et al. 2001) και την ανάπτυξη μοριακών δεικτών (He and Haymer 1997; 1999, Papanicolaou et al. 2005). Σε οργανισμούς στους οποίους είναι διαθέσιμα πολυταινικά χρωμοσώματα όπως ο δάκος, ο *in situ* υβριδισμός των ESTs μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της ακριβούς θέσης ενός εκφραζόμενου γονιδίου (Adams et al. 1991) δημιουργώντας έτσι σημεία αναφοράς (entry points) στο γονιδίωμα, χρήσιμα σε μελέτες γενετικής χαρτογράφησης. Η ανάλυση των EST δεικτών μπορεί να συμβάλει επίσης στον προσδιορισμό των μεταγραφόμενων περιοχών του γονιδιώματος, μέσω του καθορισμού των ορίων μεταξύ εξονίων και ιντρονίων. Επιπλέον, λόγω της συντηρημένης αλληλουχίας τους, επιτρέπουν την εφαρμογή τεχνικών που βασίζονται

στη σύγκριση ιντρονικών περιοχών μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, διευκολύνοντας έτσι μελέτες σε επίπεδο φυλογενετικών σχέσεων, αναπτυξιακό και εξελικτικό. Τέλος, σε περιπτώσεις οργανισμών που δεν αποτελούν μοντέλα, όπως ο δάκος, για τους οποίους η ανάλυση μεγάλης κλίμακας του γονιδιώματος (whole genome sequencing) δεν παρουσιάζεται ως βραχυπρόθεσμος στόχος, η ανάλυση EST αλληλουχιών αντιπροσωπεύει μια αποτελεσματική και οικονομική μέθοδο ανίχνευσης γονιδίων.

1.8 ΣΚΟΠΟΣ

Ο δάκος της ελιάς είναι αναμφισβήτητα ο κυριότερος εχθρός του καρπού της ελιάς και για το λόγο αυτό αποτελεί βασικό στόχο των φυτοπροστατευτικών προσπαθειών όλων των ελαιοκαλλιεργητικών χωρών.

Η γονιδιωματική ανάλυση του δάκου, πέρα από τη σημασία της στη βασική έρευνα του εντόμου, έχει και προεκτάσεις σε εναλλακτικές μεθόδους βιολογικού ελέγχου, όπως για παράδειγμα η τεχνική του στείρου εντόμου (SIT). Η αποτελεσματική εφαρμογή τέτοιων μεθόδων προαπαιτεί την ύπαρξη βασικών μοριακών και γενετικών εργαλείων. Η κατανόηση της οργάνωσης του γονιδιώματος, τόσο ως προς τις μεταγραφικές μονάδες όσο και ως προς γονιδιωματικές επαναλήψεις, θα συνεισφέρει προς την κατεύθυνση της ανάπτυξης νέων εργαλείων γενετικής διαχείρισης του εντόμου.

Με γνώμονα τα παραπάνω, αρχικά θεωρήθηκε σκόπιμος ο υπολογισμός του μεγέθους του γονιδιώματος του δάκου, κάτι το οποίο είναι και μέτρο της πολυπλοκότητας της οργάνωσής του. Κατά δεύτερο λόγο, στόχος ήταν η απομόνωση και

ανάλυση EST δεικτών του δάκου και την ανάπτυξη μιας σειράς εφαρμογών και εργαλείων (κυτταρογενετικός χάρτης, ανάπτυξη EPIC δεικτών και δια-ειδική ενίσχυσή τους σε άλλα είδη της οικογένειας Tephritidae, έλεγχος του προφίλ χρήσης κωδικονίων κατά τη μεταγραφή), παρέχοντας σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη μοριακή, εξελικτική και συγκριτική βιολογία του οργανισμού. Τέλος, στο βαθμό που τα μεταθετά στοιχεία και οι επαναλήψεις αποτελούν σημαντικό μέρος της γονιδιωματικής οργάνωσης των ευκαρυωτικών οργανισμών, κρίθηκε αναγκαία η σε βάθος ανάλυση της δομής και της οργάνωσης του πρώτου ρετρομεταθετού στοιχείου του δάκου, *Achilles*, τμήμα του οποίου ήταν ήδη διαθέσιμο. Παράλληλα, κατά την παραπάνω αναζήτηση, η αποκάλυψη μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας, δεν θα μπορούσε να περάσει απαρατήρητη. Διερευνήθηκε λοιπόν περαιτέρω όσον αφορά τα χαρακτηριστικά της, την ειδικότητά της αλλά και την κατανομή της στα χρωμοσώματα του εντόμου και συνολικά τη συμμετοχή της στη δομή του γονιδιώματος

2 ΜΕΘΟΔΟΙ & ΥΛΙΚΑ

2.1 ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.1.1 Τεχνητή εκτροφή εντόμου *B. oleae*

Το εργαστηριακό στέλεχος του εντόμου *Bactrocera oleae* προέρχεται από το εργαστήριο Εντομολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», όπου δημιουργήθηκε πριν από περισσότερα από 40 χρόνια. Το στέλεχος διατηρείται σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας $23 \pm 2^\circ\text{C}$, σχετικής υγρασίας $65 \pm 5\%$ και φωτοπεριόδου 12h (Tzanakakis 1989).

2.1.1.1 Ενήλικα άτομα

Ενήλικα άτομα τοποθετούνται σε ειδικά διαμορφωμένους κλωβούς, με παροχή τροφής ενηλίκων και νερού. Η κατασκευή του κλουβιού πρέπει να εξασφαλίζει επαρκή αερισμό και χώρο κίνησης, καθώς επίσης και την κατάλληλη σκίαση που θα προσφέρει θέσεις μειωμένου φωτισμού. Βάσει των παραπάνω προϋποθέσεων, για τη διατήρηση ενός πληθυσμού περί των 200 ατόμων απαιτείται κλουβί διαστάσεων 30cm × 30cm × 30cm, χωρίς ωστόσο να υπάρχει περιορισμός στο υλικό κατασκευής (ξύλο, πλαστικό ή πλέξιγκλας). Ο αερισμός επιτυγχάνεται με πλαϊνά ανοίγματα στα οποία προσαρμόζεται εντομοστεγές δίχτυ. Η τροφή των ενηλίκων παρέχεται σε τρυβλίο petri σε στερεή μορφή (Tsitsipis & Kontos 1983), ενώ η πρόσληψη του νερού γίνεται με απομύζηση από σπογγώδες υλικό (wettex) που τοποθετείται σε μικρό πλαστικό δοχείο νερού ώστε να διατηρείται συνεχώς υγρό (Tzanakakis 1989).

2.1.1.2 Υπόστρωμα ωτοκίας

Κάθετα στο κλουβί, σε εκατέρωθεν ανοίγματα ώστε να το διαπερνά, προσαρμόζεται ανεστραμμένος κώνος (~30cm ύψος, 15cm διάμετρος) από συνθετικό ύφασμα (οργαντίνα) επενδυμένος με μείγμα παραφινών. Η εμβάπτιση του κώνου στο μείγμα λιωμένων παραφινών δημιουργεί ένα τεχνητό υπόστρωμα ωτοκίας, καθώς τα θηλυκά άτομα διαπερνούν την επιφάνεια αυτή με τον ωθότη τους και αποθέτουν τα αυγά

τους στο εσωτερικό τοίχωμα του κώνου (Econoμπορουλος & Tzanakakis 1989). Στην κορυφή του κώνου, εσωτερικά, τοποθετείται νωπός σπόγγος ώστε να εξασφαλίζεται η απαιτούμενη σχετική υγρασία για την καλύτερη διατήρηση των αυγών μέχρι τη συλλογή τους.

2.1.1.3 Συλλογή αυγών

Η αναπαραγωγική ωρίμανση των ενηλίκων ατόμων επέρχεται μετά από τέσσερις περίπου ημέρες από την εκκόλαψή τους. Ωστόσο το μέγιστο ποσοστό ωοαπόθεσης παρατηρείται στο διάστημα της δεύτερης εβδομάδας της ζωής τους. Η συλλογή των αυγών πραγματοποιείται ανά δύο μέρες και διευκολύνεται από τη διευθέτηση του κώνου στο εσωτερικό του κλουβιού. Κατά τη διαδικασία συλλογής, η εσωτερική επιφάνεια του κώνου ξεπλένεται με dH_2O , του οποίου η ροή συμπαρασύρει τα αυγά στον πυθμένα του. Τα αυγά που συγκεντρώνονται, ακολούθως επωάζονται σε διηθητικό χαρτί που έχει εμβαπτιστεί σε διάλυμα προπιονικού οξέος 0.3% (Manoukas and Mazomenos 1977) για διάστημα 48-72 ωρών και σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας (90%). Το προπιονικό οξύ προστατεύει τα αυγά από πιθανή ανάπτυξη μυκήτων, ενώ ταυτόχρονα παρέχει ηπιότερες συνθήκες για την ολοκλήρωση της εμβρυογένεσης (σε αντίθεση με το όξινο περιβάλλον της τροφής των προνυμφών).

2.1.1.4 Προνυμφικό στάδιο

Οι προνύμφες που προκύπτουν κατά την εκκόλαψη των γονιμοποιημένων αυγών, τοποθετούνται σε τροφή προνυμφών σε καλά αεριζόμενα τρυβλία (Tsitsipis 1975, Tzanakakis et al. 1989), όπου παραμένουν μέχρις ότου να ολοκληρωθεί η προνυμφική ανάπτυξη, μέσης διάρκειας 8 ημερών. Ο συνολικός αριθμός των προνυμφών ανά τρυβλίο τροφής είναι ιδιαίτερα κρίσιμος και καθορίζεται ως 20 άτομα ανά γραμμάριο. Αντίθετα σε συνθήκες συνωστισμού ευνοούνται φαινόμενα ανταγωνισμού / κανιβαλισμού και αυξάνονται οι τοξικές επιδράσεις των μεταβολικών τους προϊόντων.

2.1.1.5 Νυμφικό στάδιο

Ο σχηματισμός των νυμφών παρατηρείται συνήθως κατά την 8^η μέρα προνυμφικής ανάπτυξης, οπότε οι προνύμφες 3^{ου} σταδίου βομβυκιώνονται είτε στο εσωτερικό είτε στην επιφάνεια της τροφής όπου διατηρούνται. Ακολούθως συλλέγονται σε τρυβλία και μεταφέρονται σε κλουβί για την ανανέωση της καλλιέργειας, πριν την έναρξη της εξόδου των ενηλίκων από το νυμφικό περίβλημα (Tzanakakis 1989). Το στάδιο αυτό της μεταμόρφωσης σε ακμαία άτομα σηματοδοτεί την έναρξη του νέου βιολογικού κύκλου του εργαστηριακού στελέχους, συνολικής διάρκειας 30 περίπου ημερών. Το διάστημα μεταξύ δύο διαδοχικών γενεών μπορεί να παραταθεί με διατήρηση των νυμφών σε περιβάλλον χαμηλότερης θερμοκρασίας (θάλαμος 16°C).

2.1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων

Οι τεχνικές καλλιέργειας βακτηρίων βασίζονται στην παραγωγή πανομοιότυπων κυττάρων-κλώνων που αναπτύσσονται μετά από αλληπάλληλες διαιρέσεις ενός βακτηριακού κυττάρου. Το υπόστρωμα της καλλιέργειας μπορεί να είναι κάθε υγρό ή στερεό μέσο πλούσιο σε συστατικά που μπορεί να εξασφαλίσει την ανάπτυξη του μικροοργανισμού και τις θρεπτικές του ανάγκες. Γενικά κάθε θρεπτικό υπόστρωμα πρέπει να περιέχει νερό, πηγές άνθρακα, ενέργειας, αζώτου, αλάτων και ιχνοστοιχείων. Ο ρυθμός ανάπτυξης ενός πληθυσμού βακτηρίων είναι χαρακτηριστικός κάθε είδους και επηρεάζεται από διάφορους βιοφυσικούς παράγοντες (θερμοκρασία, οξύγνο, pH, ωσμωτική πίεση). Σε κατάλληλο περιβάλλον και συνθήκες πλήρους επάρκειας των απαραίτητων θρεπτικών συστατικών, ο ρυθμός αυτός αυξάνεται εκθετικά. Η διασφάλιση της ανάπτυξης μόνο του επιθυμητού βακτηριακού στελέχους επιτυγχάνεται μετατρέποντας ένα τυπικό υπόστρωμα σε εκλεκτικό, με την προσθήκη του κατάλληλου αντιβιοτικού (Sambrook et al. 1989).

2.1.2.1 Ανάπτυξη σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα

Οι καλλιέργειες σε στερεά θρεπτικά υποστρώματα προσφέρουν τη δυνατότητα λήψης καθαρών καλλιεργειών. Επιπλέον η μικροβιακή μάζα αναπτύσσεται στην επιφάνεια του στερεού θρεπτικού μέσου υπό μορφή ξεχωριστών αποικιών καθιστώντας εύκολη την απομόνωσή τους.

Μεθοδολογία

1. Το αποστειρωμένο στερεό μέσο LB που περιέχεται σε τρυβλίο petri (20 ml) επιστρώνεται σε ασηπτικές συνθήκες με κύτταρα από στερεή καλλιέργεια ή υδατικό εναιώρημα με χρήση μικροβιολογικού κρίκου ή γυάλινης ράβδου διασποράς.
2. Το τρυβλίο επωάζεται ανεστραμμένο σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας για 12-16 h.

2.1.2.2 Ανάπτυξη σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα

Η καλλιέργεια σε υγρό θρεπτικό μέσο εφαρμόζεται για την παραγωγή μεγάλης ποσότητας μιας αποικίας βακτηρίων, που έχει αναπτυχθεί σε καλλιέργεια στερεού μέσου, καθώς δεν παρέχει τη δυνατότητα διαχωρισμού ειδών ή στελεχών.

Μεθοδολογία

1. Το αποστειρωμένο υγρό μέσο που περιέχεται σε δοκιμαστικό σωλήνα (3 ml) ή κωνική φιάλη ενοφθαλμίζεται σε ασηπτικές συνθήκες με κύτταρα μοναδικής βακτηριακής αποικίας από στερεή καλλιέργεια ή υδατικού εναιωρήματος με χρήση μικροβιολογικού κρίκου.

⊗ Ο όγκος του υγρού μέσου δε πρέπει να υπερβαίνει το 20% του όγκου σωλήνα ή της φιάλης.

2. Η καλλιέργεια τοποθετείται σε επωαστήρα ανάδευσης (220 rpm) για 12-16 h, με διατήρηση της κατάλληλης θερμοκρασίας για την ανάπτυξη του βακτηρίου.

⊗ Η ανάδευση συμβάλλει στην βελτίωση των συνθηκών αερισμού, καθώς αυξάνεται ο λόγος επιφάνεια/όγκος του υγρού.

⊗ Για τη μακρόχρονη διατήρησή τους, τα εναιωρήματα βακτηριακών καλλιεργειών καταψύχονται σε θερμοκρασία - 80°C παρουσία γλυκερόλης, που εξασφαλίζει την ακεραιότητα των κυττάρων κατά την ψύξη, αναμειγνύοντας σε σωληνάκι τύπου errendorf με

ήπια ανάδευση 850 µl εναιωρήματος κυττάρων με 150 µl γλυκερόλης.

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Οι μέθοδοι που εφαρμόζονται για την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων από κύτταρα βιολογικού υλικού στηρίζονται σε τρεις βασικές αρχές: την κυτταρόλυση, την απομάκρυνση πρωτεϊνών και τελικά την απομόνωση του νουκλεϊκού οξέος. Η λύση των κυττάρων επιτυγχάνεται με ήπια διάρρηξη της κυτταρικής μεμβράνης μηχανικά ή ωσμοτικά (με χρήση χημικών ή ενζυμικών παραγόντων). Η ακεραιότητα του επιθυμητού νουκλεϊκού οξέος εξασφαλίζεται με αναστολή των κυτταρικών νουκλεασών παρουσία χηλικών παραγόντων και χαοτροπικών αλάτων. Τελικά το προς ανάκτηση υλικό απομονώνεται με κατακρήμνιση ή μέσω στηλών διήθησης.

2.2.1 Απομόνωση γονιδιωµατικού DNA από ενήλικα άτομα *Bactreocera oleae*

Η απομόνωση του γονιδιωµατικού DNA από ενήλικα άτομα *Bactreocera oleae* πραγματοποιήθηκε με χρήση του Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε αποτελεί παραλλαγή του πρωτοκόλλου που προτείνεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Η μέθοδος περιλαμβάνει την ομογενοποίηση των ιστών του εντόμου, τη λύση των κυττάρων, την κατακρήμνιση κυτταρικών υπολειµμάτων και πρωτεϊνών παρουσία αλάτων και τελικά την ανάκτηση του DNA μετά από κατακρήμνιση με ισοπροπανόλη. Σύμφωνα με τη μέγιστη δυνατή απόδοση του kit, είναι εφικτή η απομόνωση DNA από 1-3 ενήλικα άτομα εντόμου ταυτόχρονα.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf τοποθετείται ένα ενήλικο άτομο δάκου και με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου, ομογενοποιείται σε 400 µl Διαλύματος Λύσης Πυρήνων (Nuclei Lysis Solution) που διατηρείται σε πάγο.

2. Το ομογενοποίηµα επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 25 min.
3. Αφού το διάλυµα επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθενται 135 µl Διαλύµατος Κατακρήµνισης Πρωτεϊνών (Protein Precipitation Solution) και µετά από ισχυρή ανάδευση ακολουθεί επώαση σε πάγο για 5 min.
4. Στη συνέχεια το µείγµα φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 5 min και το υπερκείμενο µεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.
5. Προστίθενται 400 µl ισοπροπανόλης και ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 14,000 g για 5 min, µετά από ήπια ανάδευση.
6. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζηµα εκπλένεται µε 500 µl παγωµένης αιθανόλης 70% και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 2 min.
7. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και ακολουθεί εξάτµιση του διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το γονιδιωµατικό DNA λαµβάνεται ως ίζηµα, το οποίο επαναδιαλύεται σε 100 µl Διαλύµατος Ενυδάτωσης DNA (DNA Rehydration solution) και επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 1 h.
9. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C ή -20°C.

2.2.2 Απομόνωση ολικού RNA από ενήλικα άτομα *Bactreocera oleae*

Σε ένα τυπικό ευκαρυωτικό κύτταρο εµπεριέχονται κατά προσέγγιση 10^{-5} µg RNA, εκ των οποίων µόνο το 1-5% αντιστοιχεί στο αγγελιοφόρο mRNA. Η υπόλοιπη ποσότητα αποτελείται από το ριβοσωµικό RNA σε ποσοστό 80-85%, ενώ περίπου ~15-20% αντιστοιχεί σε tRNA και µικρό πυρηνικό RNA. Η αποτελεσµατικότητα της απομόνωσης του ολικού RNA έγκειται στην εξασφάλιση της ακεραιότητάς του από την αποικοδοµητική δράση των ενδογενών κυτταρικών ριβονουκλεασών. Αυτό επιτυγχάνεται απενεργοποιώντας τις ριβονουκλεάσες στο πρώτο στάδιο της ομογενοποίησης των ιστών, µε τη χρήση της ισοθειοκυανικής γουανιδίνης. Ο ισχυρός αυτός χαοτροπικός παράγοντας καταστρέφει την τριτοταγή δοµή των πρωτεϊνών και µε παράλληλη χρήση αναγωγικών παραγόντων µε ικανότητα

διάσπασης των δισουλφιδικών δεσμών, τελικά οδηγεί στην αποδέσμευση του RNA από τις ριβοπρωτεΐνες και παράλληλα στην απενεργοποίηση των ριβονουκλεασών.

Η απομόνωση του ολικού RNA από ενήλικα άτομα *Bactrocera oleae* πραγματοποιήθηκε με χρήση του Absolutely RNA® Miniprep kit (Stratagene) σύμφωνα με το πρωτόκολλο που προτείνεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Η μέθοδος συνίσταται i) στην ομογενοποίηση των ιστών του εντόμου, ii) τη λύση των κυττάρων σε διάλυμα παρουσία ισοθειοκυανικής γουανιδίνης και β-μερκαπτοαιθανόλης, iii) την κατακρήμνιση κυτταρικών υπολειμμάτων, iv) το διαχωρισμό RNA-πρωτεϊνών και τελικά v) την ανάκτηση του RNA με την επιλεκτική του πρόσδεση σε στήλη πυριτίου υπό συνθήκες χαμηλής ιοντικής ισχύος. Η απομάκρυνση του γονιδιωματικού DNA εξασφαλίζεται με κατεργασία με δεοξυριβονουκλεάση (DNase I).

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf τοποθετείται ένα ενήλικο άτομο δάκου και με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου, ομογενοποιείται σε 400 μl Διαλύματος Λύσης (Lysis Solution) και 1.4 μl β-μερκαπτοαιθανόλης (β-ME) 14.2 M.

⊗ Τα προς χρήση άτομα καταψύχονται όντας ζωντανά για να περιοριστεί η αποικοδόμηση του RNA μετά τη νέκρωση των κυττάρων, ενώ ο εξοπλισμός κατεργάζεται με διάλυμα DEPC, το οποίο αδρανοποιεί τις RNάσες.

2. Το ομογενοποίημα μεταφέρεται σε στήλη (Prefilter Spin Cup), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής (Receptable tube) και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 5 min.

3. Ακολούθως η στήλη απομακρύνεται και στο έκλουσμα προστίθεται ίσος όγκος αιθανόλης 70%.

4. Το μείγμα μετά από ήπια ανάδευση μεταφέρεται μεταφέρεται σε στήλη σύνδεσης RNA (RNA Binding Spin Cup), η οποία έχει τοποθετηθεί σε σωλήνα συλλογής και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 1 λεπτό.

5. Το έκλουσμα απομακρύνεται από το σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη.

6. Στη συνέχεια προστίθεται στη στήλη 1X Διάλυμα Πλύσης χαμηλής ιοντικής ισχύος (600 μl, 1X Low-Salt Wash Buffer) και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 1 min.

7. Το έκλουσμα απορρίπτεται και επαναφυγοκεντρείται σε 14,000 g για 2 min, για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης.

8. Προστίθενται στη στήλη 50 μl Διαλύματος DNάσης I (DNase Digestion Buffer + 5 μl DNase I) και ακολουθεί επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 15 min.

9. Στη συνέχεια μετά από προσθήκη 600 μl Διαλύματος Πλύσης υψηλής ιοντικής ισχύος (1X High-Salt Wash Buffer), πραγματοποιείται φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 1 min.

10. Το έκλουσμα απορρίπτεται από το σωλήνα συλλογής και προστίθενται στη στήλη 600 μl 1X Διαλύματος Πλύσης χαμηλής ιοντικής ισχύος.

11. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 1 min και απόρριψη του εκλούσματος από το σωλήνα συλλογής.

12. Προστίθενται 300 μl Διαλύματος Πλύσης χαμηλής ιοντικής ισχύος (1X) και η στήλη φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 2 min, για την πλήρη απομάκρυνση της αιθανόλης.

13. Ακολουθεί μεταφορά της στήλης σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf και προσθήκη 50 μl Διαλύματος Έκλουσης (Elution Solution) προθερμασμένου σε θερμοκρασία 60°C.

14. Η στήλη επάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 min και τελικά το RNA ανακτάται με έκλυση μετά από φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 2 min.

15. Το RNA διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C ή -80°C ανάλογα με το αν πρόκειται για μικρό ή μεγάλο χρονικό διάστημα αποθήκευσης αντίστοιχα.

2.2.3 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

Για την απομόνωση πλασμιδίων μιας βακτηριακής καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος της αλκαλικής λύσης (Birnbom & Doly 1979, Ish-Horowicz & Burke 1981), που αποδίδει

πλασμίδια υψηλού βαθμού καθαρότητας και συγκέντρωσης (5 µg πλασμιδιακού DNA/ 1 ml βακτηριακής καλλιέργειας). Αρχικά η κατεργασία των κυττάρων γίνεται με διάλυμα που περιέχει γλυκόζη, EDTA και Tris, ώστε να εξασφαλίζεται η διατήρηση της ισοτονικότητάς τους (και επομένως να αποφεύγεται η ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών λόγω ωσμωτικής πίεσης), η παρεμπόδιση δράσης νουκλεασών και η διατήρηση του pH αντίστοιχα. Η αλκαλική μέθοδος συνίσταται στην αποδιάταξη, παρουσία NaOH και SDS, του χρωμοσωμικού DNA και των πρωτεϊνών των βακτηρίων. Το απορρυπαντικό SDS αποδιάττει τις πρωτεΐνες και διασπά τα μεμβρανικά τοιχώματα με την απομάκρυνση λιπιδίων ώστε να εξέλθουν τελικά τα μόρια του πλασμιδιακού και όχι του χρωμοσωμικού DNA. Το NaOH λειτουργεί ως αποδιατακτικό του DNA καταστρέφοντας τους δεσμούς υδρογόνου και επιτρέποντας την ελεγχόμενη ρήξη των μεμβρανών. Παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων οξικού καλίου εξουδετερώνονται οι αλκαλικές συνθήκες λύσης, με αποτέλεσμα να κατακρημνίζονται ως αδιάλυτα σύμπλοκα τα κυτταρικά υπολείμματα και οι πρωτεΐνες που έχουν συνδεθεί με το SDS. Ταυτόχρονα κατακρημνίζεται και ένα μεγάλο ποσοστό του χρωμοσωμικού DNA που έχει προσδεθεί στις μεμβράνες. Το πλασμιδιακό DNA παραμένει σε διαλυτή μορφή και παραλαμβάνεται με φυγοκέντρηση από το υπερκείμενο. Η απομόνωσή του ολοκληρώνεται μετά από εκχύλιση με φαινόλη – χλωροφόρμιο, κατακρήμιση με αιθανόλη και τελικά αναδιάλυση σε ρυθμιστικό διάλυμα RNάσης (ελεύθερο DNAσών), ώστε να αποικοδομηθούν τα μόρια βακτηριακού RNA.

Μεθοδολογία

1. Μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα αναπτύσσονται σε υγρό θρεπτικό μέσο παρουσία αντιβιοτικού.
2. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf μεταφέρεται ποσότητα της βακτηριακής καλλιέργειας (1.5 ml) και φυγοκεντρείται σε 3,000 g για 3min για τη συλλογή των κυττάρων.
3. Τα κύτταρα καθιζάνουν και το υπερκείμενο διάλυμα απορρίπτεται.

4. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 100 µl παγωμένου Διαλύματος I και επώάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
5. Ακολουθεί προσθήκη 200 µl πρόσφατα παρασκευασμένου Διαλύματος II, ήπια ανάδευση και επώαση στον πάγο για 3-5 min.
Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η κυτταρική λύση γι' αυτό και αυξάνεται το ιξώδες του διαλύματος.
6. Προστίθενται 150 µl παγωμένου Διαλύματος III και το μείγμα επώάζεται στον πάγο για 6-8 min μετά από ήπια ανάδευση.
7. Το μείγμα φυγοκεντρείται σε 12,000 g για 10 min, και το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.
8. Πραγματοποιείται εκχύλιση με φαινόλη-χλωροφόρμιο και κατακρήμιση με αιθανόλη.
9. Το πλασμιδιακό DNA λαμβάνεται ως ίζημα, το οποίο επαναδιαλύεται σε 100 µl ρυθμιστικού διαλύματος TE-RNάσης A (RNase A, σε τελική συγκέντρωση 20 µg/ml) και διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C ή -20°C.

2.3 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.3.1 Εκχύλιση DNA με φαινόλη/χλωροφόρμιο

Μέσω της εκχύλισης με οργανικούς διαλύτες επιτυγχάνεται η απομάκρυνση πρωτεϊνών και κυτταρικών υπολειμμάτων από διαλύματα νουκλεϊκών οξέων. Η μέθοδος βασίζεται στην ικανότητα της φαινόλης να αποδιατάσσει τις φυσιολογικές δομές των πρωτεϊνών και τις κυτταρικές μεμβράνες. Για την εξασφάλιση της προστασίας των νουκλεϊκών οξέων από τα προϊόντα οξειδωσης της φαινόλης, συνιστάται η χρήση εξισορροπημένου διαλύτη. Η ταυτόχρονη προσθήκη του χλωροφορμίου οδηγεί στον σχηματισμό γαλακτωμάτων, αυξάνοντας την πυκνότητα της οργανικής (κάτω) φάσης. Μετά από φυγοκέντρηση η υδατική (άνω) φάση περιέχει τα υδατοδιαλυτά νουκλεϊκά οξέα, ενώ οι πρωτεΐνες συγκεντρώνονται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δύο φάσεων (μεσόφαση) (Sambrook et al. 1989).

Μεθοδολογία

1. Σε υδατικό διάλυμα DNA προστίθεται ίσος όγκος φαινόλης/χλωροφορμίου (1:1).
2. Το μείγμα αναδεύεται ισχυρά, διατηρείται για 15 min σε θερμοκρασία -80°C για 15 λεπτά και φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 20 min.
3. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα εκπλένεται με μισό όγκο (0.5 V) αιθανόλης 70%, για την απομάκρυνση των αλάτων.
4. Ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 5 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου.
5. Μετά την εξάτμιση του διαλύτη σε θερμοκρασία δωματίου, το ίζημα επαναδιαλύεται σε επιθυμητό όγκο υδατικού ή ρυθμιστικού διαλύματος TE.

2.3.2 Κατακρήμιση DNA με αιθανόλη

Η συγκεκριμένη μέθοδος επιτρέπει τη συμπύκνωση των νουκλεϊκών οξέων, αλλά και την απομάκρυνση αλάτων και άλλων προσμίξεων από υδατικά διαλύματα νουκλεϊκών οξέων (Sambrook et al. 1989). Βασική αρχή για την κατακρήμιση νουκλεϊκών οξέων είναι η μείωση της διαλυτότητας των μορίων τους, η οποία εξασφαλίζεται σε συνθήκες χαμηλής θερμοκρασίας και υψηλής ιοντικής ισχύος με χρήση μονοσθενών κατιόντων και αιθανόλης. Η αιθανόλη λειτουργεί ως αφυδατικό μέσο του υδατικού περιβάλλοντος των νουκλεϊκών οξέων, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η δέσμευση των κατιόντων με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων. Η εξουδετέρωση του ηλεκτρικού φορτίου του DNA το καθιστά λιγότερο υδροφιλικό, και συνεπώς λιγότερο υδατοδιαλυτό, επιτρέποντας την καθίζησή του.

Μεθοδολογία

1. Σε υδατικό διάλυμα DNA όγκου V προστίθενται διπλάσιος όγκος (2 V) παγωμένης απόλυτης αιθανόλης (100%) και οξικό νάτριο (CH_3COONa) σε τελική συγκέντρωση 0.3 M.

☞ Για την αποτελεσματική κατακρήμιση μικρής ποσότητας (έως 1ml) νουκλεϊκών οξέων προστίθεται 1μl γλυκογόνο (20 mg/ml) το οποίο παραμένει αδιάλυτο σε διάλυμα αιθανόλης, λειτουργώντας ως φορέας συγκατακρήμισης.

2.3.3 Ποσοτικός προσδιορισμός νουκλεϊκών οξέων

2.3.3.1 Φασματοφωτομετρικός προσδιορισμός

Η συγκέντρωση ενός δίκλωνου νουκλεϊκού οξέος προσδιορίζεται φωτομετρικά με μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 260 nm (A_{260}). Για δίκλιωνα μόρια DNA η συγκέντρωση ($\mu\text{g/ml}$) υπολογίζεται από το γινόμενο: $A_{260} \times 50$. Η τιμή 50 αντιστοιχεί στη συγκέντρωσή τους ($\mu\text{g/ml}$) όταν η οπτική απορρόφηση ισούται με 1 ($\text{OD}=1$). Η αντίστοιχη τιμή για μόρια RNA ή μονόκλιωνα DNA είναι 40, ενώ για μονόκλιωνα ολιγονουκλεοτίδια 20. Η αναλογία των τιμών απορρόφησης στα 260 nm και στα 280 nm προσδιορίζει το βαθμό καθαρότητας του δείγματος. Όταν ο λόγος A_{260}/A_{280} κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.0 το δείγμα εκτιμάται ως καθαρό, ενώ όταν είναι μικρότερος αυτών των ορίων υποδηλώνει την πρόσμιξη με πρωτεΐνες ή άλλα οργανικά στοιχεία (πχ. φαινόλη).

2.3.3.2 Ηλεκτροφορητικός προσδιορισμός

Ο ποσοτικός προσδιορισμός δειγμάτων DNA ή RNA με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης γίνεται μέσω σύγκρισης με κάποιον ποσοτικοποιημένο μάρτυρα γνωστού μεγέθους που ηλεκτροφορείται παράλληλα. Η μέθοδος χρησιμοποιείται εναλλακτικά του φασματοφωτομετρικού προσδιορισμού όταν τα διαλύματα των νουκλεϊκών οξέων περιέχουν προσμίξεις που απορροφούν στο υπεριώδες φως. Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην οπτική εκτίμηση

του φθορισμού που παράγεται υπό υπεριώδες φως από τα μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου. Η ένωση αυτή έχει την ιδιότητα ενσωμάτωσης στα μόρια νουκλεϊκών οξέων σε βαθμό ανάλογο της συγκέντρωσής τους. Έτσι μέσω της σύγκρισης του φθορισμού που εκπέμπεται αντίστοιχα από το προς ανάλυση δείγμα και τον ποσοτικοποιημένο μάρτυρα, εκτιμάται η συγκέντρωση του πρώτου. Η ελάχιστη συγκέντρωση DNA που μπορεί να ανιχνευτεί με τον τρόπο αυτό είναι 10 ng, εφόσον το δείγμα ηλεκτροφορηθεί σε πήκτωμα αγαρόζης 1% με περιεκτικότητα βρωμιούχου αιθιδίου 0.5 gr ανά 1 ml διαλύματος.

2.3.4 Κατάτμηση DNA με ένζυμα περιορισμού

Τα ένζυμα περιορισμού είναι ενδονουκλεάσες που αναγνωρίζουν μικρές ολιγονουκλεοτιδικές αλληλουχίες και τέμνουν ειδικά και επαναλήψιμα περιοχές κατά μήκος μιας δίκλωνης ακολουθίας DNA. Πηγή απομόνωσης των περιοριστικών ενδονουκλεασών φυσιολογικά είναι τα βακτήρια, στα οποία εξασφαλίζουν προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι της εισβολής φαγικών σωματιδίων των ιών. Ο τρόπος δράσης των ενζύμων αυτών βασίζεται στην ικανότητά τους να αναγνωρίζουν ειδικές παλίνδρομες αλληλουχίες τεσσάρων έως οκτώ βάσεων και να καταλύουν την υδρόλυση ενός φωσφοδιεστερικού δεσμού σε κάθε αλυσίδα της περιοχής αυτής, προς τη θέση 3' σε σχέση με τον άξονα αμφίπλευρης συμμετρίας. Τελικά, ανάλογα με το αν τα ένζυμα τέμνουν στο κέντρο της θέσης αναγνώρισης ή δημιουργούν ασυμπτωματικές, συμμετρικές εγκοπές εκατέρωθεν αυτής, προκύπτουν τμήματα DNA με συμπληρωματικά (προεξέχοντα) ή τυφλά άκρα. Για τη βελτιστοποίηση μιας αντίδρασης πέψης πρέπει να ληφθούν υπόψη παράγοντες όπως η ιονική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer), η θερμοκρασία και ο χρόνος επώασης και η ποσότητα του ενζύμου. Η απαιτούμενη ποσότητα ενζύμου εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωση και το μέγεθος του τμήματος DNA που πρόκειται να τμηθεί (Sambrook et al. 1989).

2.3.4.1 Πλήρης κατάτμηση

Η πλήρης κατάτμηση αναφέρεται στην δημιουργία θραυσμάτων DNA σε συνθήκες που διασφαλίζουν τη μέγιστη καταλυτική δραστηριότητα της ενδονουκλεάσης περιορισμού που χρησιμοποιείται. Ανάλογα με τα επιθυμητά αποτελέσματα είναι δυνατό σε μια αντίδραση πέψης να χρησιμοποιηθούν ένα ή και περισσότερα ένζυμα περιορισμού, είτε ταυτόχρονα είτε διαδοχικά.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται διαδοχικά η επιθυμητή ποσότητα DNA, 1X buffer του ενζύμου, η ποσότητα ddH₂O για τη συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης και τελικά η απαιτούμενη ποσότητα του ενζύμου που δεν πρέπει να ξεπερνά το 10% του συνολικού όγκου της αντίδρασης.

⊗ Η συγκέντρωση του ενζύμου εκφράζεται σε units/μl. Οι μονάδες ενεργότητας (units) του ενζύμου καθορίζουν την ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται σε αντίδραση συνολικού όγκου 20μl για την υδρόλυση 1μg λDNA σε μια 1 h στη θερμοκρασία μέγιστης δραστηριότητας.

2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του μείγματος και επώαση στη θερμοκρασία βέλτιστης δραστηριότητας του ενζύμου.
3. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη διαλύματος EDTA.

⊗ Η παρουσία του χηλικού παράγοντα EDTA απενεργοποιεί το ένζυμο, εφόσον δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα Ca⁺² ή/και Mg⁺² του ρυθμιστικού του διαλύματος που δρουν ως ενεργοποιητές του.

4. Η πλήρης απενεργοποίηση του ενζύμου επιτυγχάνεται είτε θερμικά με επώαση στη θερμοκρασία απενεργοποίησης του κάθε ενζύμου για καθορισμένο χρόνο (όπως αυτά ορίζονται από τον κατασκευαστή), είτε (για θερμοάντοχα ένζυμα) με αποδιάταξη με φαινόλη.

2.3.4.2 Μερική κατάτμηση

Η μερική κατάτμηση δίνει τη δυνατότητα παραγωγής όλων των πιθανών αλληλεπικαλυπτόμενων ενδιάμεσων θραυσμάτων ενός τμήματος DNA. Βασίζεται στη μειωμένη

καταλυτική δράση ενός ενζύμου περιορισμού, που επάγεται σε συνθήκες χαμηλότερης από την απαιτούμενη συγκέντρωσης του ενζύμου και μικρότερης χρονικής διάρκειας της αντίδρασης.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου erppendorf προστίθενται διαδοχικά η επιθυμητή ποσότητα DNA, 1X buffer του ενζύμου, η ποσότητα ddH₂O για την συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης (80 μl) και 0.5 units ενζύμου.
2. Ακολουθεί ήπια ανάδευση του μείγματος και επώαση στη θερμοκρασία βέλτιστης δραστηριότητας του ενζύμου.
3. Σε χρονικά διαστήματα των 5, 10, 20 και 30 min συλλέγονται κλάσματα των 20 μl αντίστοιχα και προσθέτονται σε σωληνάκια τύπου erppendorf που περιέχουν 0.5 μl EDTA (0.5 M) για τον τερματισμό της αντίδρασης.
4. Ακολουθώς τα κλάσματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αгарόζης 1% για τον έλεγχο της απόδοσης της αντίδρασης.

2.3.4.3 Πρωτόκολλο συνδυασμού πλήρους & μερικής κατάτμησης για χαρτογράφηση

Το συγκεκριμένο πρωτόκολλο χρησιμοποιείται για τη χαρτογράφηση των ενθεμάτων σε πλασμιδιακούς ή φαγικούς φορείς. Όπως προαναφέρθηκε από τη συλλογή κλασμάτων ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα πριν την ολοκλήρωση της αντίδρασης, προκύπτει τελικά μια σειρά ενδιάμεσων θραυσμάτων, ορισμένα εκ των οποίων φέρουν τα ίδια άκρα. Το γεγονός αυτό δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησής τους σε πειράματα χαρτογράφησης μέσω ανάλυσης κατά Southern των θραυσμάτων με χρήση ειδικών προς τα άκρα ανιχνευτών. Αρχικά πραγματοποιείται πλήρης κατάτμηση με ένα ένζυμο περιορισμού του οποίου οι θέσεις αναγνώρισης εντοπίζονται εκατέρωθεν του ενθέματος, ώστε να εξασφαλιστεί η εξαγωγή του από το φορέα. Ακολουθεί μερική κατάτμηση σε διάφορους χρόνους, χρησιμοποιώντας ένα ένζυμο περιορισμού που περιέχει πολλαπλές θέσεις αναγνώρισης στην αλληλουχία του ενθέματος. Το πρωτόκολλο που παρουσιάζεται, περιγράφεται από

τους Mathioroulos et al. 1995 για τη χαρτογράφηση με 2 ένζυμα περιορισμού.

Μεθοδολογία

1. Αρχικά πραγματοποιείται πλήρης κατάτμηση της επιθυμητής ποσότητας DNA με την επιθυμητή ενδονουκλεάση περιορισμού για την εξαγωγή του ενθέματος.
 - ⊗ Στην περίπτωση του φαγικού DNA συνήθως θεωρείται επαρκής ποσότητα ίση με ~4 μg σε αντίδραση τελικού όγκου 100 μl, αν πρόκειται να δημιουργηθούν 2 μεμβράνες κατά την ανάλυση κατά Southern.
2. Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 55 μl ddH₂O.
3. Η παραπάνω ποσότητα μοιράζεται σε ξεχωριστά σωληνάκια τύπου erppendorf ώστε να προκύψουν τρία δείγματα των 5 μl και δύο δείγματα των 20 μl.
 - ⊗ Ένα από τα τρία δείγματα των 5 μl (Δείγμα A₁) διατηρείται χωρίς επιπλέον κατεργασία ως θετικό δείγμα ελέγχου της εξαγωγής του ενθέματος.
4. Στα υπόλοιπα δύο δείγματα των 5 μl (Δείγματα B₁ και Γ₁) πραγματοποιείται πλήρης κατάτμηση με προσθήκη μειωμένης ποσότητας ενζύμου (1 unit).
 - ⊗ Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιείται διαφορετική ενδονουκλεάση περιορισμού. Η επισημείωση των δειγμάτων δηλώνει το ένζυμο περιορισμού έστω Β ή Γ).
5. Σε κάθε δείγμα των 20 μl (Δείγματα B₂ και Γ₂) προστίθενται 0.5 units ενζύμου, 1X buffer του ενζύμου και η ποσότητα ddH₂O για την συμπλήρωση του τελικού όγκου της αντίδρασης (30 μl).
 - ⊗ Σε κάθε δείγμα χρησιμοποιείται διαφορετική ενδονουκλεάση περιορισμού σε συμφωνία με την επιλογή του σταδίου 4.
6. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση των δειγμάτων στη θερμοκρασία βέλτιστης δραστηριότητας του ενζύμου.
7. Για κάθε δείγμα, σε χρονικά διαστήματα των 5, 10, 20 και 30 min συλλέγονται κλάσματα των 16, 8, 4, 2 μl αντίστοιχα και προσθέτονται σε σωληνάκια τύπου erppendorf που περιέχουν 0.5 μl EDTA (0.5 M) για τον τερματισμό της αντίδρασης.

8. Ακολούθως για κάθε δείγμα, τα κλάσματα που συλλέχθηκαν κατά τη μερική κατάτμησή του αναμειγνύονται, ώστε να προκύψουν τελικά τα μίγματα B₃ και Γ₃ για κάθε δείγμα αντίστοιχα.
9. Τελικά ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1% όλα τα δείγματα (A₁, B₁, B₃, Γ₁, Γ₃).

2.3.5 Δημιουργία διαδοχικών ελλείψεων με χρήση εξωνουκλεάσης

Σε πολλές περιπτώσεις το μεγάλο μέγεθος των κλωνοποιημένων τμημάτων DNA δεν επιτρέπει τον εύκολο και αποδοτικό χειρισμό τους, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για την πλήρη αλληλούχησή τους, δεδομένου του περιορισμού ανάγνωσης ανά αντίδραση αλληλούχησης (~800 bp). Στην περίπτωση αυτή είναι αναγκαία η δημιουργία πλασμιδιακών κλώνων με μικρότερου μεγέθους ένθεμα. Ο πλέον διαδεδομένος τρόπος είναι με χρήση ενζύμων περιορισμού. Ωστόσο η απουσία θέσεων αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού ή η δημιουργία τμημάτων μη ικανού μεγέθους, επιβάλλει εναλλακτικές προσεγγίσεις. Η δημιουργία διαδοχικών ελλείψεων στην αλληλουχία του ενθέματος ανασυνδυασμένων πλασμιδίων με χρήση εξωνουκλεάσης, δίνει τη δυνατότητα κατασκευής υποκλώνων της αρχικής αλληλουχίας.

Η δημιουργία πλασμιδιακών υποκλώνων που περιέχουν σταδιακές ελλείψεις μονής κατεύθυνσης (unidirectional deletions) του κλωνοποιημένου ενθέματος βασίζεται στο πρωτόκολλο του Henikoff (1984) με χρήση του ενζύμου εξωνουκλεάση III (Exonuclease III, ExoIII). Το συγκεκριμένο ένζυμο, με εξωνουκλεϊκή 3' → 5' δράση, καταλύει την σταδιακή απομάκρυνση νουκλεοτιδίων από 5' προεξέχοντα ή τυφλά άκρα, ενώ παραμένει ανενεργή παρουσία 3' προεξέχοντος άκρου, μήκους τουλάχιστον 4 βάσεων. Ο σταθερός ρυθμός κατάτμησης επιτρέπει τη δημιουργία ελλείψεων καθορισμένου μεγέθους, συλλέγοντας κλάσματα ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Ο ρυθμός αυτός μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τη θερμοκρασία επώασης. Οι εκτεθειμένες μονόκλωνες αλυσίδες που δημιουργούνται από τη δράση της

εξωνουκλεάσης, αποικοδομούνται με επώαση σε νουκλεάση S1, απελευθερώνοντας 5' φωσφόρυλο μόνο- ή ολιγο- νουκλεοτίδια. Ακολούθως τα κενά συμπληρώνονται με χρήση της Klenow DNA πολυμεράσης και τελικά τα μόρια με τα τυφλά άκρα που προκύπτουν επανασυνδέονται με T4 DNA λιγάση.

Μεθοδολογία

1. Τμήμα DNA (~10 μg) υφίσταται κατάτμηση με δύο ένζυμα περιορισμού που αναγνωρίζουν μοναδικές θέσεις μεταξύ του ενθέματος και της περιοχής υβριδισμού του εκκινητή αλληλούχησης του φορέα.

⊗ Η επιλογή των ενζύμων προϋποθέτει ότι το ένζυμο που η θέση αναγνώρισής του εντοπίζεται πλησιέστερα του ενθέματος δημιουργεί 5' προεξέχοντα ή τυφλά άκρα για τη δράση της εξωνουκλεάσης, ενώ το πιο απομακρυσμένο εξασφαλίζει τη δημιουργία 3' προεξέχοντος άκρου, για την προστασία της περιοχής υβριδισμού του εκκινητή αλληλούχησης.

2. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο, κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 50 μl ddH₂O.
3. Σε σωληνάκια τύπου erpendorf προστίθενται 45 μl του επαναδιαλυμένου DNA, 1X ExoIII ρυθμιστικού διαλύματος και το απαιτούμενο ddH₂O για τη συμπλήρωση του όγκου της αντίδρασης (50 μl).
4. Το μείγμα προθερμαίνεται στους 30°C και προστίθενται 300 u ενζύμου ExoIII. Αμέσως μετά την προσθήκη του ενζύμου συλλέγεται και το πρώτο δείγμα ελέγχου της διαδικασίας.
5. Ανά χρονικά διαστήματα των 2 min συλλέγονται κλάσματα όγκου/των 2.5 μl, προσθέτονται σε σωληνάκια τύπου erpendorf που περιέχουν 7.5 μl του διαλύματος αντίδρασης της νουκλεάσης S1 και διατηρούνται στον πάγο.

⊗ Ο ρυθμός κατάτμησης σε θερμοκρασία 30°C είναι 210 bp/min. Το μέγεθος των ελλείψεων που προκύπτουν σε κάθε δείγμα αναμένεται να είναι 420 bp.

6. Μετά την ολοκλήρωση της συλλογής, τα 20 συνολικά δείγματα επώάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
7. Προστίθεται 1 μl ρυθμιστικού διαλύματος τερματισμού της δράσης της νουκλεάσης S1 (S1

stop buffer) ανά δείγμα και το ένζυμο απενεργοποιείται με θέρμανση στους 70°C για 10 min.

8. Πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% ορισμένου όγκου των συλλεγμένων δειγμάτων (2-3 μl, 40-60 ng DNA), για να προσδιοριστεί το εύρος των ελλείψεων που έχουν δημιουργηθεί.
9. Δείγματα του επιθυμητού μεγέθους αναμειγνύονται ανά 4 και ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη και επαναδιάλυση σε 9 μl TE buffer.
10. Προστίθεται 1 μl μείγματος Kleow (Kleow mix) και ακολουθεί επώαση για 3min σε θερμοκρασία 37°C.
11. Προστίθεται 1μl μείγματος dNTPs (0.5 mM) και τα δείγματα επωάζονται για 5 min σε θερμοκρασία 37°C.
12. Η Kleow πολυμεράση απενεργοποιείται θερμικά στους 65°C για 15 min.
13. Τέλος παραγματοποιείται η αντίδραση σύνδεσης (50 μl) για την επανακυκλοποίηση των ανασυνδυσμένων πλασμιδίων με την προσθήκη 5u T4 DNA λιγάσης, 1X buffer λιγάσης, 50% PEG4000 και τα δείγματα επωάζονται για 1 h σε θερμοκρασία 22°C.
14. Τα επανακυκλοποιημένα πλασμίδια μπορούν περαιτέρω να χρησιμοποιηθούν σε αντιδράσεις κλωνοποίησης.

2.3.6 Σχηματισμός δίκλωνων προσαρμογέων DNA

Οι προσαρμογείς είναι δίκλινα ολιγονουκλεοτίδια DNA που χρησιμοποιούνται για την αντικατάσταση των άκρων (ήδη γνωστών) ενός δεδομένου τμήματος DNA και κατ' επέκταση το σχηματισμό επιθυμητών προεξέχοντων ή τυφλών άκρων. Κατά το σχεδιασμό τους δύναται να φέρουν εντός της αλληλουχίας τους θέσεις αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού είτε στη μία είτε στις δύο αλυσίδες τους. Η σύνδεση προσαρμογέων βρίσκει εφαρμογές σε πειράματα κλωνοποίησης, αλλά και σε αντιδράσεις PCR, σχεδιάζοντας εκκινητές προς την αλληλουχία των

ολιγονουκλεοτιδίων των προσαρμογέων. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αφορά μη φωσφορυλιωμένους προσαρμογείς (Lou et al. 2008). Η απώλεια των 5' φωσφορικών, εξασφαλίζει ότι η μία μόνο αλυσίδα των δίκλωνων προσαρμογέων θα συνδεθεί με τα συμπληρωματικά άκρα των τμημάτων – στόχων DNA και θα αποκαταστήσει την επιθυμητή θέση αναγνώρισης, αποφεύγοντας έτσι τον σχηματισμό κονκαταμερών μεταξύ πολλαπλών μορίων προσαρμογέων.

Μεθοδολογία

1. Αναμειγνύεται ισομοριακή ποσότητα κάθε ολιγονουκλεοτιδίου.
2. Το μίγμα θερμαίνεται για 5 min σε θερμοκρασία 95°C.
3. Ακολούθως αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου (~ 3 h) ώστε να επαναδιαταχθούν οι δίκλωνοι προσαρμογείς.
4. Μετά την επαναδιάταξη διατηρούνται σε θερμοκρασία -20°C.

2.3.7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης επιτρέπει την ταυτοποίηση, το διαχωρισμό και την απομόνωση νουκλεϊκών οξέων ανάλογα με το μοριακό τους βάρος, παρέχοντας τη δυνατότητα άμεσου ποσοτικού (§ 2.3.3.2) και ποιοτικού προσδιορισμού (Sambrook et al. 1989). Η τεχνική βασίζεται στην κινητικότητα που εμφανίζουν τα μόρια DNA υπό την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου. Τα μόρια των νουκλεϊκών οξέων είναι αρνητικά φορτισμένα λόγω του ιονισμού των φωσφορικών τους ομάδων, με αποτέλεσμα τη μετακίνησή τους προς την κάθοδο με ρυθμό αντιστρόφως ανάλογο του δεκαδικού λογαρίθμου (\log_{10}) του μοριακού τους βάρους. Το εύρος διαχωρισμού εξαρτάται από την περιεκτικότητα του πηκτώματος σε αγαρόζη. Στο εσωτερικό του πηκτώματος η αγαρόζη (ως γραμμικός πολυσακχαρίτης) σχηματίζει ένα πορώδες πλέγμα διαμέσου του οποίου μετακινούνται τα μόρια και η πυκνότητά του είναι ανάλογη της συγκέντρωσής της αγαρόζης. Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την ηλεκτροφορητική

κινητικότητα μορίων DNA είναι η στερεοδιαμόρφωσή τους, η εφαρμοζόμενη διαφορά δυναμικού, καθώς και η σύσταση και η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος της ηλεκτροφόρησης. Ο εντοπισμός των νουκλεϊκών οξέων πραγματοποιείται με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου (ethidium bromide, EtBr), μιας ειδικής χρωστικής που δημιουργεί σύμπλοκα παρεμβολής με τα μόρια νουκλεϊκών οξέων και εκπέμπει φθορισμό όταν διεγερθεί από υπεριώδη ακτινοβολία. Τελικά ο προσδιορισμός του προς ανάλυση δείγματος επιτυγχάνεται μετά από σύγκριση με κατάλληλο μάρτυρα γνωστών μοριακών μεγεθών DNA, ο οποίος ηλεκτροφορείται ταυτόχρονα (Sambrook et al. 1989).

Μεθοδολογία

1. Η επιθυμητή ποσότητα αγαρόζης αναμειγνύεται με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης TBE (0.5X ή 1X) και θερμαίνεται υπό ανάδευση έως ότου τηχθεί η αγαρόζη και γίνει το διάλυμα τελείως διαυγές.
2. Προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1 µg / ml και το διάλυμα της τηγμένης αγαρόζης αφήνεται να ψυχθεί έως ότου η θερμοκρασία του φτάσει τους ~50°C.
3. Ακολούθως το διάλυμα μεταφέρεται σε στεγανοποιημένη μήτρα πολυμερισμού ηλεκτροφορητικής συσκευής, στην οποία προσαρμόζονται με κάθετη διευθέτηση "χτενάκια" ώστε να προκύψουν οι ειδικές θέσεις φόρτωσης των δειγμάτων.
4. Αφού το διάλυμα στερεοποιηθεί, απομακρύνονται τα "χτενάκια" και το πήκτωμα τοποθετείται σε οριζόντια ηλεκτροφορητική συσκευή, που έχει πληρωθεί με ρυθμιστικό διάλυμα ηλεκτροφόρησης, ώστε να καλύπτεται πλήρως.
5. Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται σε αναλογία 1/4 διάλυμα φόρτωσης που περιέχει χρωστική και τοποθετούνται στις ειδικές θέσεις φόρτωσης.
6. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση υπό σταθερή τάση σε θερμοκρασία δωματίου.
7. Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα εκτίθεται σε UV ακτινοβολία και οι

θέσεις μετανάστευσης των μορίων DNA διακρίνονται ως φθορίζουσες ζώνες.

2.3.8 Ανάκτηση μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Για την ανάκτηση μορίων DNA που διαχωρίστηκαν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκε το Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε προτείνεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Η μέθοδος βασίζεται στη θερμική διαλυτοποίηση του πηκτώματος και περαιτέρω στην ικανότητα του DNA να συνδέεται σε σωματίδια ορυκτού πυριτίου που βρίσκονται ακινητοποιημένα στην προπακεταρισμένη στήλη. Η δέσμευση ευνοείται από το περιβάλλον υψηλής συγκέντρωσης χαοτροπικών αλάτων (ισοθειοκυανικής γουανιδίνης) που περιέχονται στο διάλυμα πρόσδεσης στη μεμβράνη (Membrane Binding Solution). Τελικά το DNA εκλύεται με προσθήκη υδατικού διαλύματος, αφού προηγηθεί η απομάκρυνση των προσμίξεων.

Μεθοδολογία

1. Αρχικά αποκόπτεται η ζώνη του πηκτώματος αγαρόζης που αντιστοιχεί στο επιθυμητό τμήμα DNA και τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου eppendorf.
2. Προσδιορίζεται το βάρος του και προστίθενται 10 µl Διαλύματος Πρόσδεσης στη Μεμβράνη (Membrane Binding Solution) για κάθε 10 mg πηκτώματος.
3. Το μείγμα επωάζεται στους 65°C για 15 min, με ταυτόχρονη ανάδευση ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρις ότου διαλυτοποιηθεί πλήρως το πήκτωμα.
4. Ακολούθως το μείγμα μεταφέρεται σε στήλη (SV Minicolumn) που προσαρμόζεται σε σωλήνα συλλογής (Collection Tube) και μετά από επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 1 min, φυγοκεντρείται σε 16,000 g για 1 min.
5. Το έκλουσμα απομακρύνεται από τον σωλήνα συλλογής και επανατοποθετείται η στήλη.
6. Ακολουθεί έκπλυση της στήλης με την προσθήκη 700 µl Διαλύματος Πλύσης Μεμβράνης

(Membrane Wash Solution) και φυγοκέντρηση σε 16,000 g για 1 min.

7. Επανάληψη του σταδίου 5.
8. Η στήλη εκπλένεται ακόμα μια φορά με την προσθήκη 500 μl Membrane Wash Solution και φυγοκέντρηση σε 14,000 g για 5 min.
9. Επανάληψη του σταδίου 5.
10. Η στήλη φυγοκεντρείται σε 14,000 g για 1 min, για να εξασφαλιστεί η πλήρης απομάκρυνση της αιθανόλης.
11. Η στήλη μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου erpendorf και προστίθεται υδατικό Διάλυμα Ελεύθερο Νουκλεασών (30-40 μl, Nuclease-Free water).

☞ Οι χαμηλής ισχύος ιοντικές συνθήκες και το ελαφρώς αλκαλικό pH του υδατικού διαλύματος επιτρέπουν την έκλυση του.
12. Ακολούθως η στήλη επώαζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η ενυδάτωσή της και συνεπώς η αύξηση της απόδοσης της έκλυσης.
13. Τελικά εκλούεται το επιθυμητό DNA με φυγοκέντρηση σε 16,000 g για 2 min.

2.4 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

Η βασική διαδικασία κλωνοποίησης περιλαμβάνει πέντε στάδια, που στην περίπτωση των πλασμιδιακών φορέων συνοψίζονται ως εξής: α) την επιλογή του προς κλωνοποίηση τμήματος DNA (DNA ή cDNA) και τη δημιουργία κατάλληλων άκρων για ένθεση στο φορέα που φέρει τα αντίστοιχα άκρα, β) τη σύνδεση του DNA στο φορέα, γ) το μετασχηματισμό βακτηρίων με εισαγωγή του ανασυνδυασμένου φορέα, δ) τον πολλαπλασιασμό των βακτηριακών κυττάρων και ε) την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων.

2.4.1 Προετοιμασία πλασμιδιακού φορέα για κλωνοποίηση

Τα πλασμίδια έχουν επιλεγεί στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA ως ιδανικοί φορείς κλωνοποίησης βάσει ορισμένων τυπικών

χαρακτηριστικών τους. Είναι μικρά, κυκλικά μόρια δίκλωνου DNA με πολλές, μοναδικές θέσεις περιορισμού κατά μήκος του πολυσυνδέτη (polylinker) τους, καθώς και ρυθμιστικά στοιχεία για την ανεξάρτητη αντιγραφή τους από το γονιδίωμα του βακτηρίου-ξενιστή τους. Επιπλέον φέρουν γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά, επιτρέποντας την επιλογή των βακτηρίων που περιέχουν τα πλασμίδια (Bolivard et al. 1977). Κατά την κλωνοποίηση, τα πλασμίδια χρησιμοποιούνται στη γραμμική τους μορφή. Αυτή προκύπτει μετά από κατάτμηση με τη δράση ενός ή το συνδυασμό δύο ενζύμων περιορισμού σε θέσεις αναγνώρισης του πολυσυνδέτη, για τη δημιουργία συμβατών άκρων με το προς ένθεση τμήμα DNA.

Μεθοδολογία

1. Η επιθυμητή ποσότητα πλασμιδιακού DNA – συνήθως 2-3 μg – υφίσταται πλήρη κατάτμηση με την κατάλληλη ενδονουκλεάση περιορισμού (§ 2.3.4.1) που αναγνωρίζει θέση εντός του πολυσυνδέτη.
2. Το ένζυμο απενεργοποιείται είτε θερμικά, μετά από επώαση στη θερμοκρασία που ορίζεται από τον κατασκευαστή, είτε με εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο (§ 2.3.1).
3. Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη (§ 2.3.2) και το πλασμιδιακό DNA επαναδιαλύεται σε 50 μl υδατικού διαλύματος.

☞ Αν πρόκειται το πλασμιδιακό DNA να χρησιμοποιηθεί για τη δημιουργία T-άκρων, επαναδιαλύεται σε 20 μl.
4. Ανάλογα με τη φύση των επιθυμητών άκρων ακολουθεί επεξεργασία του φορέα με αποφωσφορυλίωση ή προσθήκη T-άκρων.

2.4.1.1 Αποφωσφορυλίωση φορέα

Η διαδικασία της αποφωσφορυλίωσης είναι απαραίτητη για την αποτροπή της επανακυκλοποίησης των γραμμικών μορίων του πλασμιδιακού φορέα, μετά την κατάτμησή του με ενδονουκλεάση περιορισμού. Ο χειρισμός αυτός απαιτείται όταν χρησιμοποιείται ένα μόνο ένζυμο περιορισμού, ανεξάρτητα από τη φύση των άκρων που προκύπτουν (προεξέχοντα ή τυφλά), ή συνδυασμός δυο ενζύμων που δημιουργούν

συμπληρωματικές μονόκλωνες αλληλουχίες των άκρων. Στις αντιδράσεις αποφωσφορυλίωσης χρησιμοποιείται το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase, CIAP) που καταλύει την απομάκρυνση φωσφορικών ομάδων από τα 5' άκρα του πλασμιδίου. Με τον τρόπο αυτό αποτρέπεται η επανακυκλοποίησή του, εφόσον δεν είναι εφικτή η δημιουργία φωσφωδιεστερικών δεσμών με τα ελεύθερα 3' άκρα (Ullrich et al. 1977).

Μεθοδολογία

1. Σε επαναδιαλυμένο πλασμιδιακό DNA που έχει υποστεί κατάτμηση (§ 2.4.1) προστίθενται 1X CIAP buffer, 1 unit αλκαλικής φωσφατάσης και ο όγκος της αντίδρασης (50 µl) συμπληρώνεται με ddH₂O.

☞ Οι μονάδες ενεργότητας (units) του ενζύμου καθορίζουν την ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την υδρόλυση 1 µmol 4-nitrophenylphosphate σε θερμοκρασία 37°C σε 1 min.

- Μετά από ήπια ανάδευση το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 20 min.
- Επαναπροστίθεται 1 unit αλκαλικής φωσφατάσης και η επώαση συνεχίζεται για ακόμα 20 min.
- Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.
- Το αποφωσφορυλιωμένο γραμμικό πλασμίδιο του φορέα ανακτάται με επαναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλο όγκο ddH₂O ώστε η συγκέντρωσή του να είναι περίπου 50 ng/µl.

2.4.1.2 Προσθήκη T- άκρων

Η διαδικασία της προσθήκης T-άκρων (άκρων θυμίνης) σε γραμμικά μόρια πλασμιδιακού φορέα εφαρμόζεται για την άμεση κλωνοποίηση προϊόντων PCR. Ο φορέας μετά την κατάτμησή του με ενδονουκλεάση περιορισμού που δημιουργεί τυφλά άκρα, επωάζεται με Taq DNA πολυμεράση και περίσσεια dTTPs με αποτέλεσμα την προσθήκη βάσεων θυμίνης στα 3' άκρα του (3'-T overhangs). Τα άκρα αυτά είναι πλέον συμπληρωματικά των δεοξαδενοσινών που φέρουν τα προϊόντα ενίσχυσης της PCR στο 3' άκρο τους, λόγω της ανικανότητας επιδιορθωτικού ελέγχου (non

proofreading) της κοινής Taq πολυμεράσης (Zhou et al. 2000).

Μεθοδολογία

- Σε 20 µl επαναδιαλυμένου πλασμιδιακού DNA (§ 2.4.1) που έχει υποστεί κατάτμηση με περιοριστική ενδονουκλεάση που δημιουργεί τυφλά άκρα (συνήθως EcoRV) προστίθενται 2 mM dTTPs, 1X Taq buffer, 1.5 mM MgCl₂, 2 units Taq πολυμεράση και ο όγκος της αντίδρασης (50 µl) συμπληρώνεται με ddH₂O.
- Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 72°C για 2.5 h.
- Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.
- Το γραμμικό πλασμίδιο του φορέα με τα προεξέχοντα 3' άκρα ανακτάται με επαναδιάλυση του ιζήματος σε κατάλληλο όγκο ddH₂O ώστε η συγκέντρωσή του να είναι περίπου 50 ng/µl.

2.4.2 Αντίδραση σύνδεσης μορίων DNA

Η κατασκευή ανασυνδυασμένων μορίων DNA επιτυγχάνεται *in vitro* με χρήση του ενζύμου T4 DNA λιγάση (ligase). Η λιγάση καταλύει την ομοιοπολική σύνδεση μέσω φωσφοδιεστερικών δεσμών των 5' φωσφορικών ομάδων (5'-P) και των 3' υδροξυλομάδων (3'-OH) τμημάτων DNA με προεξέχοντα ή τυφλά άκρα (Sgararella & Ehrlich, 1978). Στην κλωνοποίηση, η αντίδραση σύνδεσης (ligation) χρησιμοποιείται για την ένθεση τμημάτων DNA (προϊόντων ενζυμικής πέψης ή PCR) σε πλασμιδιακούς φορείς με σκοπό το μετασχηματισμό βακτηριακών κυττάρων.

Κατά τη διάρκειά της τόσο τα εξωγενή τμήματα DNA όσο και τα πλασμίδια εμφανίζουν τάση επανακυκλοποίησης προς τον σχηματισμό τυχαίων ολιγομερών. Για το λόγο αυτό ο μοριακός τους λόγος που εκφράζεται ως η αναλογία των μορίων μεταξύ της αλληλουχίας που πρόκειται να κλωνοποιηθεί και του πλασμιδιακού φορέα πρέπει κυμαίνεται από 1:1 έως 3:1. Η αποτελεσματικότητα ωστόσο μιας αντίδρασης σύνδεσης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση ιόντων, η φύση των άκρων του DNA

(προεξέχοντα ή τυφλά) και κυρίως η συγκέντρωση και το μέγεθος των προς σύνδεση μορίων. Βάση αυτών των παραμέτρων ο υπολογισμός της ποσότητας του ενθέματος γίνεται σύμφωνα με τον τύπο: $\text{ng DNA} = \frac{\text{ng πλασμιδίου} \times \text{μέγεθος DNA} \times \text{μοριακός λόγος}}{\text{μέγεθος πλασμιδίου}}$.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται διαδοχικά η απαιτούμενη ποσότητα ενθέματος, 50 ng κατάλληλου πλασμιδιακού φορέα, 1x ligase buffer, 1 unit λιγάσης και ο όγκος της αντίδρασης (συνήθως 10 μl) συμπληρώνεται με ddH₂O.

☞ Σε αντίδραση σύνδεσης τυφλών άκρων ο όγκος της αντίδρασης διπλασιάζεται και απαιτούνται 5 units λιγάσης καθώς και προσθήκη πολυεθυλενικής γλυκόλης PEG 4000 σε συγκέντρωση 5% w/v για να αυξηθεί η απόδοση της αντίδρασης.

2. Το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 22°C για 2.5 h μετά από ήπια ανάδευση.
3. Ακολουθεί θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου στους 65°C για 15 min.
4. Το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

2.4.3 Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση

Η μέθοδος της ηλεκτροδιάτρησης (electroporation) χρησιμοποιήθηκε πρώτη φορά για την εισαγωγή DNA σε ευκαρυωτικά κύτταρα (Neuman et al. 1982). Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στην εφαρμογή ρεύματος υψηλής τάσης σε κατάλληλα επεξεργασμένα κύτταρα ώστε να καταστούν διαπερατά σε πλασμίδια, με αποτέλεσμα την εισαγωγή των πλασμιδίων στο εσωτερικό των κυττάρων. Ωστόσο, παρατεταμένη έκθεση σε ηλεκτρικό πεδίο είναι δυνατό να οδηγήσει σε απόπτωση των κυττάρων.

2.4.3.1 Παρασκευή δεκτικών κυττάρων για ηλεκτροδιάτρηση

Η διαδικασία περιλαμβάνει την ανάπτυξη κυττάρων έως το μέσο της εκθετικής φάσης και διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα χαμηλής ιονικής

ισχύος. Η κατεργασία αυτή εξασφαλίζει τη χαμηλή ιονική ισχύ του εναιωρήματος. Τα κύτταρα αναδιαλύονται σε διάλυμα γλυκερόλης 10% σε συγκέντρωση 3×10^{10} κύτταρα/ml και διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C. Η απόδοση κυμαίνεται από 10^9 έως 10^{10} αποικίες/μg DNA και εξαρτάται από παράγοντες όπως η ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το μήκος του ηλεκτρικού παλμού και η συγκέντρωση του DNA (Dower et al. 1988).

Μεθοδολογία

1. Σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5 ml) ενοφθαλμίζονται βακτηριακά κύτταρα *E. coli* στελέχους DH5α και επωάζονται υπό ανάδευση (220 rpm) σε θερμοκρασία 37°C για 12-16h.
2. Η βακτηριακή καλλιέργεια μεταφέρεται σε κωνική φιάλη όγκου 250 ml, η οποία περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο LB (100 ml), και επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C υπό ανάδευση (220 rpm) έως ότου η τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD₆₀₀) του εναιωρήματος των κυττάρων να κυμαίνεται μεταξύ 0.4 και 0.6.
3. Στη συνέχεια η καλλιέργεια μεταφέρεται σε αποστειρωμένους σωλήνες τύπου falcon όγκου 50 ml και διατηρείται σε πάγο για 10 min.
☞ Η διατήρηση της καλλιέργειας στον πάγο εξασφαλίζει την αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων.
4. Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση σε 4,000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
5. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται ήπια σε προψυγμένο αποστειρωμένο ddH₂O (50 ml/falcon).
6. Το εναιώρημα φυγοκεντρείται σε 4,000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
7. Ακολουθεί επανάληψη των σταδίων 5 και 6.
8. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, τα κύτταρα επαναδιαλύονται ήπια σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (4 ml/falcon) και φυγοκεντρούνται σε 4,000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
9. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και τα κύτταρα επαναδιαλύονται ήπια σε προψυγμένο διάλυμα γλυκερόλης 10% (250 μl/falcon).
10. Το κυτταρικό εναιώρημα μοιράζεται σε κλάσματα των 40 μl σε προψυγμένα σωληνάκια τύπου erpendorf.

11. Τα κλάσματα διατηρούνται σε θερμοκρασία -80°C.

2.4.3.2 Μετασηματισμός με ηλεκτροδιάτρηση

Η εισαγωγή πλασμιδίων σε βακτηριακά κύτταρα προκαλείται με αύξηση της διαπερατότητας της μεμβράνης κάτω από την επίδραση εξαιρετικά χαμηλής διάρκειας ηλεκτρικών παλμών, οι οποίοι διεγείρουν το σχηματισμό παροδικών οπών στην επιφάνειά της (Neuman et al. 1982). Στο μεσοδιάστημα αυτό επιτυγχάνεται ο μετασηματισμός του βακτηριακού κυττάρου. Η διαδικασία απαιτεί τη χρήση συσκευής παροχής ρεύματος, καθώς και ειδικής κυψελίδας η οποία τοποθετείται στη θέση υποδοχής ώστε να βρίσκεται σε επαφή με δύο ηλεκτρόδια συνδεδεμένα με το τροφοδοτικό. Τα μετασηματισμένα κύτταρα επωάζονται υπό ανάδευση σε θρεπτικό μέσο επιλογής σε χαμηλές στροφές ώστε να ανακάμψουν και να εκφράσουν το γονίδιο της ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό επιλογής.

Μεθοδολογία

1. Κλάσμα (40 μl) δεκτικών κυττάρων *E. coli* κατεργασμένων για ηλεκτροδιάτρηση και διατηρημένων στους -80°C, τήκεται σε πάγο.

2. Ακολούθως αναμειγνύεται με το ανασυνδυασμένο DNA, η ποσότητα του οποίου κυμαίνεται από 10 pg έως 25 ng όγκου 1-2 μl και επωάζεται σε πάγο για 1 min.

☞ Για τη διατήρηση συνθηκών χαμηλής ιονικής ισχύος αλλά και του μικρότερου δυνατού όγκου DNA που πρόκειται να εισαχθεί, η αντίδρασης σύνδεσης είτε αραιώνεται 10% της, είτε εκχυλίζεται σε φαινόλη/χλωροφόρμιο και επαναδιαλύεται στην επιθυμητή συγκέντρωση μετά από κατακρήμνιση με αιθανόλη.

3. Το μείγμα μεταφέρεται σε ειδική προψυγμένη κυψελίδα διαμέτρου 0.2 cm και τοποθετείται στη θέση υποδοχής της συσκευής.

4. Στη συνέχεια εφαρμόζεται ηλεκτρικός παλμός εντάσεως 13.8 kV/ cm και διάρκειας 5-6 msec.

☞ Παρουσία ιόντων αυξάνεται η αγωγιμότητα του διαλύματος της κυψελίδας, με αποτέλεσμα την διάχυση του ρεύματος (*arc*) και την αναποτελεσματικότητα του μετασηματισμού.

5. Αμέσως μετά προστίθεται 1 ml διαλύματος υγρού θρεπτικού διαλύματος SOC, το μείγμα μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα και επωάζεται υπό ήπια ανάδευση (180 rpm) σε θερμοκρασία 37°C για 1 h.

☞ Η προσθήκη του θρεπτικού μέσου SOC που διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου δημιουργεί επιπλέον συνθήκες θερμικού σοκ, αυξάνοντας την απόδοση του μετασηματισμού.

6. Η επιθυμητή ποσότητα κυττάρων επιστρώνεται σε τρυβλίο petri (90mm) που περιέχει στερεό θρεπτικό μέσο LB άγαρ παρουσία 100 μg/ml αμπικιλίνης, προσθέτοντας 30 μl X-gal και 3 μl IPTG (αρχικής συγκέντρωσης 20 mg/ml και 200 mg/ml αντίστοιχα).

7. Το τρυβλίο επωάζεται ανεστραμμένο σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας για 12-16 h.

2.4.4 Ταυτοποίηση ανασυνδυασμένων κλώνων

Η επιλογή των βακτηριακών κυττάρων που έχουν μετασηματιστεί σε πρώτη φάση πραγματοποιείται σε εκλεκτικό θρεπτικό μέσο. Βασίζεται στην ικανότητα ανάπτυξης των κυττάρων σε επιλεκτικές συνθήκες, εφόσον τα πλασμίδια που έχουν εισαχθεί (ανασυνδυασμένα ή μη) εκφράζουν το αντίστοιχο γονίδιο ανθεκτικότητας στο αντιβιοτικό που χρησιμοποιείται ως επιλεκτικός δείκτης. Εφόσον εξασφαλιστεί η ανάπτυξη μόνο των μετασηματισμένων βακτηρίων, η επιλογή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων βασίζεται στον έλεγχο της α-συμπληρωματικότητας και πραγματοποιείται με οπτική παρατήρηση του χρώματος των βακτηριακών αποικιών.

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιούνται ως φορείς κλωνοποίησης φέρουν τις ρυθμιστικές αλληλουχίες και το ανοιχτό αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί το αμινοτελικό τμήμα (*α-fragment*) του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*) του βακτηρίου *E. coli*. Παράλληλα, στο αναγνωστικό τους πλαίσιο εμφανίζεται ενσωματωμένη, χωρίς να το διακόπτει, η αλληλουχία του πολυσυνδέτη. Το τμήμα αυτό δεν είναι ικανό να εκφράσει την ενζυμικά ενεργή μορφή της πρωτεΐνης, εκτός αν συνδυαστεί λόγω

μετασηματισμού με το επίσης ανενεργό καρβοξυτελικό τμήμα (ω -fragment) του γονιδίου που εκφράζεται από τα δεκτικά βακτήρια-ξενιστές,, καθώς τα συγκεκριμένα βακτηριακά στελέχη είναι μεταλλαγμένα ώστε να κωδικοποιούν μόνο το ω -τμήμα της πρωτεΐνης. Η διαδικασία αυτή συνιστά την α -συμπληρωματικότητα η οποία καταστέλλεται στην περίπτωση των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων, εφόσον το κλωνοποιημένο ένθεμα διακόπτει το ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης του αμινοτελικού τμήματος (Horwitz et al. 1964, Ulman et al. 1967).

Η διάκριση των αποικιών στηρίζεται σε μια ιστοχημική αντίδραση (Miller 1972) παρουσία του αναλόγου της λακτόζης IPTG, που απενεργοποιεί τον lacZ καταστολέα και επάγει την μεταγραφή του οπερονίου της λακτόζης. Κατά την αντίδραση αυτή το χρωμογόνο υπόστρωμα X-gal υδρολύεται από την β -γαλακτοσιδάση, δίνοντας ένα χαρακτηριστικό μπλε χρώμα στις μη ανασυνδυασμένες αποικίες. Αντίθετα, οι αποικίες των ανασυνδυασμένων κλώνων εμφανίζουν λευκό χρώμα, εφόσον δεν εκφράζεται λειτουργική πρωτεΐνη και το X-gal δεν μεταβολίζεται. Ωστόσο, για την πλήρη ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων απαιτείται επιβεβαίωση του ενθέματος με χρήση περιοριστικών ενδονουκλεασών ή PCR στο απομονωμένο πλασμιδιακό DNA και προσδιορισμός της πρωτοδιάταξής του.

2.5 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ -DASH®II – ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη αποτελεί μια συλλογή τυχαίων τμημάτων DNA που αντιπροσωπεύουν το σύνολο του γονιδιώματος ενός οργανισμού και έχουν κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους φορείς. Λόγω της ευκολίας κατασκευής και χειρισμού τους, οι βιβλιοθήκες συνιστούν χρήσιμα εργαλεία σε μελέτες επιλογής συγκεκριμένων τμημάτων DNA (συμπεριλαμβανομένων ολόκληρων γονιδίων και των γειτονικών τους περιοχών, μικρών γονιδιακών

συστοιχιών καθώς και επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών) καθώς και σε μελέτες χαρτογράφησης (genome walking). Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη του δάκου που χρησιμοποιήθηκε έχει κατασκευαστεί από τους Lagos et al. 2005 χρησιμοποιώντας ως φορέα κλωνοποίησης τον βακτηριοφάγο λ -DASH®II (Stratagene).

2.5.1 Βακτηριοφάγος λ -DASH®II (Stratagene)

Ο βακτηριοφάγος λ -DASH®II αποτελεί μια τροποποιημένη μορφή των λ φάγων που προσβάλλουν τα βακτήρια *E. coli* και χρησιμοποιούνται ευρέως ως φορείς κλωνοποίησης τμημάτων DNA 8-24 kb (Thomas et al. 1974). Το γονιδίωμα των λ φάγων συσκευάζεται ως γραμμικό δίκλωνο μόριο DNA, μεγέθους ~50 kb στην κεφαλή. Κατά την επιμόλυνση των κυττάρων ξενιστών το DNA διοχετεύεται στο κυτταρόπλασμα μέσω της ουράς και μετατρέπεται σε κυκλικό λόγω των συμπληρωματικών του άκρων (cohesive termini, cos). Τα γονίδια που κωδικοποιούν τη σύνθεση των πρωτεϊνών που απαιτούνται κατά τη διάρκεια του λυτικού κύκλου ανάπτυξης για την αντιγραφή του φαγικού γενετικού υλικού, τη συγκρότηση των φαγικών σωματίων και τελικά τη λύση των κυττάρων αποτελούν το 60% περίπου του γονιδιώματος. Επιπλέον, το γεγονός ότι εδράζονται στις δυο ακραίες περιοχές (right and left arms) επιτρέπει την απομάκρυνση του κεντρικού τμήματος (stuffer) που εδράζονται τα γονίδια του λυσιγονικού κύκλου ή άλλων γονιδίων που δεν απαιτούνται κατά τον λυτικό κύκλο, ώστε να είναι δυνατή η χρήση τους ως φορείς κλωνοποίησης. Οι φορείς διακρίνονται σε παρεμβολής και αντικατάστασης αντίστοιχα. Στην πρώτη περίπτωση ανήκουν οι φορείς από τους οποίους έχουν αφαιρεθεί γονίδια μη απαραίτητα για τον λυτικό κύκλο και υπάρχει μια μόνο θέση αναγνώρισης ενζύμου περιορισμού για την εισαγωγή DNA. Στη δεύτερη περίπτωση, των φορέων αντικατάστασης, το τμήμα stuffer φέρει θέσεις περιορισμού εκατέρωθεν του ώστε να αντικαθίσταται τελικά μετά την κλωνοποίηση του εξωγενούς DNA.

Στην τελευταία κατηγορία εντάσσεται ο βακτηριοφάγος λ-DASH®II (Stratagene) με ικανότητα κλωνοποίησης τμημάτων μεγέθους ~12-15 kb. Οι φορείς λ-DASH®II χρησιμοποιούν ως ξενιστές τα κύτταρα XL1-Blue MRA' (P2) και η εκλεκτική ανάπτυξη μόνο ανασυνδυασμένων φάγων βασίζεται στο σύστημα επιλογής *spi* (sensitive to P2 inhibition). Κατά την επιλογή *spi*, οι λυσιγόνοι φάγοι P2 που περιέχονται στα κύτταρα XL1-Blue MRA' αναστέλλουν την ανάπτυξη των λ-φάγων που εκφράζουν τα γονίδια *red* και *gam* και εδράζονται στην περιοχή *stuffer*. Εφόσον οι λ φάγοι ανασυνδυαστούν επιτυχώς, η περιοχή αυτή αντικαθίσταται, με αποτέλεσμα τα παραπάνω γονίδια να μην εκφράζονται (*red/gam*) και οι ανασυνδυασμένοι φάγοι να αναπτύσσονται πλέον φυσιολογικά. Επιπλέον χαρακτηριστικά των βακτηριοφάγων λ-DASH®II είναι ότι εκατέρωθεν της θέσης ένθεσης του DNA φέρουν τις αλληλουχίες των υποκινητών των RNA-πολυμερασών T3 και T7 (§ 2.8.1.2), καθώς και δύο περιοχές πολυσυνδεδετών που επιτρέπουν την εκτομή του ενθέματος με κατάλληλες ενδονουκλεάσες περιορισμού.

2.5.2 Επιμόλυνση βακτηριοφάγου λ σε στερεή καλλιέργεια

Η επιμόλυνση βακτηριακών κυττάρων με σωματίδια βακτηριοφάγου λ σε καλλιέργεια με στερεό θρεπτικό μέσο αποσκοπεί στην παραγωγή μεμονωμένων φαγικών πλακών από εναιώρημα βακτηριοφάγων. Η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται για την τιτλοδότηση διαλύματος βακτηριοφάγων (μεμονωμένης φαγικής πλάκας ή φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης) καθώς και σε πειράματα διαλογής βιβλιοθηκών.

2.5.2.1 Προετοιμασία βακτηρίων-ξενιστών του βακτηριοφάγου λ

Η ανάπτυξη των βακτηρίων-ξενιστών που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για την αναπαραγωγή των βακτηριοφάγων θα πρέπει να γίνει σε εμπλουτισμένο κατάλληλα θρεπτικό μέσο, ώστε να εξασφαλιστεί η αποτελεσματικότητα της μόλυνσης, απουσία αντιβιοτικού. Τέτοια στοιχεία

εμπλουτισμού είναι η μαλτόζη και τα ιόντα μαγνησίου. Παρουσία της μαλτόζης επάγεται η σύνθεση των μεμβρανικών κυτταρικών υποδοχέων μαλτοπορίνης με τους οποίους γίνεται με σύνδεση των βακτηριοφάγων στα κύτταρα κατά τη μόλυνση (Schwartz 1967). Ταυτόχρονα η σύνδεση αυτή διευκολύνεται σε περιβάλλον πλούσιο σε ιόντα μαγνησίου (Lieb 1953).

Μεθοδολογία

1. Σε υγρό θρεπτικό μέσο LB (5 ml) εμπλουτισμένο με 10 mM $MgSO_4$ και 0.2% μαλτόζη ενοφθαλμίζονται βακτηριακά κύτταρα XL1-Blue MRA' και επωάζονται υπό ανάδευση (220 rpm) σε θερμοκρασία 30°C για 12-16h.

☞ *Εναλλακτικά η επώαση μπορεί να πραγματοποιηθεί για 4-6h σε θερμοκρασία 37°C.*
2. Η καλλιέργεια φυγοκεντρείται σε 4,000 g για 10 min και τα κύτταρα που καθιζάνουν συλλέγονται με απόρριψη του υπερκειμένου.
3. Το ίζημα των κυττάρων επαναδιαλύεται ήπια στην απαιτούμενη ποσότητα διαλύματος 10 mM $MgSO_4$, ώστε η τιμή της οπτικής πυκνότητας (OD_{600}) του εναιωρήματος των κυττάρων να κυμαίνεται μεταξύ 0.4 και 0.6.
4. Τα κύτταρα διατηρούνται σε θερμοκρασία 4°C.

2.5.2.2 Επίστρωση βακτηριοφάγων λ σε στερεό υπόστρωμα (plating cells)

Οι βακτηριοφάγοι καθώς έρχονται σε επαφή με τα βακτήρια αντιγράφονται μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους μόλυνσης και τελικά λύσης των κυττάρων-ξενιστών. Αποτέλεσμα αυτής της αλυσίδας γεγονότων είναι η εμφάνιση κυκλικών διαυγών περιοχών πάνω στο βακτηριακό υπόστρωμα (bacterial lawn), που ονομάζονται βακτηριοφαγικές πλάκες (phage plaques). Η παρουσία των πλακών αυτών καθορίζει και την αποτελεσματικότητα της μόλυνσης καθώς δεν χρησιμοποιείται κάποιος άλλος δείκτης επιλογής. Ανάλογα με τον αριθμό βακτηριοφάγων πλακών που υπολογίζεται να προκύψουν, επιλέγεται αντίστοιχα το μέγεθος του τρυβλίου επίστρωσης. Σε τρυβλίο διαμέτρου 90 mm αναπτύσσονται το μέγιστο από 0.5×10^4 έως 2×10^4 πλάκες.

Ακολούθως περιγράφεται η διαδικασία για την επίστρωση σε τρυβλίο 90 mm (Stratagene).

Μεθοδολογία

1. Σε διάλυμα SM δημιουργούνται διαδοχικές αραιώσεις συγκέντρωσης μειούμενης τάξης μεγέθους (10^{-2} - 10^{-4}) των ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων από stock εναιώρημα. Για κάθε αραιώση ακολουθείται ξεχωριστά η διαδικασία που περιγράφεται παρακάτω στα βήματα 2-5.
2. Σε σωληνάκι τύπου errendorf προστίθενται 200 μl κατεργασμένων βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue MRA' (§ 2.5.2.1) και 2-4 μl της αραιώσης των φάγων και επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 20 min.
3. Το μείγμα κυττάρων-ξενιστών και φάγων μεταφέρεται σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 3 ml διαλυτοποιημένης NZY υπερκείμενης αγαρόζης.

⊗ Για να εξασφαλιστεί η διαλυτοποιημένη μορφή της NZY υπερκείμενης αγαρόζης, ο σωλήνας διατηρείται σε θερμοκρασία 47-49°C.
4. Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε τρυβλίο (διαμέτρου 90 mm) με στερεό θρεπτικό μέσο NZY-άγαρ.
5. Το τρυβλίο, μετά από ήπια οριζόντια ανάδευση για την ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος, αφήνεται ώστε να στερεοποιηθεί το υπερκείμενο διάλυμα και επωάζεται μη ανεστραμμένο σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37°C για 12 h.

⊗ Η μη αναστροφή του τρυβλίου κατά την επώαση πραγματοποιείται κυρίως για την αποφυγή αποκόλλησης της υπερκείμενης αγαρόζης, αλλά και την συγκράτηση της υγρασίας στην επιφάνεια του υποστρώματος διευκολύνοντας έτσι την εξάπλωση των βακτηριοφάγων.

2.5.2.3 Συλλογή πλάκας βακτηριοφάγου λ

Η δημιουργία μιας βακτηριοφαγικής πλάκας είναι αποτέλεσμα μόλυνσης ενός αρχικού φαγικού σωματίου. Συνεπώς τα φαγικά σωματάρια που προέκυψαν από τον πολλαπλασιασμό του και συνιστούν μια πλάκα εμφανίζουν πανομοιότυπο γενετικό προφίλ. Η συλλογή της πλάκας σε κατάλληλο διάλυμα εξασφαλίζει τη διατήρηση των φαγικών σωματίων που μπορούν να

χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για την παρασκευή εναιωρημάτων (Sambrook et al. 1989).

Μεθοδολογία

1. Η επιθυμητή μεμονωμένη βακτηριοφαγική πλάκα απομονώνεται ενιαία με το υπόλοιπο στερεό μέσο (άγαρ και υπερκείμενη αγαρόζη) με τη χρήση γυάλινης πιπέτας Pasteur.
2. Ακολούθως μεταφέρεται σε σωλήνα πολυπροπυλαινίου (τύπου Falcon) και προστίθενται 200 μl διαλύματος SM και χλωροφόρμιο 0.3 %.

⊗ Η χρήση του χλωροφόρμιου συμβάλλει στην αναστολή της ανάπτυξης μικροοργανισμών.
3. Η έκλυση των φαγικών σωματίων στο διάλυμα πραγματοποιείται εφόσον διατηρηθεί για 12 h σε θερμοκρασία 4°C.

⊗ Από κάθε βακτηριοφαγική πλάκα αναμένεται να εκκλύονται περίπου $10^6 - 10^7$ φαγικά σωματάρια.

2.5.2.4 Τιτλοδότηση φαγικού εναιωρήματος

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαγικών σωματίων που περιέχονται σε ένα εναιώρημα πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της τιτλοδότησης διαδοχικών αραιώσεων του εναιωρήματος. Ο καθορισμός του αριθμού (τίτλου) των φαγικών σωματίων του εναιωρήματος εκφράζεται ως αριθμός των μονάδων σχηματισμού πλακών (pfu, plaque forming units) ανά ml του φαγικού εναιωρήματος (Sambrook et al. 1989).

Μεθοδολογία

1. Ακολουθείται το πρωτόκολλο της επίστρωσης βακτηριοφάγων σε τρυβλίο (§ 2.5.2.2) χρησιμοποιώντας αραιώσεις του φαγικού εναιωρήματος κυμαίνονται μεταξύ των τάξεων 10^{-4} - 10^{-7} .
2. Οι φαγικές πλάκες καταμετρούνται ανά τρυβλίο, και ο τίτλος προσδιορίζεται σύμφωνα με τη σχέση:

$$\frac{\text{αριθμός πλακών (pfu)} \times \text{συντελεστής αραιώσης}}{\text{όγκος που επιστρώθηκε (μl)}} \times 10^3 \frac{\mu\text{l}}{\text{ml}}$$

⊗ Ο όγκος που επιστρώθηκε (σε μl) αναφέρεται στον όγκο του διαλύματος των βακτηριοφάγων που αναμείχθηκε με τα βακτήρια-ξενιστές.

2.5.3 Επίστρωση γονιδιωματικής βιβλιοθήκης σε στερεό υπόστρωμα.

Η γονιδιωματική βιβλιοθήκη αποτελείται από ένα σύνολο βακτηριοφάγων ανασυνδυασμένων με τυχαία διαφορετικά τμήματα του γονιδιώματος. Συνεπώς για να είναι αποτελεσματική κάθε προσπάθεια διαλογής της, πρέπει να εξασφαλίζεται η αντιπροσώπευση των κλώνων στο σύνολό τους. Ο απαιτούμενος αριθμός βακτηριοφάγων (N) που πρέπει να επιστρωθεί και περαιτέρω να σαρωθεί ώστε να απομονωθεί ένας κλώνος με πιθανότητα (P) 99%, είναι συνάρτηση του μέσου μεγέθους των ενθεμάτων (x) και του συνολικού μεγέθους ως προς διαλογή γονιδιώματος (y) και υπολογίζεται σύμφωνα με τη σχέση: $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-x/y)}$ (Clarke & Carbon 1976). Ο αριθμός που προσδιορίζεται, πολλαπλασιάζεται περαιτέρω με την τιμή που ορίζει τον βαθμό αντιπροσώπευσης ολόκληρου του γονιδιώματος. Αφού λοιπόν οριστεί ο απαιτούμενος αριθμός βακτηριοφάγων, υπολογίζεται βάσει του τίτλου της βιβλιοθήκης, η ποσότητα που πρέπει να επιστρωθεί.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται 600 μl κατεργασμένων βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue MRA' (§ 2.5.2.1) και η επιθυμητή ποσότητα των ανασυνδυασμένων φάγων και επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 20 min.
2. Το μείγμα κυττάρων-ξενιστών και φάγων μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου falcon όγκου 50 ml που περιέχει 30 ml διαλυτοποιημένης NZY υπερκείμενης αγαρόζης σε θερμοκρασία 47-49°C.
3. Ακολουθεί ανάδευση και μεταφορά σε τρυβλίο διαστάσεων 22cm x 22cm με στερεό θρεπτικό μέσο NZY-άγαρ.
4. Το τρυβλίο, μετά από ήπια οριζόντια ανάδευση για την ομοιόμορφη κατανομή του μείγματος, αφήνεται ώστε να στερεοποιηθεί το υπερκείμενο διάλυμα και επωάζεται μη ανεστραμμένο σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 37°C για 12 h.

2.5.4 Απομόνωση βακτηριοφάγου λ – εξαγωγή DNA

Η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων, συνεπάγεται και την ανάκτηση τελικά υψηλών συγκεντρώσεων DNA των κλωνοποιημένων ενθεμάτων. Η διαδικασία συνίσταται στην παρασκευή υψηλού τίτλου εναιωρήματος βακτηριοφάγων μετά από επιμόλυνση βακτηριακής καλλιέργειας, την απομόνωση των φαγικών σωματίων και τελικά την εξαγωγή του ανασυνδυασμένου φαγικού DNA.

2.5.4.1 Παρασκευή λυτικού εναιωρήματος βακτηριοφάγων λ

Η επιμόλυνση κατάλληλα επεξεργασμένων κυττάρων ξενιστών με βακτηριοφάγους λ σε υγρή καλλιέργεια μεγάλης κλίμακας οδηγεί στον πολλαπλασιασμό των βακτηριοφάγων μετά από λύση της βακτηριακής καλλιέργειας και την παρασκευή υψηλού τίτλου εναιωρήματος. Σε αντίθεση με την επίστρωση σε στερεό μέσο όπου διακρίνονται πλάκες ως αποτέλεσμα της λύσης, κατά τη χρήση υγρού θρεπτικού μέσου η λύση εκτιμάται οπτικά, με μέτρο τη διαύγεια του διαλύματος. Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης των βακτηρίων η θολότητα του διαλύματος είναι αυξημένη, καθώς όμως τα βακτηριακά κύτταρα λύνονται και απελευθερώνονται τα φαγικά σωματίδια, προοδευτικά το διάλυμα εμφανίζεται διαυγές και διακρίνονται αιωρούμενα τα κυτταρικά υπολείμματα (Leder et al. 1977).

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται 500 μl κατεργασμένων βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue MRA' (§ 2.5.2.1) και 40 μl διαλύματος φαγικών σωματίων και επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 20 min.
2. Σε κωνική φιάλη όγκου 250 ml που περιέχει υγρό θρεπτικό μέσο LB (20 ml) εμπλουτισμένο με 10 mM MgSO₄ μεταφέρονται 250 μl του μείγματος.
3. Η καλλιέργεια τοποθετείται σε επωαστήρα ανάδευσης (220 rpm) για περίπου 5-7h σε θερμοκρασία 37°C έως ότου πραγματοποιηθεί η

λύση των κυττάρων, οπότε και προστίθενται 100 μl χλωροφορμίου.

4. Ακολουθεί μεταφορά της καλλιέργειας σε σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml και φυγοκέντρηση σε 8,000 g για 10 min.
5. Τα κυτταρικά υπολείμματα καθιζάνουν και το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml.
6. Το εναιώρημα των φαγικών σωματίων διατηρείται σε θερμοκρασία 4°C για χρονικό διάστημα έως και 6 μηνών.

2.5.4.2 Απομόνωση βακτηριοφάγου λ

Το φαγικό εναιώρημα που προέκυψε από τη λύση της βακτηριακής καλλιέργειας πρέπει να κατεργαστεί περαιτέρω για να εξασφαλιστεί η καθαρότητά του με την πλήρη απομάκρυνση κάθε υλικού βακτηριακής προέλευσης. Αρχικά η επώαση με DNάση και RNάση αποσκοπεί στην αποικοδόμηση τυχόν νουκλεϊκών οξέων των κυττάρων που απελευθερώθηκαν κατά τη λύση, ενώ η προσθήκη της πολυαιθυλενογλυκόλης (PEG8000) συμβάλει στην κατακρήμνιση των φαγικών σωματίων. Τα εναπομείναντα κυτταρικά υπολείμματα και το PEG απομακρύνονται από το μετά από εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο, οπότε και λαμβάνεται καθαρό πλέον το εναιώρημα των βακτηριοφάγων (Yamamoto et al. 1970).

Μεθοδολογία

1. Το εναιώρημα των φαγικών σωματίων (§ 2.5.4.1,¶6) επωάζεται ταυτόχρονα με ποσότητα DNάσης και RNάσης τελικής συγκέντρωσης 1 μg/ml αντίστοιχα, σε θερμοκρασία 37°C για 30 min.
2. Ακολουθεί προσθήκη 1 M στερεού NaCl και επώαση στον πάγο για τουλάχιστον 1 h.
3. Το μείγμα φυγοκεντρείται σε 11,000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.
4. Σε νέο σωλήνα τύπου falcon όγκου 50 ml μεταφέρεται το υπερκείμενο, προστίθεται 10% w/v PEG8000 και επωάζεται στον πάγο για τουλάχιστον 1 h.
5. Το μείγμα φυγοκεντρείται σε 11,000 g για 10 min σε θερμοκρασία 4°C.

6. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και για την απομάκρυνση τυχόν εναπομείναςας ποσότητας διαλύματος ο σωλήνας τύπου falcon αναστρέφεται για 2 min.
7. Τα καθιζάνοντα φαγικά σωματία αναδιαλύονται σε 1 ml διάλυμα SM και αφού μεταφερθούν σε σωληνάκι τύπου erpendorf όγκου 2 ml, επωάζονται υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min.
8. Ακολουθεί προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου (1 ml) και το μείγμα ανακινείται ισχυρά και φυγοκεντρείται σε 3,000 g για 15 min.
9. Η υδατική φάση που περιέχει το καθαρό πλέον εναιώρημα των βακτηριοφάγων μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.

2.5.4.3 Εξαγωγή DNA βακτηριοφάγου λ

Η πιο εύκολη και ταυτόχρονα αποτελεσματική μέθοδος για την εξαγωγή του DNA από βακτηριοφάγο λ βασίζεται στην αποικοδόμηση των πρωτεϊνών του ιϊκού καψιδίου με χρήση κάποιας ισχυρής πρωτεάσης, όπως η πρωτεϊνάση K (proteinase K). Ακολούθως απαιτείται χειρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη για την απομάκρυνση των πρωτεϊνικών καταλοίπων και την ανάκτηση του φαγικού DNA (Sambrook et al. 1989).

Μεθοδολογία

1. Στο καθαρό εναιώρημα των βακτηριοφάγων (§ 2.6.3.2,¶9) προστίθενται 20 mM EDTA, 0.5% SDS και 50 μg / ml proteinase K και το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 56°C για 1 h.
2. Αφού επανέλθει σε θερμοκρασία δωματίου εκχυλίζεται με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρημνίζεται με αιθανόλη.
3. Το φαγικό DNA ανακτάται με επαναδιάλυση του ιζήματος σε 200 μl διάλυμα TE που περιέχει 20 μg/ml RNάση και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία 4°C.

≈ Η απόδοση της μεθόδου είναι ανάλογη του τίτλου του βακτηριοφάγου λ στο λυτικό εναιώρημα και μπορεί να κυμαίνεται από 1 έως 10 μg/ml φαγικού εναιωρήματος, όταν ένα σωματίο βακτηριοφάγου λ περιέχει περίπου 5×10^{11} μg DNA.

2.6 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ-ZAP – cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Η cDNA βιβλιοθήκη αποτελεί μια συλλογή τυχαίων τμημάτων συμπληρωματικού DNA που αντιπροσωπεύουν το σύνολο του μεταγραφόμενου DNA του γονιδιώματος ή συγκεκριμένου ιστού ενός οργανισμού και έχουν κλωνοποιηθεί σε κατάλληλους φορείς. Λόγω της έλλειψης δυνατότητας κλωνοποίησης του ολικού mRNA και της μειωμένης αποδοτικότητας προσπάθειας δημιουργίας κλώνων υβριδίων RNA:DNA, επιλέγεται η μετατροπή του mRNA σε δίκλωνο cDNA. Η cDNA βιβλιοθήκη του δάκου που χρησιμοποιήθηκε, έχει κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας ως φορέα κλωνοποίησης τον βακτηριοφάγο λ-ZAP Express®II (Stratagene) όπως περιγράφεται από τους Lagos et al. 2005.

2.6.1 Βακτηριοφάγος λ-ZAP Express®II (Stratagene)

Ο βακτηριοφάγος λ-ZAP Express®II αποτελεί μια τροποποιημένη μορφή του φάγου λ-ZAP που επιτρέπει την εξαγωγή του κλωνοποιημένου ενθέματος με τη μορφή πλασμιδίου (φαγεμιδίου). Ο βακτηριοφάγος έχει ενσωματώσει την αλληλουχία του πλασμιδίου ρBK, το οποίο φέρει πολυσυνδέτη 12 μοναδικών θέσεων αναγνώρισης ενδονουκλεασών περιορισμού, επιτρέποντας την κατευθυνόμενη κλωνοποίηση (directional cloning) και εκφράζει το γονίδιο ανθεκτικότητας σε καναμυκίνη. Η περιοχή του πολυσυνδέτη είναι ενσωματωμένη στην αλληλουχία που κωδικοποιεί το αμινοτελικό τμήμα (α-fragment) του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (*lacZ*), γεγονός που καθιστά εφικτή την ταυτοποίηση των φαγεμιδίων που προκύπτουν μετά από έλεγχο α-συμπληρωματικότητας (§ 2.4.4). Επιπλέον φέρει αλληλουχίες πρωτεϊνών που προέρχονται από νηματοειδείς φάγους (M13) και λειτουργούν ως θέσεις έναρξης και λήξης της αντιγραφής εκατέρωθεν του ενθέματος, καθώς και τις αλληλουχίες των υποκινητών των RNA-πολυμερασών T3 και T7.

2.6.2 Προετοιμασία βακτηρίων-ξενιστών του βακτηριοφάγου λ-ZAP και φαγεμιδίων ρBK-CMV

Τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* που χρησιμοποιούνται ως ξενιστές των φάγων λ-ZAP Express®II ανήκουν στο στέλεχος XL1-Blue MRF' και περιέχουν το επίσωμα F'. Η επιλογή αυτή βασίζεται κατά κύριο λόγο στο ότι το επίσωμα φέρει γονίδια που κωδικοποιούν τις πρωτεΐνες σχηματισμού των βακτηριακών νηματίων σύζευξης (*sex pili*) και οι οποίες είναι απαραίτητες για την δέσμευση του βοηθητικού φάγου κατά τη διαδικασία εκτομής του φαγεμιδίου. Για το σχηματισμό και των πολλαπλασιασμό των φαγεμιδίων ρBK-CMV χρησιμοποιούνται ως ξενιστές τα βακτηριακά κύτταρα *E. coli* του στελέχους XL0LR. Τα απαραίτητα στοιχεία εμπλουτισμού του υγρού θρεπτικού μέσου (50 ml), καθώς και η μέθοδος ανάπτυξης των κυττάρων XL1-Blue MRF' και XL0LR, περιγράφονται αναλυτικά στην Ενότητα 2.5.2.1., με τη διαφορά ότι η τιμή της οπτικής πυκνότητας κατά την επαναδιάλυσή τους πρέπει να ισούται με 1 ώστε να αντιστοιχεί σε 8×10^8 κύτταρα/ml.

2.6.3 *In vivo* μαζική εκτομή ενθεμάτων από φορέα λ-ZAP

Ο σχεδιασμός του λ-ZAP επιτρέπει την εύκολη και αποδοτική *in vivo* εκτομή του κλωνοποιημένου ενθέματος και την επανακυκλοποίησή του με τη μορφή φαγεμιδίου. Η *in vivo* μαζική εκτομή (mass excision) προϋποθέτει την ταυτόχρονη προσβολή των κυττάρων ξενιστών από το βοηθό φάγο (helper phage). Οι πρωτεΐνες του βοηθού φάγου αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες έναρξης και λήξης της αντιγραφής που εντοπίζονται εκατέρωθεν του ενθέματος. Το αντίγραφο της αλυσίδας που δημιουργείται, εμπεριέχει τις αλληλουχίες του πλασμιδίου και του ενθέματος. Το παραγόμενο μονόκλωνο τμήμα DNA με τη βοήθεια πρωτεϊνών του βοηθού φάγου, κυκλοποιείται και ακολούθως πακετάρεται με τη μορφή νηματοειτοειδούς φάγου (filamentous phage) ώστε να απελευθερωθεί από το κύτταρο.

Η επακόλουθη προσβολή των κυττάρων στελέχους XLOLR από τους νηματοειδείς φάγους, οδηγεί στο σχηματισμό των κυκλικών δίκλωνων φαγεμιδίων rBK-CMV. Η επιλογή των φαγεμιδίων πραγματοποιείται με έλεγχο ασυμπληρωματικότητας (§ 2.4.4) σε καλλιέργειες στερεού θρεπτικού μέσου χρησιμοποιώντας ως δείκτη επιλογής το αντιβιοτικό καναμυκίνη. Οι βοηθοί φάγοι δεν φέρουν γονίδια ανθεκτικότητας στην καναμυκίνη, με αποτέλεσμα να αναστέλλεται η ανάπτυξή τους στο παραπάνω εκλεκτικό μέσο. Η απομόνωση των φαγεμιδίων πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο απομόνωσης πλασμιδιακού DNA (§ 2.2.3). Η διαδικασία που ακολουθήθηκε βασίζεται στο πρωτόκολλο που προτείνεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή (Stratagene) με κάποιες τροποποιήσεις που αφορούν την αναλογία κυττάρων και φάγων.

Μεθοδολογία

1. Σε κωνική φιάλη όγκου 50 ml προστίθενται 10^8 (200 µl) κατεργασμένων βακτηριακών κυττάρων XL1-Blue MRF' (§ 2.6.2), 10^8 rfu φαγικού εναιωρήματος και 10^9 rfu βοηθού φάγου ExAssist.
 - ⊗ Η αναλογία φάγων λ-ZAP και κυττάρων ξενιστών ορίστηκε ως 1:1, ενώ βοηθού φάγου και κυττάρων ως 10:1, σύμφωνα με τις τιμές τιτλοδότησης.
2. Το μείγμα επωάζεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 15 min.
3. Στη συνέχεια προστίθενται 20 ml υγρού θρεπτικού μέσου LB εμπλουτισμένο με 10 mM MgSO₄ και 0.2% μαλτόζη και η καλλιέργεια επωάζεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 2.5-3 h.
 - ⊗ Μεγαλύτερης διάρκειας επώαση μπορεί να μεταβάλει την αντιπροσώπευση των κλώνων.
4. Η καλλιέργεια θερμαίνεται στους 65-70°C για 20 min.
 - ⊗ Η θέρμανση προκαλεί τη λύση των φαγικών σωματίων και των κυττάρων, χωρίς ωστόσο να επηρεάζεται η επιβίωση των φαγεμιδίων.
5. Τα κυτταρικά υπολείμματα καθιζάνουν μετά από φυγοκέντρηση στις 1000 g για 10 min και το υπερκείμενο που περιέχει τα φαγεμίδια μεταφέρεται σε νέα κωνική φιάλη.

6. Στη συνέχεια σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθενται 1 µl εναιωρήματος φαγεμιδίων και 200 µl κατεργασμένων βακτηριακών κυττάρων XLOLR (§ 2.6.2) και επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 15 min.
7. Ακολούθως προστίθενται 40 µl NZY (5X) και το μείγμα επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 45 min.
 - ⊗ Κατά τη διάρκεια της επώασης επάγεται η έκφραση του γονιδίου της καναμυκίνης.
8. Τέλος 100 µl του μείγματος επιστρώνονται σε τρυβλίο 90 mm που περιέχει στερεό θρεπτικό μέσο LB εμπλουτισμένο με 50 µg/ml καναμυκίνη, το οποίο επωάζεται σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 h.

2.7 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

2.7.1 Συμβατική PCR (Conventional PCR) τελικού σημείου

Η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) είναι μια γρήγορη και εύχρηστη τεχνική που εφαρμόζεται για την *in vitro* ενζυμική ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA (Saiki et al. 1985, Mullis et al. 1986). Οι συνθετικές αντιδράσεις βασίζονται στη χρήση δύο πλευρικών αντιπαράλληλων ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers) που λειτουργούν ως εναρκτήρια μόρια για τη δημιουργία συμπληρωματικών αλυσίδων ως προς μια μήτρα DNA και μιας ειδικής DNA πολυμεράσης που καταλύει τη σύνθεση των συμπληρωματικών αλυσίδων, παρουσία περίσσειας δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs).

Η DNA πολυμεράση που χρησιμοποιείται απομονώνεται από το θερμοφίλο βακτήριο *Thermus aquaticus* (Taq πολυμεράση), γεγονός που της προσδίδει ανθεκτικότητα στις υψηλές θερμοκρασίες (έως 95°C) που απαιτούνται στις αντιδράσεις. Τα dNTPs ενώνονται με φωσφοδιεστερικό δεσμό στο ελεύθερο υδροξύλιο (-OH) κάθε εκκινητή, ο οποίος είναι συμπληρωματικός προς τη μία μόνο αλυσίδα της μήτρας DNA. Μετά από επαναλαμβανόμενους

κύκλους επιμήκυνσης των εκκινητών με κατεύθυνση 3'→5', τελικά επιτυγχάνεται ο εκλεκτικός πολλαπλασιασμός του επιθυμητού τμήματος DNA.

Η εκλεκτικότητα συνεπάγεται του σχεδιασμού των εκκινητών, που βασίζεται στις γνωστές αλληλουχίες εκατέρωθεν της περιοχής που πρόκειται να ενισχυθεί, ώστε να είναι συμπληρωματικοί προς αυτές. Έτσι καθορίζονται τα άκρα του επιθυμητού τμήματος, ενώ το μέγεθός του ορίζεται από την απόσταση μεταξύ των εκκινητών στη μήτρα DNA. Στην περίπτωση που οι αλληλουχίες των άκρων τού προς ενίσχυση τμήματος δεν είναι διαθέσιμες, οι εκκινητές σχεδιάζονται σύμφωνα με την αλληλουχία ειδικών μορίων (συνδέτες, linkers) που συνδέονται στα άκρα του. Κατά τον σχεδιασμό των εκκινητών πρέπει να λαμβάνονται υπόψη οι ακόλουθες παράμετροι:

α) το μήκος τους να είναι μεταξύ 18-24 νουκλεοτιδίων,

β) η θερμοκρασία τήξης (T_m) τους να κυμαίνεται από 50-65°C και να είναι παραπλήσιες μεταξύ τους,

γ) να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα είτε μεταξύ των μορίων του ίδιου εκκινητή, είτε μεταξύ των δύο εκκινητών προς αποφυγή σχηματισμού δευτεροταγών δομών ή διμερών αντίστοιχα,

δ) η περιεκτικότητα τους σε G/C να είναι 50-60%,

ε) το 3' άκρο τους να μην εμφανίζει 3 ή περισσότερα G ή C νουκλεοτίδια, ώστε να αποτρέπεται η σύνδεσή τους σε μη ειδικές περιοχές του γονιδιώματος πλούσιες σε επαναλήψεις G/C.

Επιπλέον, για να εξασφαλιστεί το στάδιο της αντιγραφής από την πολυμεράση είναι απαραίτητη η προσθήκη του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) του ενζύμου για τη διατήρηση του pH και της ιοντικής ισχύος του περιβάλλοντος της αντίδρασης, καθώς και διάλυμα ιόντων Mg^{+2} . Τα σύμπλοκα μεταξύ των ιόντων Mg^{+2} και των dNTPs αποτελούν το υπόστρωμα αναγνώρισης της πολυμεράσης, γι' αυτό και οι συγκεντρώσεις των πρώτων πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 1.5-4.0 mM, ώστε να

περιορίζεται η συχνότητα πολυμερισμού λάθος νουκλεοτιδίων και η ενίσχυση μη ειδικών προϊόντων.

Μια τυπική αντίδραση PCR αποτελείται από επαναλαμβανόμενους κύκλους πολυμερισμού, καθένας από τους οποίους περιλαμβάνει τρία στάδια. Αρχικά πραγματοποιείται αποδιάταξη της μήτρας του δίκλωνου DNA, με θέρμανση. Ακολουθεί ψύξη του δείγματος σε θερμοκρασία που επιτρέπει τον υβριδισμό των εκκινητών στις μονόκλωνες πλέον συμπληρωματικές αλυσίδες της μήτρας. Η θερμοκρασία αυτή ρυθμίζεται περίπου 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m) των εκκινητών. Τέλος, κάθε κύκλος ολοκληρώνεται με την επιμήκυνση των εκκινητών από την Taq πολυμεράση και συνεπώς των πολυμερισμό των νέων αλυσίδων. Κατά τη διαδικασία αυτή τα προϊόντα κάθε κύκλου ενίσχυσης, λειτουργούν ως μήτρες του επόμενου κύκλου.

Η επαναλαμβανόμενη σειρά αντιδράσεων πολυμερισμού πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή (θερμικός κυκλοποιητής) που προγραμματίζεται ώστε να μεταβαίνει κυκλικά στις επιθυμητές θερμοκρασίες για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα. Αποτέλεσμα κάθε αντίδρασης PCR είναι η εκθετική αύξηση της αρχικής ποσότητας DNA, η οποία μετά από n κύκλους θα έχει πολλαπλασιαστεί 2^n φορές. Τα προϊόντα ενίσχυσης της αντίδρασης PCR αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.

Στην περίπτωση που το προϊόν μιας PCR, λειτουργήσει ως μήτρα για νέα αντίδραση χρησιμοποιώντας τον έναν εκκινητή από το ζεύγος της αρχικής αντίδρασης και έναν νέο εκκινητή που υβριδοποιείται εσωτερικά του προϊόντος, τότε η αντίδραση χαρακτηρίζεται ως semi-nested PCR, ενώ στην περίπτωση που και οι δύο εκκινητές της νέας αντίδρασης είναι εσωτερικοί ως nested PCR.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου PCR (200 μ l) προστίθενται 10-50 ng μήτρας DNA, 0.4-0.6 μ M κάθε εκκινητή, 0.2 mM dNTPs (το καθένα), 1X buffer Taq πολυμεράσης, 1.5 mM $MgCl_2$, 1 unit Taq DNA πολυμεράσης και ο όγκος της αντίδρασης (25 μ l)

συμπληρώνεται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας ddH₂O.

⊗ Οι μονάδες ενεργότητας (units) του ενζύμου καθορίζουν την ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για τον πολυμερισμό 10 nmoles νουκλεοτιδίων σε 30 min στους 70°C σε αντίδραση όγκου 50 µl.

2. Το δείγμα τοποθετείται σε θερμικό κυκλοποιητή και η αντίδραση πραγματοποιείται στις ακόλουθες συνθήκες:

- | | | |
|--------------------------|-----------------------------|------------------|
| i. Αρχική αποδιάταξη: | 94°C, 1-2 min | } για 30 κύκλους |
| ii. Αποδιάταξη: | 94°C, 30 sec | |
| iii. Υβριδισμός: | T _m -5°C, 30 sec | |
| iv. Επιμήκυνση: | 72°C, ~1 min/kb | |
| viii. Τελική επιμήκυνση: | 72°C, 5-7 min | |

2.7.2 PCR μεγάλου μήκους (Long PCR)

Η αντίδραση PCR μεγάλου μήκους πραγματοποιήθηκε με χρήση του Long PCR Enzyme Mix (Fermentas) και βασίζεται στην ίδια αρχή με τη συμβατική PCR (§ 2.7.1). Ωστόσο εξασφαλίζει την ενίσχυση τμημάτων DNA μήκους έως και 40 kb, σε αντίθεση με την συμβατική που ενισχύει αποτελεσματικά έως 3 kb. Η διαφορά αυτή είναι απόρροια της χρήσης στη Long PCR δύο ενζύμων, μιας Taq πολυμεράσης υψηλής απόδοσης και μιας DNA πολυμεράσης με δράση 3'→5' επιδιορθωτικής εξωνουκλεάσης. Επιπλέον η αντίδραση πραγματοποιείται παρουσία του ενισχυτικού DMSO (dimethylsulfoxide), το οποίο δρα ως συνδιαλύτης μειώνοντας τις δευτεροταγείς δομές, με αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης και της εξειδίκευσης της αντίδρασης.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου PCR (200 µl) προστίθενται 0.01-2.5 ng μήτρας φαγικού DNA, 1 µM κάθε εκκινητή, 0.2 mM dNTPs (το καθένα), 1X buffer Taq πολυμεράσης, 1.5 mM MgCl₂, 2.5 units Long PCR Enzyme mix και ο όγκος της αντίδρασης (50 µl) συμπληρώνεται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας ddH₂O.

⊗ Στην περίπτωση ενίσχυσης γονιδιωµατικού DNA χρησιμοποιείται ως μήτρα ποσότητα 0.75-1 µg DNA Αν η

προς ενίσχυση περιοχή έχει μήκος >30 kb, προστίθεται επιπλέον και 4% DMSO.

2. Το δείγμα τοποθετείται σε θερμικό κυκλοποιητή και η αντίδραση πραγματοποιείται στις ακόλουθες συνθήκες:

- | | | |
|--------------------------|---------------------------------|------------------|
| i. Αρχική αποδιάταξη: | 94°C, 1-2 min | } για 10 κύκλους |
| ii. Αποδιάταξη: | 94°C, 30 sec | |
| iii. Υβριδισμός: | T _m -5°C, 30 sec | |
| iv. Επιμήκυνση: | 72°C, ~1 min/kb | |
| v. Αποδιάταξη: | 94°C, 30 sec | } για 20 κύκλους |
| vi. Υβριδισμός: | T _m -5°C, 30 sec | |
| vii. Επιμήκυνση: | 72°C, ~1 min/kb
+2 sec/κύκλο | |
| viii. Τελική επιμήκυνση: | 72°C, 5-7 min | |

⊗ Η επέκταση του χρόνου επιμήκυνσης ανά κύκλο στο στάδιο vii εξαρτάται από το μέγεθος του προς ενίσχυση τμήματος. Ο συγκεκριμένος χρόνος αναφέρεται σε τμήματα έως 6 kb.

2.7.3 PCR Αντίστροφης μεταγραφής (Reverse Transcription RT-PCR)

Η PCR αντίστροφης μεταγραφής χρησιμοποιείται ευρέως σε αναλύσεις γονιδιακής έκφρασης. Βασίζεται στην ίδια αρχή με τη συμβατική PCR, με τη διαφορά ότι χρησιμοποιεί ως μήτρα μόρια συμπληρωματικού DNA (complementary DNA, cDNA). Προϋποθέτει την μεταγραφή του RNA με χρήση του ενζύμου αντίστροφης μεταγραφάσης και ακολούθως την ανάκτηση του cDNA μετά από αποικοδόμηση του RNA με δράση της RNάσης H (RNase H).

2.7.3.1 Σύνθεση cDNA

Η αντίδραση της αντίστροφης μεταγραφής στηρίζεται στη δράση του ιικού ενζύμου, αντίστροφη μεταγραφάση (Reverse Transcriptase, RTase). Πρόκειται για μια RNA-εξαρτώμενη DNA πολυμεράση, η οποία χρησιμοποιώντας ως μήτρα RNA προσθέτει τα συμπληρωματικά με το RNA δεοξυριβονουκλεοτίδια για τη δημιουργία του cDNA. Η ειδικότητα της αντίδρασης όσον αφορά ποια μόρια RNA θα μεταγραφούν αντίστροφα,

καθορίζεται από τον εκκινητή που θα χρησιμοποιηθεί και που μπορεί να είναι τυχαία εξαμερή, ολιγομερή δεοξυθυμίνης ή ειδικός εκκινητής για συγκεκριμένο γονίδιο.

Για τη δημιουργία μορίων cDNA που προέρχονται μόνο από τα μετάγραφα mRNA, χρησιμοποιούνται τα ολιγονουκλεοτίδια δεοξυθυμίνης (oligo-dT). Η χρήση τους βασίζεται στην ικανότητα υβριδισμού τους στην poly(A) ουρά των μορίων mRNA, η οποία προκύπτει από την πολυαδενυλίωση που υφίστανται τα mRNA των ευκαρυωτικών κυττάρων κατά την ωρίμανσή τους. Για τη σύνθεση του μονόκλωνου cDNA, χρησιμοποιήθηκε το AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit (Stratagene) που περιλαμβάνει μείγμα ενζύμων αντίστροφης μεταγραφάσης (AffinityScript RT) και αναστολέων ριβονουκλεασών (RNase Block) και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο που προτείνεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου PCR (200 µl) προστίθενται 1 µg μήτρας RNA, 1X cDNA synthesis master mix (που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα, MgCl₂ και dNTPs), 300ng oligo-dT εκκινητή, 1 µl μείγματος AffinityScript RT/ RNase Block και ο όγκος της αντίδρασης (20 µl) συμπληρώνεται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας ddH₂O.
2. Το δείγμα τοποθετείται σε θερμικό κυκλοποιητή και η αντίδραση πραγματοποιείται στις ακόλουθες συνθήκες:
 - i. Υβριδισμός εκκινητή: 25°C, 7 min
 - ii. Πολυμερισμός cDNA: 48°C, 30 min
 - iii. Τερματισμός αντίδρασης: 95°C, 5 min
3. Το συντιθέμενο cDNA διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C.

2.7.3.2 Ενίσχυση του cDNA με PCR

Το cDNA ενισχύεται σύμφωνα με το πρωτόκολλο της συμβατικής PCR (§ 2.7.1), χρησιμοποιώντας εκκινητές ειδικούς προς το επιθυμητό μετάγραφο.

2.7.4 PCR πραγματικού χρόνου με SYBR Green I (Real-Time PCR)

Η τεχνική της PCR πραγματικού χρόνου αποτελεί μια αξιόπιστη και ευαίσθητη παραλλαγή της συμβατικής PCR, η οποία επιτρέπει την ποσοτικοποίηση συγκεκριμένων αλληλουχιών-στόχων (Higuchi et al 1992, για ανασκόπηση Kubista et al. 2006). Αν και η δυνατότητα ποσοτικής αντίδρασης παρέχεται και από τις δύο τεχνικές, στη συμβατική PCR ο υπολογισμός του προϊόντος πραγματοποιείται στο τέλος της αντίδρασης μετά από ηλεκτροφόρηση, με εμφανές μειονέκτημα τη μείωση της αποδοτικότητας της αντίδρασης, λόγω της κατανάλωσης των αντιδρώντων και της συσσώρευσης αναστολέων, κάτι που δυσχεραίνει την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση. Αντίθετα, στη Real-Time PCR η διαδικασία ενίσχυσης του προϊόντος καταγράφεται καθ' όλη τη διάρκεια της αντίδρασης, μέσω της παρακολούθησης της αύξησης του φθορισμού κάποιας φθορίζουσας ουσίας ανά κύκλο (καμπύλη ενίσχυσης, amplification plot).

Το σύστημα ανίχνευσης φθορισμού που εφαρμόστηκε βασίζεται στη χρήση της φθορίζουσας χρωστικής SYBR green I. Καθώς συντίθεται το προϊόν ενίσχυσης, η χρωστική αυτή ενσωματώνεται στα δίκλινα μόρια DNA με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού, η ένταση του οποίου είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του παραγόμενου προϊόντος. Σημαντικό μειονέκτημα της SYBR green αποτελεί το γεγονός ότι προσδέεται σε όλα τα δίκλινα μόρια DNA που συντίθενται κατά την αντίδραση, στα οποία συμπεριλαμβάνονται τα πιθανά διμερή των εκκινητών καθώς και μη ειδικά προϊόντα ενίσχυσης. Το γεγονός αυτό μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης της αλληλουχίας-στόχου. Ωστόσο, η δυνατότητα ανάκτησης των καμπυλών τήξης (melting curves) μετά το πέρας της αντίδρασης, επιτρέπει το διαχωρισμό του φθορισμού που προέκυψε από την ενίσχυση της αλληλουχίας-στόχου από τους αντίστοιχους που οφείλονται στα διμερή των εκκινητών ή σε μη ειδικά προϊόντα.

Κατά τη διάρκεια των πρώτων κύκλων της αντίδρασης, το σήμα φθορισμού είναι ασθενές και δεν διακρίνεται από το ενδογενές σήμα των αντιδρώντων μορίων (background). Καθώς ο ρυθμός συσσώρευσης των προϊόντων αυξάνεται, η αντίδραση περνά στην εκθετική της φάση και εμφανίζει τη μέγιστη αποδοτικότητα, η οποία προσεγγίζει το 100% και θεωρητικά σε κάθε κύκλο η ποσότητα του προϊόντος διπλασιάζεται. Από έναν αριθμό κύκλων και ύστερα, επέρχεται η γραμμική φάση, κατά την οποία η συγκέντρωση των συστατικών της αντίδρασης περιορίζεται και η καταλυτική δραστηριότητα των μορίων της DNA πολυμεράσης ελαττώνεται, με αποτέλεσμα τη σταδιακή μείωση της απόδοσης. Τελικά η καμπύλη φθορισμού φτάνει σε κορεσμό (plateau) οπότε και η αντίδραση τερματίζεται.

Οι μετρήσεις για την ποσοτικοποίηση αφορούν την εκθετική φάση της αντίδρασης και συγκεκριμένα την τιμή Ct (threshold cycle). Η τελευταία αποτελεί τον αριθμό των κύκλων που απαιτούνται για την ανίχνευση σήματος φθορισμού, είναι αντιστρόφως ανάλογη της αρχικής ποσότητας της μήτρας DNA και πρέπει να προσεγγίζει ένα συγκεκριμένο οριακό επίπεδο (threshold). Το επίπεδο αυτό ορίζει ότι η τιμή του παρατηρούμενου φθορισμού είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη του μη-ειδικού ενδογενούς σήματος (background). Συνεπώς οι μετρήσεις πραγματικού χρόνου αντανακλούν διαφορές στις αρχικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται.

Η απόλυτη ποσοτικοποίηση βασίζεται στη χρήση μιας πρότυπης καμπύλης, η οποία κατασκευάζεται με βάση διαδοχικές αραιώσεις δείγματος DNA γνωστής συγκέντρωσης. Η καμπύλη αναφοράς που προκύπτει δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού της συγκέντρωσης άγνωστων δειγμάτων. Επιπλέον, λαμβάνοντας υπόψη το μοριακό βάρος του DNA που χρησιμοποιείται, η τιμή της συγκέντρωσης του κάθε δείγματος μετατρέπεται σε αριθμό αντιγράφων.

Μεθοδολογία

1. Η επιθυμητή συγκέντρωση ποσότητα DNA (όγκου 1 μl) προστίθεται σε μικροσωληνάρια (Low tube strip, WHT).

2. Το μείγμα της αντίδρασης αποτελείται επιπλέον από 1X ρυθμιστικού διαλύματος (KAPA™ SYBR® Green FAST qPCR master mix-Kapa Biosystems), 150 nM κάθε εκκινητή, και ο όγκος της αντίδρασης (20 μl) συμπληρώνεται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας ddH₂O.

3. Το δείγμα τοποθετείται σε ειδικό θερμικό κυκλοποιητή και η αντίδραση πραγματοποιείται στις ακόλουθες συνθήκες:

- | | | |
|-----------------------|--------------------------------|------------------|
| i. Αρχική αποδιάταξη: | 95°C, 10 min | } για 40 κύκλους |
| ii. Αποδιάταξη: | 95°C, 30 sec | |
| iii. Υβριδισμός: | T _m -5°C, 10-30 sec | |
| iv. Επιμήκυνση: | 72°C, ~1 min/kb | |

2.7.4.1 Ανίχνευση και ανάλυση προϊόντων Real-Time PCR

Μετά από τα στάδια υβριδισμού των εκκινητών και της επιμήκυνσης από την DNA πολυμεράση κάθε επαναλαμβανόμενου κύκλου, κατάλληλος λαμπτήρας του οργάνου εκπέμπει σε συγκεκριμένο μήκος κύματος (~520nm) προκαλώντας τη διέγερση της χρωστικής SYBR green I με αποτέλεσμα την παραγωγή φθορισμού. Το σήμα του φθορισμού ανιχνεύεται στο κατάλληλο για τη χρωστική φίλτρο από ειδικό ανιχνευτή. Η ένταση του εκπεμπόμενου φθορισμού καταγράφεται με τη βοήθεια ειδικού λογισμικού και η γραφική της απεικόνιση ως προς τους κύκλους της αντίδρασης αποτελεί την καμπύλη ενίσχυσης.

Αφού ολοκληρωθεί η αντίδραση, τα προϊόντα της ενίσχυσης αναλύονται μέσω της καμπύλης τήξης. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται διαδοχικά, μετά τη φάση κορεσμού της PCR, θέρμανση στους 95°C και απότομη ψύξη (95°C για 1 min, 55°C για 30sec, 95°C για 30sec) ώστε να δίκλωνα μόρια DNA να αποδιαταχθούν και ακολούθως να επανασυνδεθούν συμπληρωματικά. Η καμπύλη τήξης συνάρτηση του φθορισμού με την θερμοκρασία και δημιουργείται με συνεχή μέτρηση του φθορισμού καθώς η θερμοκρασία αυξάνεται προοδευτικά έως ότου αποδιαταχθούν τα προϊόντα PCR, οπότε και παρατηρείται απότομη ελάττωση του φθορισμού. Η αρνητική παράγωγος της

καμπύλης παρουσιάζει κορυφές που αντιστοιχούν στα προϊόντα της αντίδρασης. Η εμφάνιση κορυφών στην ίδια θερμοκρασία τήξης, συνιστά την ενίσχυση απόλυτα ειδικών προϊόντων. Αντίθετα, προϊόντα μη ειδικής ενίσχυσης (διμερών των εκκινητών ή άλλων παραπροϊόντων συνήθως μικρότερου μεγέθους) εμφανίζουν κορυφές μετατοπισμένες προς τα αριστερά λόγω των μικρότερων θερμοκρασιών τήξης τους. Η διαδικασία συλλογής των αποτελεσμάτων της PCR ολοκληρώνεται προσδιορίζοντας το Ct κάθε δείγματος, με χρήση του ειδικού λογισμικού που παρέχεται από τον κατασκευαστή και επιτρέπει τον καθορισμό του επιπέδου “threshold” βάσει ειδικών αλγορίθμων.

2.8 ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

Το αποδιαταγμένο DNA έχει την ικανότητα να αναδιατάσσεται, οδηγώντας στον επανασχηματισμό των δεσμών υδρογόνου μεταξύ συμπληρωματικών αλυσίδων. Η ανάμιξη αποδιαταγμένων μονόκλωνων μορίων DNA ή/και RNA υπό κατάλληλες συνθήκες ιοντικής ισχύος και θερμοκρασίας, οδηγεί στο σχηματισμό υβριδικών μορίων και η διαδικασία αυτή καλείται υβριδοποίηση ή υβριδισμός. Στην ενότητα αυτή περιγράφονται οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση ειδικών αλληλουχιών – στόχων βασιζόμενες στην παραπάνω ιδιότητα. Αρχικά περιγράφονται οι μέθοδοι σήμανσης των ανιχνευτών που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά και ακολουθούν τα πρωτόκολλα για την υβριδοποίηση ανιχνευτών i) σε προϊόντα ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης (ανάλυση κατά Southern), ii) σε επιστρωμένους βακτηριοφαγικούς κλώνους (διαλογή βιβλιοθήκης) και iii) σε χρωμοσωμικά παρασκευάσματα (*in situ*).

2.8.1 Σήμανση ανιχνευτών

Οι ανιχνευτές αποτελούν μονόκλινα τμήματα DNA, RNA ή ολιγονουκλεοτίδια που υβριδοποιούνται βάσει συμπληρωματικότητας στις

ομόλογές τους αλληλουχίες. Για να εξασφαλίζεται ο εντοπισμός τους σημαίνονται με προσθήκη δεοξυριβονουκλεοτιδίων (dNTPs) ή ριβονουκλεοτιδίων (NTPs) συζευγμένα με μόρια είτε ραδιενεργά (³²P, ³⁵S, ³H) είτε μη ραδιενεργά [βιοτίνη (biotin, Bio), διγοξιγενίνη (digoxigenin, DIG)] ανάλογα με το σύστημα ανίχνευσης που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί. Τα σημασμένα νουκλεοτίδια ενσωματώνονται κατά την παραγωγή τους, είτε μετά με σύνδεσή τους στο 5΄ ή 3΄ άκρο του ανιχνευτή. Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου παραγωγής τους (*in vitro* μεταγραφή, μέθοδος τυχαίων εκκινητών, PCR ενίσχυση) και η επιλογή εξαρτάται από τις ανάγκες της κάθε πειραματικής διαδικασίας.

2.8.1.1 Σήμανση DNA ανιχνευτών με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών

Η μέθοδος των τυχαίων εκκινητών που ακολουθήθηκε για τη σήμανση δίκλωνων μορίων DNA, έγινε με χρήση του DecaLabel™ DNA Labelling kit (Fermentas). Βασίζεται στην ικανότητα τυχαίων ολιγομερών να προσδένονται σε αποδιαταγμένα μόρια DNA και να λειτουργούν ως εκκινητές για τον 5΄→3΄ πολυμερισμό τους από το ενζυμικό κλάσμα Klenow της DNA πολυμεράσης I (Feinberg & Vogelstein 1983). Η επιλογή της μεγάλης υπομονάδας του ενζύμου (Klenow fragment) στηρίζεται στην απουσία της 5΄→3΄ εξωνουκλεοτιδικής δράσης της, ενώ η αντίστοιχη 3΄→5΄ περιορίζεται λόγω συνθηκών της αντίδρασης. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε προτείνεται στο εγχειρίδιο του κατασκευαστή. Η σήμανση επιτυγχάνεται με ενσωμάτωση βιοτυνιλιωμένων δεοξυνουκλεοτιδίων (Biotin-11-dUTP) κατά τον πολυμερισμό των αποδιαταγμένων αλυσίδων του DNA από την Klenow με χρήση τυχαίων δεκανουκλεοτιδίων ως εκκινητές.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου erppendorf προστίθενται 0.1-1 μg του επιθυμητού DNA, 1X ρυθμιστικού διαλύματος της πολυμεράσης που περιέχει τυχαία δεκανουκλεοτίδια ως εκκινητές και ο όγκος της αντίδρασης (50 μl) συμπληρώνεται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας ddH₂O.

2. Ακολουθεί θερμική αποδιάταξη του μείγματος στους 100°C για 10 min και μεταφορά του σε πάγο.
3. Στη συνέχεια προστίθενται 0.035 mM Biotin-11-dUTP, μείγμα μη σημασμένων dNTPs (dGTP, dATP, dCTP: 0.1 mM, dTTP: 0.065 mM) και 5 units DNA Klenow πολυμεράσης I.
4. Το μείγμα επώζεται μετά από ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία 37°C για 12-16 h.
5. Ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη και ο ανιχνευτής ανακτάται μετά από επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl ddH₂O.

2.8.1.2 Σήμανση RNA ανιχνευτών με *in vitro* μεταγραφή

Η δημιουργία τους επιτυγχάνεται με χρήση των βακτηριοφαγικών RNA πολυμερασών (T7, T3 και SP6), οι οποίες έχουν τη δυνατότητα να μεταγράφουν RNA χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη της αλληλουχίας του υποκινητή της αντίστοιχης πολυμεράσης ανοδικά του τμήματος που πρόκειται να μεταγραφεί. Στην περίπτωση των βακτηριοφάγων λ-Dash®II εκατέρωθεν του κλωνοποιημένου ενθέματος εντοπίζονται μοναδικά οι υποκινητές των RNA πολυμερασών T3 και T7. Η σήμανση επιτυγχάνεται με ενσωμάτωση βιοτυνιλιωμένων δεοξυνουκλεοτιδίων (Biotin-dCTP) κατά τη μεταγραφή των γραμμικών τμημάτων DNA, μετά από πέψη με κατάλληλη περιοριστική ενδονουκλεάση. Τελικά οι RNA ανιχνευτές που παράγονται με *in vitro* μεταγραφή είναι μονόκλινα μόρια συγκεκριμένου μεγέθους και συμπληρωματικά μόνο προς μια αλυσίδα. Επιπλέον προσδίδουν ιδιαίτερη ευαισθησία στη διαδικασία της υβριδοποίησης καθώς τα ετερογενή υβρίδια RNA:DNA που δημιουργούνται παρουσιάζουν υψηλή σταθερότητα.

Μεθοδολογία

1. Ποσότητα DNA βακτηριοφάγου λ υφίσταται πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση HaeIII.
 - ⊗ Η περιοριστική ενδονουκλεάση δεν πρέπει να δημιουργεί 3' προεξέχοντα άκρα, καθώς μπορούν να λειτουργήσουν ως επιπλέον θέσεις έναρξης της μεταγραφής.

2. Ακολουθεί εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.
3. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε ddH₂O και μεταφέρεται σε σωληνάκι τύπου erpendorf όπου προστίθενται διαδοχικά: 1 mM νουκλεοσιδίων A, G, U (το καθένα) και 0.5 mM νουκλεοσιδίου C, 0.5 mM Biotin-CTP, 5 mM DDT, 1X ρυθμιστικό διάλυμα του ενζύμου, 20 units αναστολέα ριβονουκλεασών (RNase inhibitor) και 25 units RNA πολυμεράση.
4. Πραγματοποιείται επώαση του μείγματος σε θερμοκρασία 37°C για 2 h και ακολούθως εκχύλιση με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.
5. Τελικά ο ανιχνευτής ανακτάται μετά από επαναδιάλυση του ιζήματος σε 50 μl ddH₂O.

2.8.1.3 Σήμανση ανιχνευτών με διγοξιγενίνη

Η σήμανση των ανιχνευτών έγινε με διγοξιγενίνη, ένα στεροειδές που απομονώθηκε από το φυτό *digitalis*, σύμφωνα με το πρωτόκολο της εταιρείας Boehringer Mannheim (Digoxigenin, DIG DNA labelling kit). Η μοναδική αυτή πηγή προέλευσής της εξασφαλίζει ότι τα ειδικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή της δεν θα προσδεθούν σε άλλο βιολογικό υλικό. Η σήμανση επιτυγχάνεται με ενσωμάτωση δεοξυνουκλεοτιδίων συζευγμένων με διγοξιγενίνη (Dig-11-dUTP) κατά τον πολυμερισμό των αποδιαταγμένων αλυσίδων του DNA από την Klenow πολυμεράση (§ 2.8.1.1) με χρήση τυχαίων εξανουκλεοτιδίων ως εκκινητές.

Μεθοδολογία

1. Σε σωληνάκι τύπου erpendorf προστίθεται το προς σήμανση DNA (~100 ng), αποδιατάσσεται με θέρμανση στους 95°C για 10 min και μεταφέρεται γρήγορα στον πάγο.
2. Στη συνέχεια προστίθενται 2 μl μίγματος εξανουκλεοτιδίων (10X), 2 μl μίγματος σήμανσης Dig-dNTPs (10X), 1 μl ενζύμου Klenow (10X) και ο όγκος της αντίδρασης (20 μl) συμπληρώνεται με την προσθήκη της κατάλληλης ποσότητας ddH₂O.
3. Το δείγμα επώζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 16-24 h.

4. Η αντίδραση τερματίζεται με προσθήκη 2 μl EDTA (0.2M).
5. Στη συνέχεια προσθέτονται 2.5 μl LiCl (4M) και το DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη.
6. Τελικά το ίζημα επαναδιαλύεται σε 75 μl διαλύματος υβριδισμού.

2.8.1.4 Σήμανση ανιχνευτών με βιοτίνη για FISH

Η σήμανση των ανιχνευτών πραγματοποιήθηκε μέσω της ενσωμάτωσης δεοξυνουκλεοτιδίων συζευγμένων με βιοτίνη (biotin-11-dUTP) μέσω PCR ενίσχυσης της επιθυμητής αλληλουχίας, που έχει κλωνοποιηθεί σε πλασμιδιακό φορέα. Ο σημασμένος ανιχνευτής ανακτάται με κατακρήμνιση.

2.8.2 Ανάλυση κατά Southern

Η ανάλυση κατά Southern συνίσταται στην μεταφορά μορίων DNA που έχουν διαχωριστεί σε πήκτωμα αγαρόζης σε ειδικό υπόστρωμα (νάιλον μεμβράνη) και ακολούθως την υβριδοποίησή τους με κατάλληλα σημασμένους ανιχνευτές, επιτρέποντας τον επιλεκτικό εντοπισμό αλληλουχιών, μετά από ανίχνευση του σήματος της υβριδοποίησης (Southern 1975). Ενδεικτικές εφαρμογές της τεχνικής αφορούν στη χαρτογράφηση με περιοριστικές ενδονουκλεάσες κλωνοποιημένων τμημάτων DNA, την ταυτοποίηση ομόλογων αλληλουχιών μεταξύ διαφορετικών οργανισμών, την απομόνωση γονιδίων και άλλων γονιδιωματικών στοιχείων.

2.8.2.1 Μεταφορά σε νάιλον μεμβράνη

Η διαδικασία συνίσταται στη μεταφορά και ακινητοποίηση σε στερεό υπόστρωμα (μεμβράνη) τμημάτων DNA που έχουν διαχωριστεί με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για υβριδοποίηση με κατάλληλο ανιχνευτή. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε αφορά στην τριχοειδή μεταφορά σε φορτισμένη νάιλον μεμβράνη (Lichtenstein et al. 1990, Chomczynski 1992). Αρχικά το πήκτωμα επωάζεται σε αλκαλικό διάλυμα ώστε να

αποδιαταχθεί το DNA, και ακολούθως να μεταφερθεί μονόκλωνο πλέον στη μεμβράνη, η οποία τοποθετείται πάνω στο πήκτωμα. Λόγω της διαφοράς δυναμικού κατά τη ροή του ρυθμιστικού διαλύματος υψηλής ιονικής ισχύος σε μια ειδική διάταξη που κατασκευάζεται, επιτυγχάνεται και η ταυτόχρονη μεταφορά του DNA λόγω τριχοειδών φαινομένων στη μεμβράνη. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση μεταξύ της θετικά φορτισμένης μεμβράνης και των ανιόντων των φωσφορικών ομάδων του DNA, συμβάλει στην αποτελεσματική δέσμευσή του. Τέλος, τα νουκλεϊκά οξέα σταθεροποιούνται στη μεμβράνη με ξήρανση, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα ακριβές αντίγραφο της κατανομής των τμημάτων DNA του πηκτώματος στην επιφάνειά της.

Μεθοδολογία

1. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα αγαρόζης φωτογραφίζεται υπό την επίδραση UV ακτινοβολίας, έχοντας προσαρμοσμένο χάρακα κατά μήκος της φοράς κίνησης του DNA.

⊗ Η φωτογράφιση με τον προσαρμοσμένο χάρακα έχει σκοπό τον ακριβή προσδιορισμό των υβριδοποιούμενων ζωνών μέσω της σύγκρισης της θέσης εμφάνισης σήματος μετά την υβριδοποίηση με τη φωτογραφία του πηκτώματος μετά την ηλεκτροφόρηση.
2. Το πήκτωμα μεταφέρεται σε ειδικό δοχείο όπου επωάζεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 min σε διάλυμα αποδιάταξης, το οποίο στη συνέχεια απορρίπτεται.
3. Το στάδιο 2 επαναλαμβάνεται.
4. Ακολούθως επωάζεται υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min σε διάλυμα εξουδετέρωσης, το οποίο στη συνέχεια απορρίπτεται.
5. Το στάδιο 4 επαναλαμβάνεται.
6. Το πήκτωμα μετά από επώαση υπό ανάδευση σε διάλυμα 2X SSC σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min, μεταφέρεται σε γέφυρα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM, του οποίου οι άκρες εμβαπτίζονται σε διάλυμα 10X SSC.
7. Η μεμβράνη, της οποίας οι διαστάσεις καθορίζονται περίπου ως 0.5 cm μικρότερες ανά πλευρά της επιφάνειας του πηκτώματος, αφού

διαβραχεί διαδοχικά με ddH₂O και με διάλυμα 6X SSC, τελικά τοποθετείται στην επιφάνεια του πηκτώματος.

☞ Η μεμβράνη πρέπει να εφάπτεται πλήρως με το πήκτωμα και να αποφεύγεται η δημιουργία κενών που παρεμποδίζουν τη μεταφορά του DNA.

8. Στη συνέχεια δημιουργείται η κατασκευή που προκαλεί την τριχοειδή μεταφορά του DNA τοποθετώντας διαδοχικά στη μεμβράνη: 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM, ίσων διαστάσεων με τη μεμβράνη που έχουν διαβραχεί με διάλυμα 6X SSC, 2 φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatman 3MM (ίσων διαστάσεων επίσης) και απορροφητικά χαρτιά διαστάσεων 0.5 cm μικρότερων ανά πλευρά της μεμβράνης και τελευταίο προσαρμόζεται βάρος περίπου 500 gr.

☞ Το βάρος τοποθετείται στην κορυφή της κατασκευής για τη διατήρηση της επαφής της μεμβράνης με το πηκτώμα.

Στην περίπτωση που από το ίδιο πήκτωμα πρέπει να δημιουργηθούν δύο αντίγραφα μεμβρανών, η παραπάνω διάταξη προσαρμόζεται για τη δεύτερη μεμβράνη στην κάτω πλευρά του πηκτώματος.

9. Αφού ολοκληρωθεί η μεταφορά του DNA διάρκειας περίπου 16-18 h, αφαιρείται η παραπάνω και σημειώνεται στη μεμβράνη ο προσανατολισμός της και οι θέσεις φόρτωσης.
10. Ακολουθεί σταθεροποίηση του DNA στη μεμβράνη με επώαση σε θερμοκρασία 80°C για 2 h.
11. Η μεμβράνη διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

2.8.2.2 Υβριδοποίηση του ανιχνευτή σε μεμβράνες

Η διαδικασία αφορά στη δημιουργία υβριδίων μεταξύ του ανιχνευτή και των ακινητοποιημένων στη μεμβράνη μορίων DNA (Church & Gilbert 1984). Προϋποθέτει την επώαση της μεμβράνης σε κατάλληλο διάλυμα ώστε να παρεμποδιστεί η πρόσδεση του ανιχνευτή στην ελεύθερη επιφάνειά της (στάδιο προϋβριδοποίησης), για να ακολουθήσει τελικά το στάδιο της υβριδοποίησης με την προσθήκη του ανιχνευτή. Το διάλυμα που

χρησιμοποιείται στο στάδιο της προϋβριδοποίησης περιέχει πολυμερή [DNA από σπέρμα σολωμού (salmon sperm DNA, ssDNA)], πρωτεΐνες και μεγαλομοριακές ενώσεις [αποβουτυρωμένο γάλα, αλβουμίνη (Bovine Serum Albumin, BSA), φικόλη (ficoll), PVP] καθώς και αποδιατακτικά (SDS) που δεσμεύονται στην διαθέσιμη ελεύθερη επιφάνεια της μεμβράνης και λειτουργούν ως παράγοντες αποτροπής της σύνδεσης του ανιχνευτή σε μη ειδικές θέσεις.

Στο στάδιο της υβριδοποίησης λαμβάνει χώρα η μη ομοιοπολική αλλά βάσει συμπληρωματικότητας σύνδεση των αποδιαταγμένων μορίων DNA με τον ανιχνευτή. Για την εξασφάλιση της αποτελεσματικότητας της υβριδοποίησης πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράγοντες που αφορούν την σταθερότητα και συνεπώς την ειδικότητα των σχηματιζόμενων υβριδίων. Κρίσιμη είναι η θερμοκρασία διεξαγωγής της υβριδοποίησης, η οποία θεωρείται βέλτιστη όταν είναι 25°C χαμηλότερη από τη θερμοκρασία τήξης (T_m) των υβριδίων. Η θερμοκρασία T_m υποδηλώνει ότι το 50% του υβριδίου είναι αποδιαταγμένο. Για υβρίδια DNA:DNA και υπολογίζεται από τη σχέση: $T_m = 81.5 + 16.6(\log M [Na^+]) + 0.41(\%G+C) - 500/n$ όπου "M" είναι η συγκέντρωση των μονοσθενών κατιόντων Na και "n" το σύνολο των νουκλεοτιδίων του υβριδίου. Συνεπώς η θερμοκρασία υβριδοποίησης είναι ανάλογη της νουκλεοτιδικής σύστασης σε G+C και του μεγέθους του υβριδίου, αλλά αντιστρόφως ανάλογη των ιόντων αλάτων. Η ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση των κατιόντων Na⁺ με τις αρνητικά φορτισμένες φωσφορικές ομάδες των νουκλεϊκών οξέων αυξάνει τη σταθερότητα του υβριδίου ανεξαρτήτως ομολογίας, ευνοώντας τη σύνδεση του ανιχνευτή σε μη ειδικές θέσεις. Υπό βέλτιστες συνθήκες αυστηρότητας, οι οποίες επιτυγχάνονται όσο μεγαλύτερο και πλούσιο σε G+C είναι το μέγεθος του ανιχνευτή ενώ παράλληλα οι συγκεντρώσεις των αλάτων διατηρούνται χαμηλές, η ευαισθησία της ανίχνευσης αγγίζει τα 0.1 pg.

Μεθοδολογία

1. Η μεμβράνη τοποθετείται σε ειδικό σωλήνα υβριδοποίησης και προστίθεται διάλυμα

υβριδοποίησης, η ποσότητα του οποίου είναι ανάλογη της επιφάνειάς της και υπολογίζεται από τη σχέση: εμβαδόν επιφάνειας x 0.2 ml διαλύματος υβριδοποίησης.

2. Ταυτόχρονα προστίθεται 100 µg/ml ssDNA, το οποίο έχει αποδιαταχθεί με θέρμανση στους 100°C για 10 min.
3. Ακολούθως ο σωλήνας επωάζεται σε ειδικό θάλαμο υβριδοποίησης με περιστροφική κίνηση για 2 h, στη θερμοκρασία υβριδοποίησης του ανιχνευτή και στη συνέχεια απορρίπτεται.
4. Προστίθεται νέο διάλυμα υβριδοποίησης (10 ml/100 cm²) και ο ανιχνευτής (100-200 ng/ml διαλύματος) (§ 2.8.1.1. ή 2.8.1.2).

⌘ Για DNA ανιχνευτές απαιτείται πριν τη χρήση τους, αποδιάταξή τους με θέρμανση στους 100°C για 10 min.

5. Ο σωλήνας επωάζεται σε ειδικό θάλαμο υβριδοποίησης με περιστροφική κίνηση για 16-18 h στην θερμοκρασία διεξαγωγής της προϋβριδοποίησης.

2.8.2.3 Απομάκρυνση του ανιχνευτή

Μετά την ολοκλήρωση της υβριδοποίησης, απαιτείται κατεργασία της μεμβράνης για την απομάκρυνση είτε της περίσσειας του ανιχνευτή (μη συνδεδεμένου) είτε μορίων του ανιχνευτή που έχουν υβριδοποιηθεί ασθενώς σε μη ειδικές αλληλουχίες. Η διαδικασία επιτυγχάνεται με διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης σε διαλύματα αλάτων παρουσία απορρυπαντικού.

Μεθοδολογία

1. Σε σωλήνα τύπου falcon συλλέγεται το διάλυμα υβριδοποίησης που περιέχει τον ανιχνευτή και διατηρείται σε θερμοκρασία -20°C για επόμενη χρήση.
2. Η μεμβράνη μεταφέρεται σε ειδικό δοχείο και επωάζεται υπό ανάδευση σε διάλυμα πλύσης Α σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min.
3. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το στάδιο 2.
4. Ακολούθως επωάζεται υπό ανάδευση σε διάλυμα πλύσης Β στη θερμοκρασία υβριδοποίησης για 20 min.

5. Το διάλυμα απορρίπτεται και επαναλαμβάνεται το στάδιο 4.

6. Τελικά η μεμβράνη εξισορροπείται σε διάλυμα Α για 1 min, οπότε και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη διαδικασία ανίχνευσης σήματος.

2.8.2.4 Ανίχνευση σήματος

Η διαδικασία ανίχνευσης του σήματος της υβριδοποίησης διαφέρει ανάλογα με τον τρόπο σήμανσης του ανιχνευτή. Στην περίπτωση των βιοτινυλιωμένων ανιχνευτών ακολουθείται η ανοσοχημική-χρωματομετρική μέθοδος που συγκαταλέγεται στα έμμεσα ενζυμικά συστήματα ανίχνευσης. Συγκεκριμένα, η παραπάνω μέθοδος βασίζεται στην υψηλή συγγένεια σύνδεσης της βιοτίνης του ανιχνευτή με το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης- αλκαλικής φωσφατάσης στο οποίο εκτίθεται η μεμβράνη. Η συζευγμένη στη στρεπταβιδίνη αλκαλική φωσφατάση καταλύει μια χρωμογόνο αντίδραση παρουσία του υποστρώματος X-phosphate (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate, 4-toluidine salt, BCIP) και του NBT (Nitro blue tetrazolium chloride). Το ένζυμο καταλύει την αποφωσφορλίωση του BCIP, το οποίο ακολούθως οξειδώνεται με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ερυθροκυανού ιζήματος. Ταυτόχρονα το επίσης χρωμογόνο NBT, ανάγεται αυξάνοντας την συγκέντρωση του ιζήματος, το οποίο συνιστά το σήμα υβριδοποίησης του ανιχνευτή.

Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την επώαση της μεμβράνης σε διάλυμα που περιέχει αποβουτυρωμένο γάλα και στο οποίο στη συνέχεια προστίθεται η στρεπταβιδίνη, ώστε να ευνοηθεί πρόσδεσή της μόνο σε ειδικές θέσεις σύνδεσης. Ακολούθως προστίθενται τα χρωμογόνα υποστρώματα για την ανίχνευση του σήματος.

Μεθοδολογία

1. Η μεμβράνη υβριδοποίησης, έχοντας υποστεί την κατάλληλη επεξεργασία (§ 2.8.2.3), επωάζεται σε διάλυμα Β για 30 min, το οποίο στη συνέχεια απορρίπτεται.
2. Προστίθεται νέο διάλυμα Β εμπλουτισμένο με 5 µl συμπλόκου στρεπταβιδίνης – αλκαλικής

φωσφατάσης ανά 10 ml διαλύματος και επωάζεται για 30 min.

3. Στη συνέχεια πραγματοποιούνται δύο διαδοχικές εκπλύσεις της μεμβράνης σε διάλυμα A για 15 min έκαστη.
4. Ακολουθεί εξισορρόπηση της σε διάλυμα C για 2 min.
5. Για την ανίχνευση του σήματος, η μεμβράνη επικαλύπτεται με πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα C, το οποίο περιέχει 50 μl NBT και 37.5 μl BCIP ανά 10 ml διαλύματος.
6. Τέλος η χρωμογόνος αντίδραση της εμφάνισης διακόπτεται με πολλαπλές πλύσεις της μεμβράνης με ddH₂O.

2.8.3 Διαλογή βιβλιοθήκης

Η διαλογή μιας γονιδιωματικής βιβλιοθήκης επιτρέπει την απομόνωση επιθυμητών αλληλουχιών που έχουν κλωνοποιηθεί. Η διαδικασία συνίσταται στη μεταφορά σε μεμβράνη των βακτηριοφαγικών πλακών που έχουν δημιουργηθεί σε στερεό υπόστρωμα και ακολούθως στον επιλεκτικό εντοπισμό συγκεκριμένων πλακών με χρήση κατάλληλα σημασμένων ανιχνευτών μέσω της τεχνικής της υβριδοποίησης. Τελικά οι μεμονωμένες-θετικές μετά την ανίχνευση πλάκες συλλέγονται (§ 2.5.2.3) και το φαγικό εναιώρημα που προκύπτει μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω για την απομόνωση του επιθυμητού τμήματος της βιβλιοθήκης. Αν δεν είναι εφικτή η συλλογή μεμονωμένης πλάκας μετά τη διαλογή, τότε συλλέγεται ως μακρο-πλάκα, δηλαδή ως ευρύτερη περιοχή που περιλαμβάνει πολλές διαφορετικές πλάκες και ποσότητα του εναιωρήματος επαναεπιστρώνεται για δεύτερη διαλογή (secondary screening). Η τεχνική ακολουθεί τα ίδια στάδια με την ανάλυση κατά Southern (§2.10), όσον αφορά την υβριδοποίηση και την ανίχνευση του σήματος, με μόνη διαφορά τη διαδικασία μεταφοράς σε μεμβράνη.

2.8.3.1 Μεταφορά των πλακών των βακτηριοφάγων λ σε νάilon μεμβράνη.

Η διαδικασία αφορά στη δημιουργία ενός αντιγράφου της κατανομής των φαγικών πλακών μετά από επίστρωση βακτηριοφάγων σε στερεό υπόστρωμα. Τα φαγικά σωματίδια κάθε πλάκας μεταφέρονται μέσω τριχοειδών φαινομένων στη μεμβράνη, η οποία ακολούθως επωάζεται σε αλκαλικό διάλυμα με σκοπό την αποδιάταξη του φαγικού DNA. Τελικά το DNA σταθεροποιείται στη μεμβράνη με ξήρανση και μπορεί να χρησιμοποιηθεί περαιτέρω στη διαδικασία υβριδοποίησης.

Μεθοδολογία

1. Το τρυβλίο της στερεής καλλιέργειας των βακτηριοφαγικών πλακών που πρόκειται να σαρωθεί (§ 2.5.2.1), παραμένει σε θερμοκρασία 4°C για τουλάχιστον 2 h πριν τη χρήση του.

⊗ Σε θερμοκρασία 4°C η υπερκείμενη αгарόζη στερεοποιείται πλήρως και αποφεύγεται η αποκόλληση και επομένως η μεταφορά της στη μεμβράνη.

2. Η μεμβράνη, της οποίας οι διαστάσεις καθορίζονται όσο οι αντίστοιχες του τρυβλίου, τοποθετείται στην επιφάνειά του στερεού μέσου ανά πλευρά της επιφάνειας του πηκτώματος, αφού διαβραχεί διαδοχικά με ddH₂O και με διάλυμα 6X SSC, τελικά τοποθετείται στην επιφάνεια του πηκτώματος.

⊗ Κατά τη τοποθέτησή της, αρχικά η μεμβράνη εφάπτεται στο κέντρο του τρυβλίου και καθώς διαβρέχεται προοδευτικά καλύπτει και την υπόλοιπη περιφέρεια, αποφεύγοντας τη δημιουργία κενών μεταξύ υπερκείμενης αгарόζης και μεμβράνης που παρεμποδίζουν τη μεταφορά του DNA.

3. Η μεμβράνη διατηρείται στην επιφάνεια του τρυβλίου για 2 min έως ότου διαβραχεί πλήρως. Στη διάρκεια αυτή σημειώνεται ο προσανατολισμός της ως προς το τρυβλίο petri δημιουργώντας ασύμμετρους πόρους (τρυπήματα) σε μη αντιδιαμετρικά περιφερειακά σημεία της, μέσω διεύθυνσης αποστειρωμένης βελόνας ανατομίας.

⊗ Ο καθορισμός του προσανατολισμού απαιτείται ώστε να είναι εφικτός ο εντοπισμός των πλακών που αντιστοιχούν στα θετικά σήματα της υβριδοποίησης και κατ'επέκταση η απομόνωσή τους.

4. Ακολούθως μεταφέρεται ανεστραμμένη στην επιφάνεια διαλύματος αποδιάταξης για 2 min.

⊗ Η αναστροφή της μεμβράνης περιορίζει την άμεση επαφή των βακτηριοφάγων με το διάλυμα αποδιάταξης και επομένως διατηρείται η ακεραιότητα του DNA.

5. Στη συνέχεια μεταφέρεται κατά τον ίδιο τρόπο στην επιφάνεια διαλύματος εξουδετέρωσης για 5 min.

6. Ακολουθεί έκπλυση για διάστημα μικρότερο των 30 sec σε διάλυμα που περιέχει 0.2 M Tris-HCl (pH 7.5) και 2X SSC.

7. Τέλος η μεμβράνη ξηραίνεται σε θερμοκρασία 80°C για 2 h και διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου έως ότου χρησιμοποιηθεί.

⊗ Στην περίπτωση που από το ίδιο τρυβλίο πρέπει να δημιουργηθούν δύο αντίγραφα μεμβρανών (replicates) ακολουθείται η ίδια διαδικασία, με τη διαφορά ότι η δεύτερη μεμβράνη διατηρείται στην επιφάνεια του τρυβλίου για 4 min (στάδιο 3).

2.8.4 *In situ* υβριδισμός

Η τεχνική του *in situ* υβριδισμού επιτρέπει τον εντοπισμό αλληλουχιών απευθείας σε κατάλληλα παρασκευασμένα και μορφολογικά διατηρημένα χρωμοσώματα, κύτταρα ή ιστούς. Η διαδικασία περιλαμβάνει τη σήμανση του ανιχνευτή, τον υβριδισμό του *in situ* σε μετουσιωμένα παρασκευάσματα του επιθυμητού υλικού και τελικά την ανίχνευση του σήματος μετά από χρωμογόνο αντίδραση. Στην περίπτωση των χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων η ανίχνευση του σήματος οδηγεί στον τον εντοπισμό της κυτταρογενετικής θέσης της επιθυμητής αλληλουχίας – ανιχνευτή μετά από μικροσκοπική παρατήρηση.

2.8.4.1 Κατασκευή πολυταινικών χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων

Για τις ανάγκες της κυτταρογενετικής ανάλυσης κατασκευάστηκαν παρασκευάσματα πολυταινικών χρωμοσωμάτων. Τα πολυταινικά χρωμοσώματα απομονώνονται από σιελογόνους αδένες προνυμφών 3^{ου} σταδίου (Zambetaki et al. 1999).

Μεθοδολογία

1. Αρχικά πραγματοποιείται η ανατομία για την εξαγωγή των σιελογόνων αδένων σε διάλυμα Ringer στην επιφάνεια μιας αντικειμενοφόρου πλάκας.

⊗ Η επιλογή του ισοτονικού διαλύματος Ringer έγκειται στην δυνατότητά του να εξασφαλίζει την ωσμωτικότητα των κυττάρων ώστε να αποτρέπεται η διάρρηξη των μεμβρανών.

2. Οι αδένες μεταφέρονται σε διάλυμα CH₃COOH 45% για 30 sec, έως ότου αποκτήσουν μια γαλακτόχρωμη χροιά.

3. Το ½ κάθε αδένα μεταφέρεται σε καθαρή καλυπτρίδα, πάνω στην οποία έχει τοποθετηθεί μία σταγόνα (10 μl) μονιμοποιητικού διαλύματος A και επωάζεται για 2-3 min.

4. Μια καθαρή αντικειμενοφόρος πλάκα τοποθετείται πάνω από την καλυπτρίδα και αφού αντιστραφεί (η καλυπτρίδα να βρίσκεται στην πάνω πλευρά) ασκείται ελαφριά πίεση για να σπασούν οι μεμβράνες των κυττάρων και των πυρήνων και να απλωθούν οι χρωμοσωματικοί βραχίονες αποκτώντας επίπεδη μορφολογία.

⊗ Στο σημείο αυτό γίνεται έλεγχος με οπτικό μικροσκόπιο και το στάδιο επαναλαμβάνεται ανάλογα με την αποτελεσματικότητα της κυτταρικής λύσης.

5. Το παρασκεύασμα διατηρείται στους -20°C για 24 h.

6. Η αντικειμενοφόρος εμβαπτίζεται σε υγρό άζωτο και η καλυπτρίδα απομακρύνεται γρήγορα με την άκρη ενός ξυραφιού.

7. Τέλος το παρασκεύασμα αφυδατώνεται σε αιθανόλη 100% για 15 min και διατηρείται σε ξηρό και σκιερό μέρος.

2.8.4.2 Προετοιμασία παρασκευασμάτων πολυταινικών χρωμοσωμάτων για υβριδισμό

Τα παρασκευάσματα είναι απαραίτητο κατεργαστούν κατάλληλα ώστε να είναι αποτελεσματικός ο υβριδισμός. Η διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ενυδάτωσή τους, ακολούθως την επώασή τους σε αλκαλικό διάλυμα ώστε να σταθεροποιηθούν και να αποδιαταχθούν τα χρωμοσώματα.

Μεθοδολογία

1. Αρχικά, προαιρετικά, τα παρασκευάσματα ενυδατώνονται με διαδοχική εμβάπτισή τους για 2 min σε διαλύματα αιθανόλης μειούμενης συγκέντρωσης (90%, 70%, 30%).
2. Στη συνέχεια επωάζονται σε προθερμασμένο στους 65°C διάλυμα 2X SSC για 30 min.
3. Ακολουθεί διπλή διαδοχική έκπλυση με 2X SSC για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Στη συνέχεια αφυδατώνονται σε διαδοχικές πεντάλεπτες εμβαπτίσεις σε σειρά διαλυμάτων αιθανόλης (2 φορές σε 70% και 1 φορά σε 96%) και αφήνονται να στεγνώσουν.
5. Τα παρασκευάσματα μετουσιώνονται με εμβάπτιση για 2min σε πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα 0.07 N NaOH.
6. Τέλος επαναλαμβάνονται τα στάδια 3 και 4.

2.8.4.3 Υβριδισμός σε χρωμοσωμικά παρασκευάσματα

Η διαδικασία της υβριδισμού βασίζεται στην ίδια αρχή που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.8.2.2. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε περιγράφεται από τους Drosorouliou & Scouras 1995.

Μεθοδολογία

1. Ο σημασμένος ανιχνευτής (§ 2.8.1.3) αποδιατάσσεται με βράσιμο για 10 min και μεταφέρεται γρήγορα σε πάγο.
2. Στη συνέχεια τοποθετούνται προσεκτικά στην επιφάνεια του παρασκευάσματος 15 μl αποδιαταγμένου ανιχνευτή (περίπου 10-20 ng) και ακολούθως καλύπτεται με καλυπτρίδα 18 x 18 mm, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.
3. Τα παρασκευάσματα μεταφέρονται σε “υγρό θάλαμο” ώστε να διατηρείται η σχετική τους υγρασία και τοποθετούνται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας για 16-24 ώρες. Η επιλεγμένη θερμοκρασία υβριδισμού είναι 58-62°C. Ως “υγρός θάλαμος” μπορεί να λειτουργήσει οποιοδήποτε πλαστικό ή γυάλινο κουτί που κλείνει αεροστεγώς και η εσωτερική του βάση είναι επίπεδη. Στη βάση εφαρμόζονται φύλλα απορροφητικού χαρτιού εμποτισμένα με 5X SSC, στα οποία προσαρμόζεται κάποιο γυάλινο ή

πλαστικό πλέγμα όπου τοποθετούνται τα παρασκευάσματα.

4. Μετά την ολοκλήρωση του υβριδισμού, η καλυπτρίδα απομακρύνεται και τα παρασκευάσματα εκπλένονται σε προθερμασμένο διάλυμα 2X SSC για 20 min σε θερμοκρασία χαμηλότερη κατά 10°C από αυτή του υβριδισμού και κατόπιν για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου μετά από ανανέωση του διαλύματος, ώστε να απομακτυνθεί η περίσσεια του ανιχνευτή.

2.8.4.4 Ανίχνευση σήματος

Η ανίχνευση γίνεται ανοσοχημικά με χρήση χρωμογόνων αντισωμάτων ειδικών για τη διγοξιγενίνη (Anti-dig antibodies) όπως περιγράφεται από τους Drosorouliou & Scouras 1995. Τα αντισώματα είναι συζευγμένα με το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση, το οποίο όταν επωάζεται παρουσία του χρωμογόνου NBT (Nitroblue Tetrazolium) και του υποστρώματος BCIP (5-bromo- 4-chloro- 3 idolyI-phosphate) καταλύει την αποφωσφορυλίωση του BCIP δημιουργώντας ένα μπλε ίζημα από την ταυτόχρονη κατακρήμνιση χρωμογόνου – υποστρώματος (§ 2.8.2.4). Με τον τρόπο αυτό μπορεί να προσδιοριστεί με μικροσκοπική παρατήρηση η θέση υβριδισμού του ανιχνευτή πάνω στα πολυταινικά χρωμοσώματα και συνεπώς να καθοριστεί η ακριβής κυτταρογενετική του θέση.

Μεθοδολογία

1. Τα παρασκευάσματα εξισορροπούνται με εμβάπτιση για 5 min σε διάλυμα 1, το οποίο στη συνέχεια απορρίπτεται.
2. Ακολούθως επωάζονται σε διάλυμα 2 για 30 min, το οποίο στη συνέχεια απορρίπτεται και εκπλένονται για 1 min σε διάλυμα 1.
3. Στη συνέχεια τοποθετούνται 200 μl διαλύματος αντισωμάτων στην επιφάνεια κάθε παρασκευάσματος και αφού καλυφθούν με καλυπτρίδα 22 x 22 mm, επωάζονται για 45 min.
4. Για την απομάκρυνση του παραπάνω διαλύματος εκπλένονται δύο φορές για 15 min σε διάλυμα 1.
5. Εμβαπτίζονται για 2 min στο διάλυμα 3, ώστε να ανακτήσουν το αλκαλικό pH του διαλύματος που

απαιτείται για τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης.

6. Ακολουθεί προσθήκη 1 ml διαλύματος χρώσης σε κάθε παρασκεύασμα και επώαση των 45 min.

⊗ Σε αυτό το στάδιο η επώαση πραγματοποιείται στο σκοτάδι λόγω της φωτοευαισθησίας που παρουσιάζουν τα χρωμογόνα.

7. Τέλος η αντίδραση εμφάνισης διακόπτεται με έκπλυση των παρασκευασμάτων με απιονισμένο ddH₂O, οπότε και είναι πλέον έτοιμα για μικροσκοπική παρατήρηση.

2.8.5 Φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH)

Ο φθορίζων *in situ* υβριδισμός (Fluorescence *In Situ* Hybridization, FISH), σε σύγκριση με την τεχνική του *in situ* υβριδισμού που περιγράφηκε στην Ενότητα 2.8.4 διαφοροποιείται όσον αφορά τον τρόπο ανίχνευσης του σήματος εφόσον βασίζεται στη χρήση φθορίζοντων μορίων. Τα μόρια αυτά χρησιμοποιούνται είτε άμεσα για τη σήμανση των ανιχνευτών, είτε έμμεσα όντας συζευγμένα με αντισώματα ειδικά για ανιχνευτές σημασμένους με βιοτίνη ή διγοξυγενίνη. Αύξηση της ευαισθησίας της ανίχνευσης μπορεί να παρατηρηθεί, χρησιμοποιώντας περισσότερα αντισώματα ώστε να εξασφαλιστεί η ενίσχυση του σήματος. Η τεχνική είναι αποτελεσματική για τον εντοπισμό της κυτταρογενετικής θέσης μιας αλληλουχίας τόσο σε παρασκευάσματα πολυταινικών (§ 2.8.4.1) όσο και μιτωτικών χρωμοσωμάτων.

2.8.5.1 Κατασκευή μιτωτικών χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων

Τα μιτωτικά χρωμοσώματα απομονώνονται από εγκεφαλικά γάγγλια προνυμφών 3^{ου} σταδίου (Bedo 1980). Η επιλογή αυτή βασίζεται αφενός στο γεγονός ότι στους πυρήνες των κυττάρων του συγκεκριμένου ιστού παρατηρείται διαρκής μιτωτική δραστηριότητα. Αφετέρου δε η μορφολογία του ιστού αυτού, λόγω της σφαιρικής δομής του, καθιστά εύκολη τόσο την αναγνώρισή του κατά τη μικροσκοπική παρατήρηση όσο και την απομόνωσή του.

Μεθοδολογία

1. Αρχικά πραγματοποιείται η ανατομία για την εξαγωγή των εγκεφαλικών γαγγλίων σε διάλυμα Ringer στην επιφάνεια μιας αντικειμενοφόρου πλάκας με κοίλωμα.

⊗ Η επιλογή του ισοτονικού διαλύματος Ringer έγκειται στην δυνατότητά του να εξασφαλίζει την ωσμωτικότητα των κυττάρων ώστε να αποτρέπεται η διάρρηξη των μεμβρανών.

2. Ο ιστός μεταφέρεται σε μια σταγόνα υποτονικού διαλύματος KCl 0.075 M για 20 min.

⊗ Η έκθεση στο υποτονικό διάλυμα εξασφαλίζει τη διάρρηξη των μεμβρανών.

3. Στη συνέχεια ο ιστός μεταφέρεται σε σταγόνα (10 μl) μονιμοποιητικού διαλύματος B και επωάζεται για 20 min.

4. Ακολουθεί μεταφορά του ιστού σε μία σταγόνα CH₃COOH 60% στην επιφάνεια καθαρής αντικειμενοφόρου πλάκας και πραγματοποιούνται 2-3 επαναρροφήσεις με μικροπιπέτα.

⊗ Οι επαναρροφήσεις αποσκοπούν στο θρυμματισμό και τη σύνθλιψη του ιστού. Εναλλακτικά μπορούν να εφαρμοστούν πιέσεις στην επιφάνεια του ιστού με βελόνα μικροανατομίας.

5. Η αντικειμενοφόρος που φέρει τον ιστό τοποθετείται διαδοχικά σε θερμαινόμενη πλάκα θερμοκρασίας 40°C και ακολούθως σε γυάλινη ψυχρή επιφάνεια για 20 sec.

6. Επανάληψη του παραπάνω σταδίου (5) 2-3 φορές.

7. Τα κύτταρα απλώνονται με βελόνα μικροανατομίας σε καθορισμένη περιοχή της αντικειμενοφόρου, ενώ αυτή είναι τοποθετημένη στη θερμαινόμενη πλάκα.

8. Το παρασκεύασμα διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου εξατμιστεί ο διαλύτης.

9. Τέλος το παρασκεύασμα αφυδατώνεται με διαδοχική μεταφορά σε αιθανόλη 70% για 2 min, 80% για 30 sec και 100% για 30 sec και αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20°C.

2.8.5.2 Προετοιμασία παρασκευασμάτων για υβριδισμό FISH

Για να επιτευχθεί ο αποτελεσματικός υβριδισμός τα παρασκευάσματα είναι απαραίτητο

κατεργαστούν κατάλληλα για την απομάκρυνση πρωτεϊνών και τη σταθεροποίηση αλλά και αποδιάταξη των χρωμοσωμάτων. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι διαφοροποιημένη συγκριτικά με την αντίστοιχη του μη φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού. Συγκεκριμένα περιλαμβάνει αρχικά την ενυδάτωση των χρωμοσωμάτων, ακολούθως την επώασή τους σε RNάση για την απομάκρυνση του RNA και τελικά την αποδιάταξή τους με επώαση σε φορμαμίδιο (Sahara et al. 1999).

Μεθοδολογία

1. Τα παρασκευάσματα αφυδατώνονται με εμβάπτισή τους αρχικά σε παγωμένη αιθανόλη 70% για 2 min και ακολούθως με διαδοχικές εμβάπτισεις των 30 sec σε αιθανόλη 80% και 100% αντίστοιχα.
2. Στη συνέχεια προστίθενται 200 μl διαλύματος 2X SSC που περιέχει 100 μg/ml RNase A στην επιφάνεια κάθε παρασκευάσματος και αφού καλυφθούν με καλυπτρίδα 22 × 22 mm, επωάζονται σε θερμοκρασία 37°C για 1 h.
3. Ακολουθεί επώαση των παρασκευασμάτων σε διάλυμα 5X Denhart's σε θερμοκρασία 37°C για 30 min.
4. Τα χρωμοσώματα αποδιατάσσονται τοποθετώντας 100 μl φορμαμίδιου 70% στην επιφάνεια κάθε παρασκευάσματος και αφού καλυφθούν με καλυπτρίδα 24 × 50 mm επωάζονται για 3.5 min σε μεταλλική επιφάνεια εντός κλιβάνου θερμοκρασίας 72°C.
 - ⊗ Το διάλυμα 70% φορμαμίδιου προκύπτει από αραιώση του απιονισμένου φορμαμίδιου (*deionized formamide*) σε 2X SSC.
5. Στη συνέχεια η καλυπτρίδα απομακρύνεται με τίναγμα των παρασκευασμάτων, τα οποία ακολούθως αφυδατώνονται όπως περιγράφεται στο στάδιο 1.
6. Τέλος τα παρασκευάσματα διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου μέχρις ότου εξατμιστεί ο διαλύτης, οπότε και είναι έτοιμα προς υβριδισμό.

2.8.5.3 Υβριδισμός FISH

Η διαδικασία του *in situ* υβριδισμού FISH παρουσιάζει διαφοροποιήσεις συγκριτικά με την

αντίστοιχη μη φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού, όσον αφορά τη σύσταση του διαλύματος υβριδισμού και την επεξεργασία του ανιχνευτή, αλλά και τη θερμοκρασία διεξαγωγής της αντίδρασης. Η τελευταία είναι πολύ μικρότερη λόγω της χρήσης του φορμαμίδιου, το οποίο έχει την ικανότητα να ελαττώνει τη θερμοκρασία τήξης διευκολύνοντας την αποδιάταξη του DNA (Sahara et al. 1999).

Μεθοδολογία

1. Για κάθε παρασκευάσμα αναμιγνύονται 50 ng σημασμένου ανιχνευτή (§ 2.8.1.4) με 2.5 μl ανταγωνιστή (25 μg).
 - ⊗ Ως ανταγωνιστής (*competitor*) χαρακτηρίζεται το σπέρμα σολωμού (*salmon sperm DNA*) καθώς λειτουργεί ως παράγοντας αποτροπής της σύνδεσης του ανιχνευτή σε μη ειδικές θέσεις.
2. Ακολουθεί κατακρήμνιση του μίγματος (όγκου V) όπως περιγράφεται στην Ενότητα 2.3.2¶1-4 και η εξάτμιση του διαλύτη πραγματοποιείται με επώαση σε θερμοκρασία 37°C για 3 min.
3. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 5 μl προθερμασμένου απιονισμένου φορμαμίδιου (*deionized formamide*) και επωάζεται σε υδατόλουτρο σε θερμοκρασία 37°C για τουλάχιστον 30 min.
4. Στη συνέχεια προστίθενται 5 μl προθερμασμένου 20% dextran sulfate και το μίγμα αναδεύεται μηχανικά.
5. Ο ανιχνευτής αποδιατάσσεται με θέρμανση σε θερμοκρασία 90°C για 5 min και ακολούθως διατηρείται στον πάγο για 3 min.
6. Τα συνολικά 10 μl αποδιαταγμένου πλέον ανιχνευτή τοποθετούνται προσεκτικά στην επιφάνεια του παρασκευάσματος, το οποίο ακολούθως καλύπτεται με καλυπτρίδα 24 x 30 mm, ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες. Το περίγραμμα της καλυπτρίδας σφραγίζεται με κόλλα για φωτογραφίες.
7. Τα παρασκευάσματα μεταφέρονται σε “υγρό θάλαμο” ώστε να διατηρείται η σχετική τους υγρασία και τοποθετούνται σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας για 20-24 ώρες. Η επιλεγμένη θερμοκρασία υβριδισμού είναι 37°C. Ο “υγρός θάλαμος” την περίπτωση της FISH, εκτός από τα χαρακτηριστικά που περιγράφηκαν στην Ενότητα

- 2.12.4, πρέπει επιπλέον να έχει σκουρόχρωμα τοιχώματα ώστε να περιορίζεται ή καλύτερα να εμποδίζεται πλήρως η διέλευση του φωτός, ενώ στη βάση του τα φύλλα απορροφητικού χαρτιού είναι εμποτισμένα με 2X SSC.
8. Μετά την ολοκλήρωση του υβριδισμού, η κόλλα του περιγράμματος απομακρύνεται με λαβίδα και ακολούθως η καλυπτρίδα με εμβάπτιση σε διάλυμα φορμαμιδίου 70%.
 9. Στη συνέχεια για την απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή τα παρασκευάσματα εκπλένονται 3 διαδοχικές φορές σε διάλυμα φορμαμιδίου 50% για 5 min σε θερμοκρασία 46°C.
 10. Κατόπιν εκπλένονται 5 διαδοχικές φορές για 10 min σε διάλυμα 2X SSC σε θερμοκρασία 46°C για 5 min.
 11. Ακολουθούν 3 διαδοχικές εκπλύσεις σε διάλυμα 0.1X SSC σε θερμοκρασία 62°C για 2 min.
 12. Η διαδικασία ολοκληρώνεται με την τελική έκπλυση σε διάλυμα 0.1% Tween20 σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 5 min.

2.8.5.4 Ανίχνευση σήματος FISH

Η ανίχνευση του σήματος στην περίπτωση των βιοτυνλιωμένων ανιχνευτών βασίζεται στον ανοσοφθορισμό με χρήση κατάλληλων μορίων υψηλής συγγένειας σύνδεσης με τη βιοτίνη. Στο συγκεκριμένο πρωτόκολλο περιγράφεται η χρήση στρεπταβιδίνης συζευγμένης με τη φθορίζουσα χρωστική Cy3, η οποία εκπέμπει στο κόκκινο φάσμα φωτός (μήκος κύματος 570 nm) υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας. Επιπλέον, για την ενίσχυση του σήματος φθορισμού, χρησιμοποιούνται αντισώματα ενάντια στη στρεπταβιδίνη (Anti-streptavidine) και ακολούθως επαναπρόσδεση του συμπλόκου στρεπταβιδίνης - Cy3. Με τον τρόπο αυτό μπορεί τελικά να προσδιοριστεί με μικροσκοπική παρατήρηση η θέση υβριδισμού του ανιχνευτή πάνω στα πολυταινικά χρωμοσώματα και συνεπώς να καθοριστεί η ακριβής κυτταρογενετική του θέση.

Μεθοδολογία

1. Στην επιφάνεια κάθε παρασκευάσματος τοποθετούνται 450 μl διαλύματος 2.5% BSA και αφού καλυφθούν με καλυπτρίδα 24 x 50 mm, επωάζονται στο σκοτάδι για 20 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 - ⊗ Η επώαση πραγματοποιείται στο σκοτάδι λόγω της φωτοευαισθησίας που παρουσιάζουν τα αντισώματα.
2. Ακολούθως τοποθετούνται 100 μl διαλύματος αντισωμάτων στρεπταβιδίνης - Cy3 στην επιφάνεια κάθε παρασκευάσματος, καλύπτεται με καλυπτρίδα 24 x 50 mm και επωάζεται στο σκοτάδι για 30 min σε θερμοκρασία δωματίου.
 - ⊗ Πριν τη χρήση τους τα αντισώματα φυγοκεντρώνονται σε 13,000 rpm για 2 min.
3. Για την απομάκρυνση των παραπάνω διαλυμάτων το παρασκεύασμα εκπλένεται 3 φορές για 3 min σε διάλυμα 0.1% Tween20 σε θερμοκρασία 37°C.
 - ⊗ Το διάλυμα 0.1% Tween20 προκύπτει από αραιώση του Tween20 σε 4X SSC.
4. Επαναλαμβάνεται το στάδιο 1, με τη διαφορά ότι η επώαση διαρκεί 10 min.
5. Στην επιφάνεια κάθε παρασκευάσματος τοποθετούνται 50 μl διαλύματος αντισωμάτων Anti-streptavidine, καλύπτονται με καλυπτρίδα 24 x 50 mm και επωάζονται στο σκοτάδι για 20 min σε θερμοκρασία 37°C.
6. Επανάληψη των εκπλύσεων του σταδίου 3.
7. Επαναλαμβάνεται το στάδιο 1, με τη διαφορά ότι η επώαση διαρκεί 10 min.
8. Ακολουθεί η τοποθέτηση στην επιφάνεια κάθε παρασκευάσματος 50 μl διαλύματος αντισωμάτων στρεπταβιδίνης - Cy3, καλύπτονται με καλυπτρίδα 24 x 50 mm και επωάζονται στο σκοτάδι για 20 min σε θερμοκρασία 37°C.
9. Τέλος επαναλαμβάνονται οι εκπλύσεις του σταδίου 3.

2.8.5.5 Χρώση χρωμοσωμάτων με DAPI

Η χρώση των χρωμοσωμάτων ώστε να εξασφαλιστεί η δυνατότητα ταυτόχρονης παρατήρησής τους με τον φθορίζων ανιχνευτή επιτυγχάνεται με χρήση της φθορίζουσας χρωστικής DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole).

Πρόκειται για μια χρωστική που δεσμεύεται μη ειδικά στη μικρή αύλακα του DNA και υπό την επίδραση υπεριώδους ακτινοβολίας διεγείρεται και εκπέμπει στο μπλε φάσμα φωτός (μήκος κύματος 460 nm). Επιπλέον, για να αποτραπεί η γρήγορη εξασθένιση της εκπομπής φθορισμού των χρωστικών, τα παρασκευάσματα κατεργάζονται με Antifade (Sahara et al. 1999).

Μεθοδολογία

1. Τα παρασκευάσματα εμβαπτίζονται σε διάλυμα 1% Triton X-100 για 5 min σε θερμοκρασία 25°C.
 - ⌘ Το διάλυμα 1% Triton X-100 προκύπτει από αραιώση του Triton X-100 σε 2X SSC.
2. Για τη χρώση των χρωμοσωμάτων τα παρασκευάσματα εμβαπτίζονται σε διάλυμα 1% Triton X-100 στο οποίο έχει προστεθεί DAPI τελικής συγκέντρωσης 0.5 µg / ml, για 15 min σε θερμοκρασία 25°C.
3. Στη συνέχεια εκπλένονται σε διάλυμα 1% Kodak PhotoFlo για 4 min σε θερμοκρασία 25°C.
4. Ακολουθεί σύντομη έκπλυση σε διάλυμα 1% Kodak PhotoFlo για 10 sec σε θερμοκρασία δωματίου.
5. Τα παρασκευάσματα αποστραγγίζονται από την περίσσεια του διαλύματος, χωρίς ωστόσο να στεγνώσουν πλήρως.
6. Στην επιφάνεια κάθε παρασκευάσματος τοποθετούνται 30 µl διαλύματος Antifade και καλύπτονται με καλυπτρίδα 24 x 50 mm ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες.
7. Για την απομάκρυνση της περισσειας του διαλύματος ασκείται ελαφριά πίεση και το περίγραμμα της καλυπτρίδας σφραγίζεται με βερνίκι νυχιών.
8. Τέλος τα παρασκευάσματα διατηρούνται προς αποθήκευση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία 4-8°C.

2.9 *In silico* ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ DNA ΚΑΙ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

Η *in silico* ανάλυση νουκλεϊκών και πρωτεϊνικών αλληλουχιών αφορά στη χρήση συνδυασμένων προγραμμάτων βιοστατιστικής και

βιο-πληροφορικής με σκοπό το χειρισμό των πληροφοριών τους.

2.9.1 Ανάκτηση δεδομένων αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών από τη βάση δεδομένων GenBank

Η βάση δεδομένων GenBank αποτελεί μια συλλογή όλων των ελεύθερα διαθέσιμων DNA και πρωτεϊνικών ακολουθιών και υποστηρίζεται από το NCBI (National Center for Biotechnology Information). Οι εγγραφές που περιέχονται συνοδεύονται και από περαιτέρω πληροφορίες και σχόλια που αφορούν την ακολουθία. Η ανάκτηση δεδομένων γίνεται μέσω του συστήματος Entrez στο δικτυακό τόπο www.ncbi.nlm.nih.gov, χρησιμοποιώντας είτε το όνομα, είτε το σύμβολο ή τον αριθμό πρόσβασης της αλληλουχίας, ή ακόμα επιλεγμένες λέξεις μιας καταχώρησης.

Συνδυαστικά και συμπληρωματικά με τη GenBank, για την αναζήτηση πληροφοριών χαρτογράφησης, λειτουργίας προϊόντων γονιδίων κ.ά, χρησιμοποιήθηκε και η FlyBase, η οποία αποτελεί μια εξειδικευμένη βάση δεδομένων του γονιδιώματος της *Drosophila*.

2.9.2 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης DNA

Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης αλληλουχιών DNA πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen Inc και βασίστηκε στη μέθοδο Sanger. Για τον καθορισμό των αλληλουχιών κλωνοποιημένων ενθεμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι διαθέσιμοι εμπορικά εκκινητές του αντίστοιχου πλασμιδίου, ενώ στις διαδικασίες βαδίσματος (walking) σχεδιάστηκαν εκκινητές κατά περίπτωση. Ο έλεγχος της αξιοπιστίας των ακολουθιών για τυχών «λάθη» κατά την αλληλούχηση πραγματοποιήθηκε με βάση το χρωματογράφημά τους στο πρόγραμμα Chromas και μέσω σύγκρισης αλληλουχιών για εύρεση ομοιοτήτων στο πρόγραμμα BLAST.

2.9.3 Εύρεση ομοιοτήτων αλληλουχιών

Η σύγκριση των ακολουθιών πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1990). Ανάλογα με τη φύση της αλληλουχίας που πρόκειται να συγκριθεί (νουκλεοτιδική ή αμινοξική), η αναζήτηση πραγματοποιείται σε βάσεις δεδομένων νουκλεοτιδικών (BLASTN) ή πρωτεϊνικών (BLASTP) ακολουθιών της GenBank αντίστοιχα. Επιπλέον ανάλογα με τις ανάγκες κάθε αναζήτησης παρέχονται και διάφορες παραλλαγές του προγράμματος όπως το BLASTX, το οποίο μεταφράζει αυτόματα στα 6 πλαίσια ανάγνωσης μια αλληλουχία DNA και ακολούθως τη συγκρίνει με την πρωτεϊνική βάση δεδομένων. Η ακολουθία επερώτησης (query) στοιχίζεται με τις υποκείμενες ακολουθίες (subject) της βάσης δεδομένων, υπολογίζεται το ποσοστό αντιστοιχίας και εκτιμάται η στατιστική σημαντικότητα κάθε στοίχισης του καταλόγου αποτελεσμάτων (hit list) με τη μορφή της τιμής *E* (*E*-value). Η τιμή *E* εκφράζει την πιθανότητα η στοίχιση να είναι τυχαία και θεωρείται αποδεκτή όταν είναι σχεδόν μηδενική, θέτωντας ως όριο αμφισβήτησης τιμές μεγαλύτερες του 10^{-4} .

2.9.4 Στοίχιση αλληλουχιών DNA ή πρωτεϊνών και κατασκευή φυλογενετικών δέντρων

Η στοίχιση των νουκλεοτιδικών και των αμινοξικών αλληλουχιών είναι εφικτή μέσω του αλγόριθμου ClustalW που παρέχεται δικτυακά στη διεύθυνση www.ebi.ac.uk/clustalw.

Εναλλακτικά οι αλληλουχίες μπορούν να τροφοδοτηθούν στο πρόγραμμα MEGA 3.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) για τη δημιουργία ομοπαραθέσεων μέσω του αλγόριθμου ClustalW που παρέχεται από το ίδιο (Kumar et al. 2004). Ακολούθως τα αρχεία ομοπαραθέσεων χρησιμοποιούνται για την κατασκευή φυλογενετικών δέντρων βάσει των παρατηρούμενων πολυμορφισμών.

Η κατασκευή των φυλογενετικών δέντρων βασίστηκε στη μέθοδο των αποστάσεων χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) και N-J (Neighbor-Joining). Η μέθοδος απόστασης υπολογίζει ανά ζεύγη αποστάσεις, οι

οποίες καθορίζονται από την τοπολογία του δένδρου. Η αξιοπιστία των εσωτερικών κόμβων των δένδρων αξιολογείται σύμφωνα με τη μη παραμετρική δοκιμασία bootstrap (Kumar et al. 2004, Felsenstein 1985). Στο πλαίσιο αυτής της στατιστικής επαναδειγματοληπτικής δοκιμής υπολογίζεται η συχνότητα *P* εμφάνισης των εσωτερικών κόμβων μετά από ανάλυση τυχαίων σειρών ψευδο-δειγμάτων. Ο αριθμός που προκύπτει είναι ενδεικτικός της αναλογίας των αντιγράφων bootstrap που υποστηρίζουν τη μονοφυλετική προέλευση του κλάδου και θεωρείται αξιόπιστος όταν παίρνει τιμές μεγαλύτερες από 90%.

Για αναλύσεις που απαιτείται σύγκριση συχνοτήτων χρησιμοποιείται το πακέτο προγραμμάτων PHYLIP 3.6C (PHYLogeny Inference Package) (Felsenstein 1994). Οι παρατηρούμενες τιμές για τους εξεταζόμενους χαρακτήρες ενός συνόλου τροφοδοτούνται στο πρόγραμμα SEQBOOT μέσω του οποίου πραγματοποιείται η μη παραμετρική δοκιμασία bootstrap και ακολούθως στα πολλαπλά αρχεία των ψευδο-επαναλήψεων που προκύπτουν υπολογίζονται οι γενετικές αποστάσεις με χρήση του προγράμματος GENDIST. Στη συνέχεια τα στοιχεία των πινάκων απόστασης υποβάλλονται στο πρόγραμμα NEIGHBOR για την παραγωγή δέντρων χρησιμοποιώντας τους αλγόριθμους UPGMA ή N-J. Επειδή στο προκύπτον αρχείο ο αριθμός των δέντρων είναι ίσος με τα αντίγραφα δεδομένων από τη δοκιμασία bootstrap, ακολουθεί η εφαρμογή του προγράμματος CONSENSE ώστε να παραχθεί το συναινετικό δέντρο της ανάλυσης. Τελικά η απεικόνιση των φυλογενετικών δέντρων γίνεται με το λογισμικό TreeView32 (Page 1996).

2.9.5 Επεξεργασία νουκλεοτιδικών και αμινοξικών αλληλουχιών DNA με το πρόγραμμα Omiga 2.0

Η χρήση του προγράμματος μοριακής ανάλυσης Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd) επιτρέπει την ανάλυση μεμονωμένων ή πολλαπλών αλληλουχιών νουκλεοτιδικής ή

αμινοξικής φύσης (Kramer 2001). Το λογισμικό του προγράμματος παρέχει τη δυνατότητα επεξεργασίας των αλληλουχιών *in silico* παρέχοντας ταυτόχρονα και εργαλεία οπτικοποίησης μέσω γραφικών αναπαραστάσεων και πρόσβαση σε δικτυακές συνδέσεις (BLAST, GenBank). Ανάμεσα στα είδη των αναλύσεων που μπορούν να υποβληθούν συγκαταλέγονται ο εντοπισμός θέσεων αναγνώρισης περιοριστικών ενδονουκλεασών, η δημιουργία συμπληρωματικών ή/και ανάστροφων αλυσίδων, η πρόβλεψη αναγνωστικών πλαισίων και η περαιτέρω μετάφραση της αλληλουχίας. Επίσης μέσω του προγράμματος μπορούν να δημιουργηθούν πίνακες – σημείων (dot-plot) δύο αλληλουχιών, ενώ επιτρέπεται και η σύνθεση – συναρμολόγηση αλληλουχιών. Επιπλέον είναι δυνατός ο εντοπισμός μοτίβων που αφορούν αλληλουχίες υποκινητών, παλίνδρομες ή επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, ενώ είναι εφικτός και ο σχεδιασμός εκκινητών για αντιδράσεις PCR και προσδιορισμού πρωτοδιάταξης (sequencing).

2.9.6 Υπολογισμός συχνότητας χρήσης κωδικονίων

Ο υπολογισμός της συχνότητας χρήσης κωδικονίων (codon usage) πραγματοποιήθηκε μέσω του προγράμματος GCUA που παρέχεται διαδικτυακά (Fuhrmann 2004). Στηρίζεται στη σύγκριση μιας υποβληθείσας νουκλεοτιδικής αλληλουχίας με τις συχνότητες χρήσης των κωδικονίων του γονιδιώματος του ίδιου ή διαφορετικού οργανισμού. Οι συχνότητες αυτές ανακτώνται από τη βάση δεδομένων Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). Η υποβολή των αλληλουχιών στο πρόγραμμα GCUA εμφανίζει μέγιστο κατώφλι 9999 νουκλεοτίδια. Για την ανάλυση του συνόλου των κωδικονίων που ξεπερνούσε το παραπάνω νουκλεοτιδικό όριο, πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές υποβολές διακριτών αλληλουχιών. Οι συχνότητες που προσδιορίστηκαν, ακολούθως τροφοδοτήθηκαν στο Excel μέσω του οποίου υπολογίστηκε τελικά για

κάθε αμινοξύ ο μέσος όρος εμφάνισης κάθε συνώνυμου κωδικονίου.

2.9.7 Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας

Η ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology) αποτελεί έναν εύχρηστο τρόπο πρόγνωσης της λειτουργίας των γονιδίων μέσω της μεταφοράς λειτουργικών πληροφοριών από καλά χαρακτηρισμένα γονιδιώματα σε άλλα ελλιπώς μελετημένα. Οι τρεις οντολογίες της GO, δηλαδή τα 3 κορυφαία δομημένα δίκτυα – η βιολογική διαδικασία, η μοριακή λειτουργία και η κυτταρική σύσταση – αποτελούνται από καλά επισημειωμένες ομάδες ορθόλογων γονιδίων διαθέσιμων στις Βάσεις Δεδομένων. Καθένα από αυτά τα δίκτυα αντιμετωπίζονται στη GO ανεξάρτητα, χωρίς να καθορίζεται καμιά οντολογική σχέση μεταξύ τους. Η ιδιότητα αυτή διασφαλίζει τη μοναδικότητα ενός χαρακτηριστικού που αποδίδεται σε ένα γονίδιο, με αποτέλεσμα να αποκλείεται η ύπαρξη ενός αντίστοιχου όρου που αντιπροσωπεύει πανομοιότυπες ιδιότητες σε κάποια από τις υπόλοιπες οντολογίες. Ωστόσο εντός της ίδιας οντολογίας είναι δυνατό να παρατηρηθεί πολλαπλή γονεϊκότητα κατά την ιεράρχηση των όρων.

Στα πλαίσια της διεθνούς συνεργασίας GO (The Gene Ontology Consortium 2000) αναπτύχθηκε η εφαρμογή AMIGO που επιτρέπει στους χρήστες την αναζήτηση, ταξινόμηση και ανάλυση των επιθυμητών δεδομένων, παρέχοντας παράλληλα τη δυνατότητα οπτικοποίησης και ανάκτησής τους (Carbon et al. 2009). Εκτός από τις πληροφορίες των γονιδιακών προϊόντων και των επισημειώσεων τους, είναι επίσης διαθέσιμα και μια σειρά από εργαλεία προς διευκόλυνση του χρήστη, μεταξύ των οποίων το GO Slimmer.

Η λειτουργία του GO Slimmer έγκειται στη χαρτογράφηση συγκεκριμένων επισημειώσεων για νέες αλληλουχίες, στις κατηγορίες των όρων υψηλής στάθμης (high-level terms) για την ταξινόμησή τους. Οι αλληλουχίες υποβάλλονται σύμφωνα με τα σύμβολα των γονιδίων που αντιπροσωπεύουν σε ειδικές κατηγορίες-όρους ιεράρχησης “GO slim” που καθορίζονται

εξατομικευμένα ή επιλέγονται από τις προκαθορισμένες επιλογές του προγράμματος, παρέχοντας μια εποπτική εικόνα της κατανομής των προς επισημείωση γονιδιακών προϊόντων.

2.9.8 Κατάθεση ακολουθιών DNA σε βάση δεδομένων

Οι εγγραφές των ακολουθιών DNA σε κάποια από τις διαθέσιμες δημόσιες βάσεις δεδομένων (DDBJ/EMBL/GenBank) δίνουν τη δυνατότητα γρήγορης εξάπλωσης των δεδομένων, διασφαλίζοντας τη μέγιστη χρηστικότητα τους για την επιστημονική κοινότητα. Η κατάθεση των ακολουθιών πραγματοποιήθηκε στη βάση δεδομένων GenBank, με χρήση του προγράμματος Sequin. Μέσω του προγράμματος μια ήδη υπάρχουσα εγγραφή είναι δυνατόν να επεξεργαστεί ή/και να επανακατατεθεί είτε με επέκταση (ή αντικατάσταση) της ακολουθίας, είτε με την παροχή πληροφοριών που αφορούν επιπρόσθετα χαρακτηριστικά της. Η κατάθεση της νουκλεοτιδικής ακολουθίας συνοδεύεται και από την πρωτεϊνική ακολουθία που κωδικοποιεί.

2.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.1.1 Εκτροφή δάκου

Τροφή ενηλίκων (1 kgr): Υδρολυμένη μαγιά (200 gr), Ζάχαρη (800 gr), Κρόκος αυγού, σκόνη (60 gr), Στρεπτομυκίνη (0.5 gr).

Μείγμα Παραφίνης (1 kgr): Παραφίνη σημείου τήξης 52-54°C (0.85 kg), Παραφίνη σημείου τήξης 46-48°C (0.085 kg), Φυσικό κερι μέλισσας (0.065 kg).

Τροφή προνυμφών (1 kgr): H₂O (550 ml), Μαγιά μπύρας (75 gr), Υδρολυμένη σόγια (30 gr), Σορβικό κάλιο (0.5 gr), Νιπαγίνη (2 gr), Ζάχαρη (20 gr), Ελαιόλαδο (20 ml), Tween 80 (7.5 ml), HCl 2N (30 ml), Κυτταρίνη σκόνη (275 gr).

2.1.2 Ανάπτυξη βακτηρίων

✓ Θρεπτικά μέσα

Στερεό LB (LB-agar) (1 L): Βακτοτρυπτόνη (10 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), Άγαρ (15 gr), NaCl (5 gr) pH 7. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq.in.).

Υγρό LB (1 L): Βακτοτρυπτόνη (10 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NaCl (5 gr) pH 7. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq.in.).

Υγρό SOC (1 L): Βακτοτρυπτόνη (20 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NaCl (0.5 gr), 250 mM KCl (10 ml) pH 7.2. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο και στη συνέχεια προστίθεται 2 M MgCl₂ (5 ml) και 1M Γλυκόζη (20 ml).

NZY υπερκείμενη αραρόζη (1 L): NaCl (5 gr), MgSO₄*7 H₂O (2 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NZ αμίνη (10 gr), Αραρόζη (0.7% w/v), pH 7.5. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

NZY Άγαρ (1 L): NaCl (5 gr), MgSO₄*7 H₂O (2 gr), Εκχύλισμα ζύμης (5 gr), NZ αμίνη (10 gr), Άγαρ (15 gr), pH 7.5. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο.

✓ Στελέχη *E. coli*

DH5α: *supE44, ΔlacU169(φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1.*

XL1-Blue MRA: *Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac.*

XL1-Blue MRF⁺ Kan: *Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F⁺ proAB lacI^q ZΔM15 Tn5 (Kan^r)].*

XL0LR: *Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F⁺ proAB, lacI^q ZΔM15, Tn10 (Tetr)] Su-(nonsuppressing) λr (lambda resistant).*

✓ Αντιβιοτικά

kanamycin (25 mg/ml): 25 mg kanamycin σε 1 ml dH₂O. Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.

ampicillin (100 mg/ml): 100 mg ampicillin σε 1 ml dH₂O. Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.

2.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Διάλυμα I: 50 mM γλυκόζη, 25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8.

Διάλυμα II: 0.2 N NaOH, 1% SDS

Διάλυμα III: 5M CH₃COOK (60 ml), CH₃COOH (11.5 ml), dH₂O (28.5 ml)

Διάλυμα TE: 10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA.

2.3 ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

2.3.5 Δημιουργία διαδοχικών ελλείψεων με χρήση εξωνουκλεάσης

Ρυθμιστικό διάλυμα Exo III (10X): 660mM Tris-HCl (pH 8.0), 6.6mM MgCl₂.

Ρυθμιστικό διάλυμα S1 (S1 buffer) (5X): 200 mM sodium acetate (pH 4.5 at 25°C), 1.5 M NaCl, 10 mM ZnSO₄.

Διάλυμα αντίδρασης S1 νουκλεάσης (για 20 δείγματα συλλογής): 32 μl S1 Buffer (5X), 0.5 μl S1 Nuclease (50u), 127.5 μl dH₂O.

Ρυθμιστικό διάλυμα τερματισμού S1 (S1 stop buffer): 0.3M Tris-base Pure, 0.05M EDTA.

Ρυθμιστικό διάλυμα Klenow (Klenow buffer) (1X): 20mM Tris-HCl pH8.0, 100mM MgCl₂.

Μείγμα Klenow (Klenow mix): 30 μl Klenow buffer 1X, 5u Klenow DNA polymerase

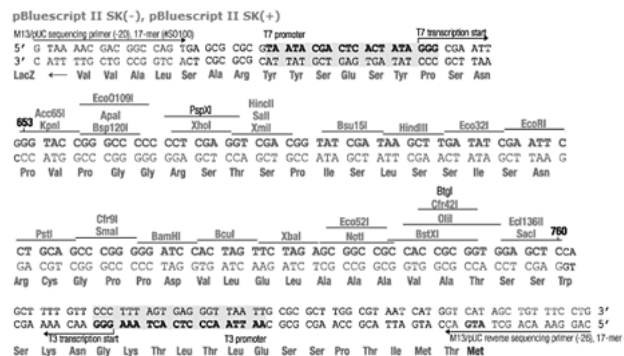
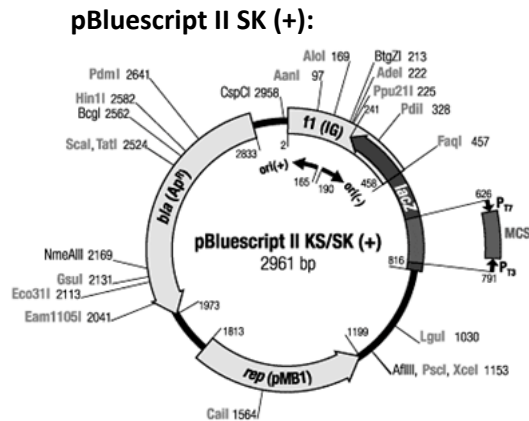
2.3.7 Ηλεκτροφόρηση

Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5X TBE (1 L): Tris-base (54 gr), Βορικό οξύ (27.5 gr), 0.5 M EDTA (20 ml).

Βρωμιούχο αιθίδιο (EthBr) (20 mg/ml): 0.2 gr EthBr σε 10 ml dH₂O. Έντονη ανάδευση. Διατήρηση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου.

Διάλυμα χρωστικής 6X: 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανού της ξυλόλης, 15% φικόλλη σε dH₂O.

Ladder: SM0331 GeneRuler DNA Ladder Mix, Fermentas



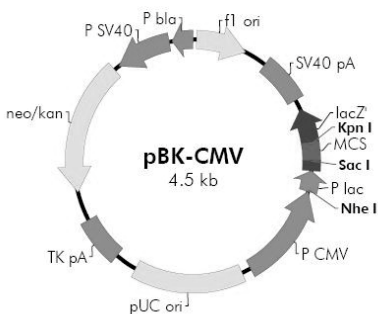
2.4 ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΗ ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ

X-Gal (20 mg/ml): 400 mg X-Gal σε 10 ml DMF (dimethylformamide). Διατήρηση στο σκοτάδι σε θερμοκρασία -20°C.

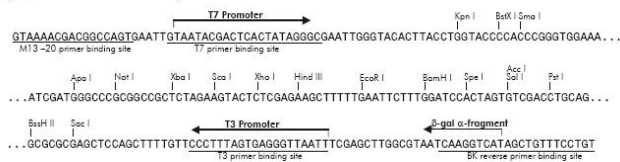
IPTG 1M: 238 mg IPTG σε 1 ml dH₂O. Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.

✓ Πλασμιδιακοί φορείς

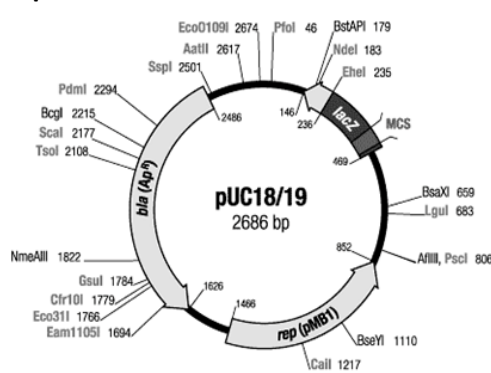
pBK-CMV:



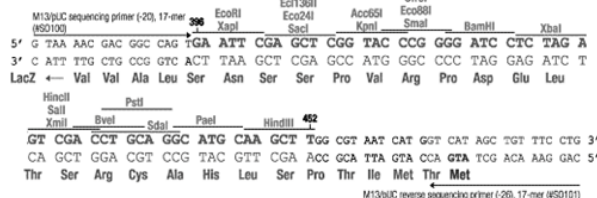
pBK-CMV Multiple Cloning Site Region (sequence shown 952-1196)



pUC19:

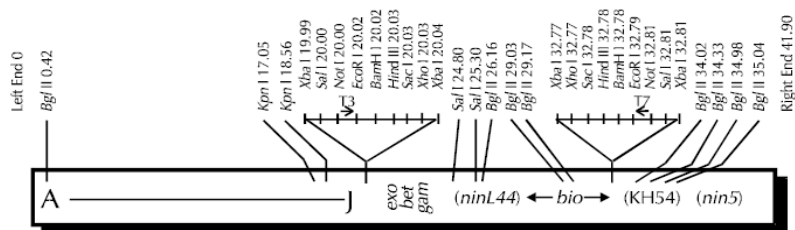


Multiple cloning sites of pUC19



2.5 & 2.6 ΒΑΚΤΗΡΙΟΦΑΓΟΣ λ DASH – λ ZAP

Τα θρεπτικά μέσα και τα βακτηριακά στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν περιγράφονται στην Ενότητα §2.1.2 των Υλικών. Στην εικόνα παρουσιάζεται ο χάρτης του πολυσυνδέτη του βακτηριοφάγου λ DASH.



Διάλυμα SM: 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.2% $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.01% ζελατίνη.

2.8 ΥΒΡΙΔΟΠΟΙΗΣΗ

2.8.2 Υβριδοποίηση κατά Southern

Διάλυμα 20X SSC: 0.3 M Κιτρικό νάτριο pH 7, 3 M NaCl

Διάλυμα Αποδιάταξης: 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl

Διάλυμα Εξουδετέρωσης: 0.5 M Tris-HCl pH 7.5, 1.5 M NaCl.

Διάλυμα Υβριδοποίησης: 6X SSC, 5X Denhardt's, 0.5% SDS.

Διάλυμα 50X Denhardt's: 1% φικόλλη, 1% PVP, 1% BSA. Αποστείρωση με χρήση πορώδους φίλτρου (0.45 μm). Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.

Διάλυμα Πλύσης A: 2X SSC, 0.1% SDS.

Διάλυμα Πλύσης B: 0.2X SSC, 0.1% SDS.

Διάλυμα A: 100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl.

Διάλυμα B: Διάλυμα A, 1% Διάλυμα Blocking.

Διάλυμα Blocking (10%): Αποβουτυρωμένο γάλα σε σκόνη (10 gr) σε 100 ml Διαλύματος A.

Διάλυμα C: 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$

2.8.4 *In situ* υβριδισμός

Διάλυμα Ringer (pH 6.8) (1 L): 6.5 gr NaCl, 0.14 gr KCl, 0.2 gr Na_2CO_3 , 0.12 gr $NaH_2PO_4^-$.

Μονιμοποιητικό διάλυμα A: γαλακτικό οξύ/ dH_2O / οξικό οξύ σε αναλογία 2/ 3/ 4.5 (v/v/v).

Διάλυμα 20X SSC: βλέπε Υλικά §2.10.

Διάλυμα υβριδισμού dig: 5X SSC, 1% blocking reagent, 0,1% Sarcosyl, 0,02% SDS.

Διάλυμα 1: 100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl

Διάλυμα 2: 0,5 % Blocking Reagent (Boehringer Mannheim) σε Διάλυμα 1.

Διάλυμα 3: 100 mM Tris- HCl (pH 9.5), 100 mM NaCl, 50 mM $MgCl_2$.

Διάλυμα αντισωμάτων: 1/500 αραιώση (150 mU / ml) των αντισωμάτων ενάντια στη διγοξυγενίνη (Roche) σε Διάλυμα 2.

Διάλυμα χρώσης: 50 mg / ml X-Phosphate (BCIP) (35 μl), 100 mg/ml NBT (35 μl) σε 10 ml Διαλύματος 3.

2.8.5 Φθορίζων *in situ* υβριδισμός (FISH)

Διάλυμα Ringer (pH 6.8): βλέπε Υλικά §2.12.

Μονιμοποιητικό διάλυμα B: αιθανόλη/ χλωροφόρμιο/ οξικό οξύ σε αναλογία 6/ 3/ 1 (v/v/v).

Διάλυμα 20X SSC: βλέπε Υλικά §2.12.

Διάλυμα TE: βλέπε Υλικά §2.2.

Dextran sulfate: 20 % Dextran sulfate σε 4X SSC. Επώαση με ανάδευση σε θερμοκρασία 70°C. Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.

Διάλυμα 50X Denhardt's: βλέπε Υλικά §2.12.

Διάλυμα 70% φορμαμίδιου: 70% απιονισμένο φορμαμίδιο (deionized formamide) σε 2X SSC.

Διάλυμα BSA: 2.5% w/v BSA σε 4x SSC. Επώαση σε θερμοκρασία 4°C για 5 h και αποστείρωση με χρήση πορώδους φίλτρου (0.45 μm). Διατήρηση σε θερμοκρασία -20°C.



3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΔΑΚΟΥ

Το απλοειδές ποσό του γενετικού υλικού που περιέχεται ανά κύτταρο ενός οργανισμού συνιστά ουσιαστικά το μέγεθος του γονιδιώματός του. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε στην παρούσα μελέτη για τον προσδιορισμό του μεγέθους του γονιδιώματος του δάκου, βασίστηκε στην ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Η μέθοδος αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε με επιτυχία σε διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, εξασφαλίζοντας γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα (Wilhelm et al. 2003, Gao & Scott 2006), καθιστώντας την ως επικρατέστερη επιλογή στη συγκεκριμένη ανάλυση. Βασίζεται στην απόλυτη ποσοτικοποίηση ενός γονιδίου που εντοπίζεται ως μοναδικό αντίγραφο σε ένα γονιδίωμα και προαπαιτεί την υψηλή καθαρότητα του DNA που πρόκειται να ενισχυθεί ώστε να αποφθεχθούν υπερ- ή υπο- εκτιμήσεις.

3.1.1 Ποσοτικός προσδιορισμός των προϊόντων της Real-time PCR

Στον απόλυτο ποσοτικό προσδιορισμό, η συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου σε ένα δείγμα ελέγχου, εκφράζεται ως απόλυτη τιμή του αριθμού αντιγράφων της. Η τιμή αυτή καθορίζεται μέσω της πρότυπης καμπύλης βαθμονόμησης, για την κατασκευή της οποίας χρησιμοποιούνται πρότυπα δείγματα, που περιέχουν καθορισμένο αριθμό αντιγράφων της αλληλουχίας – στόχου. Οι ποσοτικές μεταβλητές συνοψίστηκαν με χρήση μέσων όρων και τυπικών αποκλίσεων (standard deviation), που υπολογίστηκαν αυτόματα από το λογισμικό του συστήματος.

Για την ανάπτυξη της συγκεκριμένης μεθοδολογίας με σκοπό τον προσδιορισμό του μεγέθους του γονιδιώματος, απαραίτητη προϋπόθεση αποτελεί το προς ενίσχυση γονίδιο να υπάρχει ως μοναδικό αντίγραφο (single copy gene) στο γονιδίωμα. Στην παρούσα προσέγγιση χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές Boace2F και Boace2R σχεδιασμένοι από τους Kakani et al. 2008 για την ενίσχυση αλληλουχίας 315 bp του εξονίου 2

της ακετυλοχολινεστεράσης (Πίνακας 3.1.1), που είναι γνωστό ότι στο γονιδίωμα του δάκου υπάρχει ως μοναδικό αντίγραφο (Vontas et al. 2002).

Ακολούθως ελέγχθηκε η λειτουργικότητα των εκκινητών πραγματοποιώντας συμβατική PCR με μήτρα συγκεκριμένης ποσότητας γονιδιωματικού DNA (~10 ng). Το προϊόν της αντίδρασης ελέγχθηκε ως προς το επιθυμητό μέγεθος και την ανυπαρξία διμερών των εκκινητών και/ή άλλων μη ειδικών μορίων με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Στη συνέχεια το προϊόν της PCR απομονώθηκε από το πήκτωμα αγαρόζης και κλωνοποιήθηκε σε φορέα pBS-SK(+) με T-άκρα. Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε για κάθε κλώνο, ταυτοποιήθηκε με κατάτμηση με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *EcoRI* και *XhoI*. Η κλωνοποιημένη πλέον αλληλουχία – στόχος αποτέλεσε τη μήτρα για την ενίσχυση των πρότυπων δειγμάτων στη Real-time PCR.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκαν παράλληλες αντιδράσεις Real-time PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές Boace2F και Boace2R στα ακόλουθα δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων: πρώτον, των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε διαδοχικές αραιώσεις (60pg, 3pg, 150fg, 15fg /20μl αντίδρασης) και δεύτερον του γονιδιωματικού DNA του *B. oleae* (60 ng / 20μl αντίδρασης), όπως αυτές καθορίστηκαν με ποσοτικό φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό (Εικ. 3.1-1α). Για κάθε μια από τις δεδομένες ποσότητες των δειγμάτων του πλασμιδιακού κλώνου που χρησιμοποιήθηκαν (πρότυπα δείγματα), ορίστηκε στο πρόγραμμα της Real-time ο αριθμός αντιγράφων τους. Τα πλασμιδιακά αντίγραφα κάθε δείγματος υπολογίστηκαν σύμφωνα με το μοριακό βάρος του κλώνου (όπως αυτό καθορίζεται από το μέγεθός του σε bp) και την ποσότητά του (σε gr) που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση ως μήτρα (Whelan et al. 2003) σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{DNA(αντίγραφα)} = \frac{6.022 \times 10^{23} (\text{αντίγραφα/mol}) \times \text{ποσότηταDNA (gr)}}{\text{μέγεθοςDNA(bp)} \times 660 (\text{gr/bp/mol})}$$

Ακολούθως, οι αριθμοί που υπολογίστηκαν εκφραζόμενοι λογαριθμικά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης σε συνάρτηση με τις τιμές Ct, που καταγράφηκαν με βάση την ανίχνευση του σήματος φθορισμού (Εικ. 3.1-1γ). Για κάθε σετ

αντιδράσεων (πρότυπα και άγνωστο) το άγνωστο δείγμα ελέγχου ελέγχθηκε ταυτόχρονα εις τριπλούν. Επιπλέον πραγματοποιήθηκαν πέντε ανεξάρτητα σετ αντιδράσεων, για να συνεκτιμηθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Σε κάθε σετ συμπεριλήφθηκε και αρνητικό δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιώντας για μήτρα ddH₂O αντί DNA, ώστε να είναι εφικτή η παρακολούθηση της ευαισθησίας της και της αποφυγής επιμολύνσεων. Μετά το πέρας των αντιδράσεων, τα προϊόντα της ενίσχυσης αναλύθηκαν μέσω της καμπύλης τήξης, για τον έλεγχο σχηματισμού διμερών των εκκινητών και/ή άλλων μη ειδικών μορίων. Η εμφάνιση κορυφών στην ίδια θερμοκρασία τήξης, συνιστά την ενίσχυση απόλυτα ειδικών προϊόντων (Εικ. 3.1-1β).

3.1.2 Υπολογισμός μεγέθους γονιδιώματος

Ο όρος μέγεθος γονιδιώματος (Γ) αναφέρεται στο συνολικό αριθμό των βάσεων που περιέχεται σε ένα σύνολο απλοειδών χρωμοσωμάτων και υπολογίζεται με τη σχέση (Wilhelm et al. 2003):

$$\Gamma = \frac{C \times N_A}{M_{Bp}}$$

Όπου N_A είναι ο αριθμός Avogadro ($6.022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), M_{Bp} ο μέσος όρος μάζας ενός ζεύγους βάσεων (660 gr/bp/mol) και C η συνολική ποσότητα του DNA.

Η τιμή C εκφράζεται από το λόγο της μάζας του γονιδιωματικού DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα στην αντίδραση και προσδιορίστηκε

φασματοφωτομετρικά, προς τον αριθμό των αντιγράφων (N) της αλληλουχίας – στόχου που καθορίστηκε από την Real-timePCR σύμφωνα με τη σχέση: $C = m \times N^{-1}$.

Ο αριθμός των αντιγράφων (N) της αλληλουχίας – στόχου για το άγνωστο δείγμα ενίσχυσης του γονιδιωματικού DNA υπολογίστηκε αυτόματα από το λογισμικό της Real-time. Συγκεκριμένα τα αντίγραφα προσδιορίστηκαν με βάση την εξίσωση της συνάρτησης της καμπύλης των πρότυπων δειγμάτων, για την τιμή C_t του γονιδιωματικού DNA που καθορίστηκε από την αντίδραση (Πίνακας 3.1-1).

Τελικά το μέγεθος του γονιδιώματος (Γ) του δάκου προσδιορίστηκε ως 322 Mb (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 310-334 Mb). Η εκτίμηση αυτή αντιπροσωπεύει το μέσο όρο των τιμών που υπολογίστηκαν από τις επαναλήψεις των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν και το διάστημα εμπιστοσύνης (Confidence Interval, CI) για πιθανότητα 95%.

3.1.3 Έλεγχος πειραματικής διαδικασίας

Η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, εφαρμόστηκε επίσης για τον προσδιορισμό του μεγέθους του γονιδιώματος της *D. melanogaster*. Η προσπάθεια αυτή είχε σαν στόχο να επιβεβαιώσει την ορθότητα της πειραματικής διαδικασίας, εφόσον το μέγεθος του γονιδιώματός της είναι ήδη γνωστό. Ως αλληλουχία στόχος επιλέχθηκε τμήμα του γονιδίου *g6pd* (glucose-6 phosphate

Πίνακας 3.1-1 Δεδομένα ανάλυσης Real-time PCR κατά τον προσδιορισμό του μεγέθους των απλοειδών γονιδιωμάτων του *B. oleae* και της *D. melanogaster*.

	Συγκέντρωση DNA ^α	Εξίσωση πρότυπης καμπύλης	Αριθμός αντιγράφων ^β	Γ (bp)
<i>B. oleae</i>	50	$y = -3.546 \times \log(x) + 38.40$	1.435e+005	3.24×10^8
<i>D. melanogaster</i>	75	$y = -3.610 \times \log(x) + 41.71$	3.462e+005	1.92×10^8

^α Συγκέντρωση μήτρας γονιδιωματικού DNA (ng) των άγνωστων δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση.

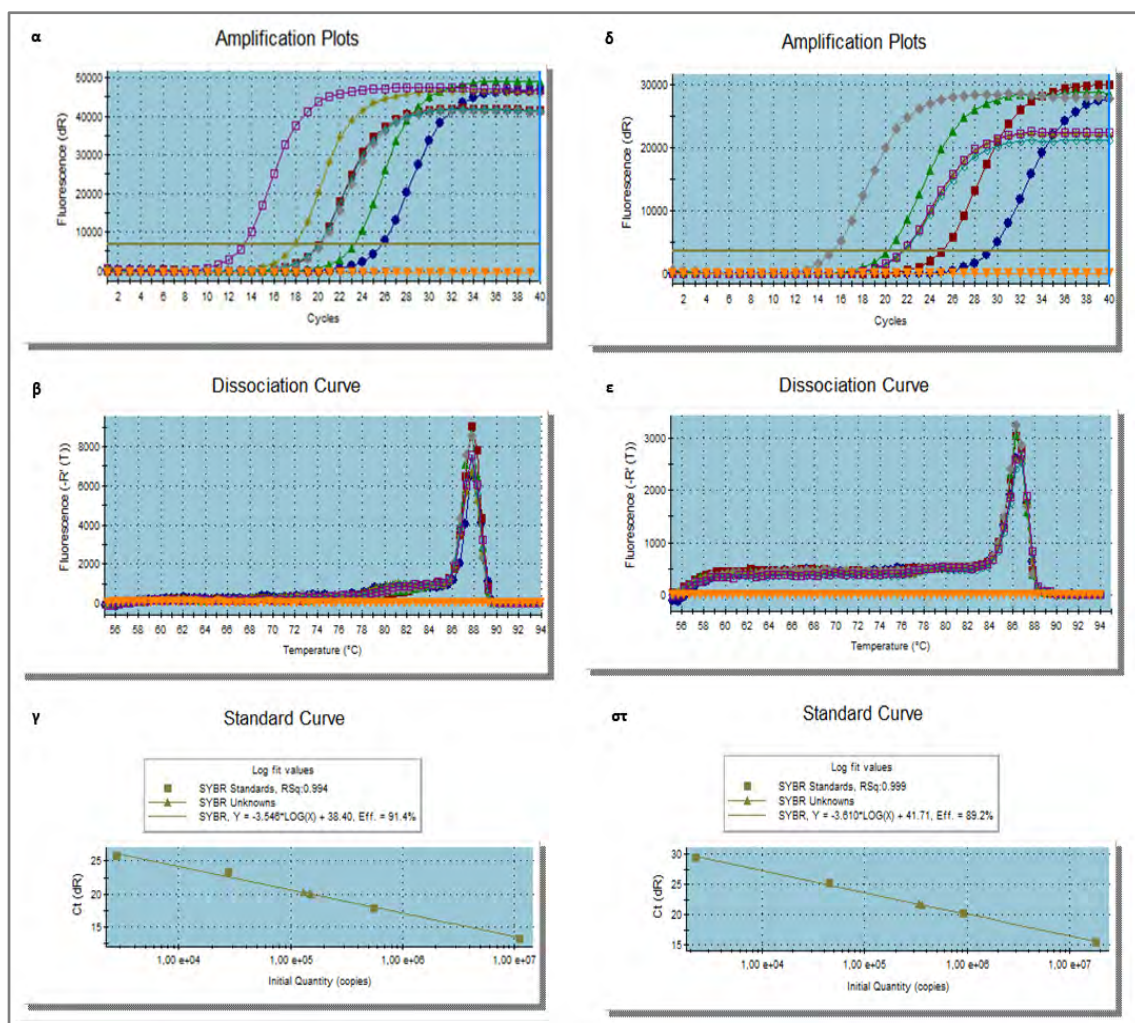
^β Μέσος όρος του αριθμού αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου, που υπολογίστηκε αυτόματα βάσει της πρότυπης καμπύλης.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

dehydrogenase) που υπάρχει ως μοναδικό αντίγραφο (Ganguly et al. 1985). Η αλληλουχία ανακτήθηκε από τη GenBank και σχεδιάστηκαν εκκινήτες για την ενίσχυση τμήματος μεγέθους 147 bp (Παράρτημα: Πίνακας 6.1-1). Για τη δημιουργία πρότυπων δειγμάτων και την ενίσχυση των διαδοχικών αραιώσεών τους (56 pg, 2.8 pg, 140 fg, 7 fg / 20 μl αντίδρασης) ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφηκε στις ενότητες 3.1.1-2 (Εικ. 3.1.1.δ-στ).

Τελικά από τον καθορισμό του αριθμού

αντιγράφων της αλληλουχίας – στόχου, προσδιορίστηκε το μέγεθος του γονιδιώματος της *D. melanogaster* ως 194 Mb (95% διάστημα εμπιστοσύνης: 183-205 Mb) (Πίνακας 3.1-1). Η τιμή αυτή δεν αποκλίνει σημαντικά από εκείνη που έχει ήδη υπολογιστεί για το έντομο αυτό (~180 Mb, Adams et al. 2000). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την αξιοπιστία της εκτίμησης του μεγέθους του γονιδιώματος του *B. oleae*, που καθορίστηκε σύμφωνα με τη διαδικασία της ποσοτικοποίησης ενός γονιδίου μονού αντιγράφου.



Εικόνα 3.1-1 Σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων της Real-time PCR. Τα διαγράμματα α-γ αντιστοιχούν στον *B. oleae* και τα δ-στ στην *D. melanogaster*. **α, δ)** Καμπύλες ενίσχυσης (amplification plots) της αλληλουχίας στόχου του που εκφράζουν την αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού (fluorescence) σε συνάρτηση με τους κύκλους της αντίδρασης (cycles). Οι τρεις εφαπτόμενες καμπύλες αντιστοιχούν στα άγνωστα δείγματα γονιδιωματικού DNA, τα οποία ελέγχθηκαν εις τριπλούν. Οι υπόλοιπες καμπύλες αντιστοιχούν στις αραιώσεις των πρότυπων δειγμάτων των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων. Το δείγμα αρνητικού ελέγχου (NTC) αντιστοιχεί στην οριζόντια καμπύλη που δεν ξεπερνά το οριακό επίπεδο (threshold). Το επίπεδο threshold αντιπροσωπεύεται από την παράλληλη με τον άξονα x γραμμή, ενώ τα σημεία τομής του με τις καμπύλες ενίσχυσης αντιστοιχούν στις τιμές Ct. **β, ε)** Καμπύλες τήξης (dissociation curve) των προϊόντων ενίσχυσης. Η εμφάνιση μοναδικών κορυφών στην ίδια θερμοκρασία τήξης συνιστά την ενίσχυση απόλυτα ειδικών προϊόντων. Η απουσία κορυφής στο δείγμα NTC υποδηλώνει την έλλειψη επιμολύνσεων της αντίδρασης. **γ, στ)** Πρότυπη καμπύλη (standard curve) του αριθμού αντιγράφων των πρότυπων δειγμάτων εκφρασμένων λογαριθμικά σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές Ct.

3.2 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΩΝ ΕΤΙΚΕΤΩΝ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ

Η παρούσα προσέγγιση αποτελεί την πρώτη προσπάθεια προσδιορισμού μεταγράφων του τρανσκριπτόματος του δάκου και συνεπώς της ταυτοποίησης δυνητικών γονιδίων με ικανότητα έκφρασης. Βασίστηκε στην ανάλυση ετικετών εκφραζόμενων αλληλουχιών (Expressed Sequence Tags, ESTs) Συγκεκριμένα απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν 195 ESTs που προέρχονται από cDNA βιβλιοθήκη αρσενικών ενήλικων ατόμων του δάκου. Παρά τον περιορισμένο αριθμό τους, ήταν δυνατή η ταξινόμησή τους σε κατηγορίες γονιδιακής οντολογίας και η εξαγωγή πληροφοριών που αφορούν την έκφρασή τους.

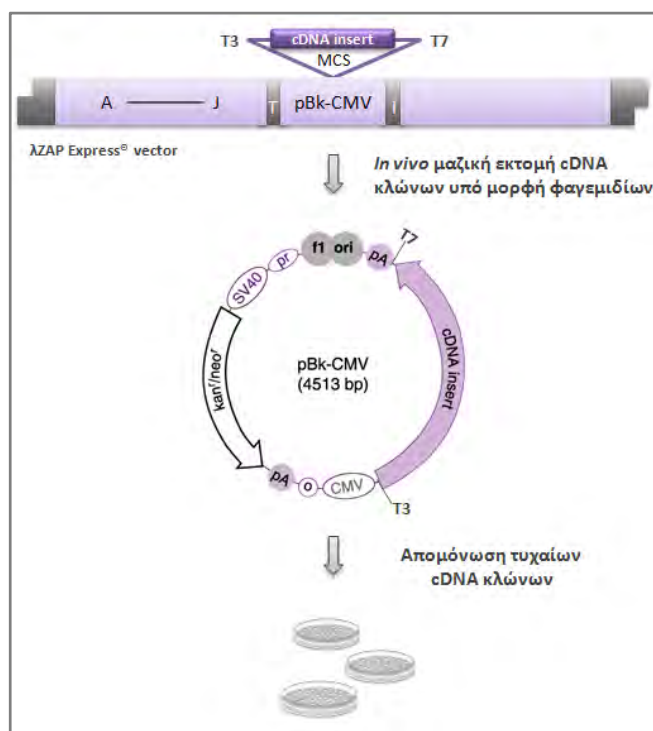
Επιπλέον, τα ESTs λειτούργησαν ως εφαλτήριο για την ανάπτυξη μιας σειράς εφαρμογών και εργαλείων, που μπορούν να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες σχετικά με τη μοριακή, εξελικτική και συγκριτική βιολογία του οργανισμού. Ανάμεσα στις εφαρμογές που αναπτύχθηκαν περιλαμβάνονται ο υπολογισμός της συχνότητας επιλογής των κωδικονίων κατά τη μεταγραφική δραστηριότητα και περαιτέρω ο έλεγχος ύπαρξης συντηρημένου προφίλ. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν στον εμπλουτισμό του κυτταρογενετικού χάρτη του εντόμου μέσω του *in situ* υβριδισμού 35 EST κλώνων, καθώς και στη δημιουργία χάρτη συνταινιακότητας μέσω της σύγκρισης των θέσεων χαρτογράφησης των ESTs του *B. oleae* και των ομόλογών τους γονιδίων της *D. melanogaster*, καθορίζοντας ταυτόχρονα και την ομολογία μεταξύ των χρωμοσωμάτων των δύο οργανισμών. Τέλος σχεδιάστηκαν EPIC δείκτες, οι οποίοι ελέγχθηκαν για την αποτελεσματικότητά τους μέσω δια-ειδικής ενίσχυσης σε 12 είδη της οικογένειας Tephritidae.

Εικόνα 3.2-1 Σχηματική συνοπτική απεικόνιση της διαδικασίας απομόνωσης κλώνων cDNA βιβλιοθήκης υπό μορφή φαγεμιδίων.

3.2.1 Απομόνωση φαγεμιδίων cDNA αλληλουχιών

Η cDNA βιβλιοθήκη του δάκου ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου της Δρ. Κομητοπούλου του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Για την κατασκευή της είχε χρησιμοποιηθεί το λ-ZAPExpress®II cDNA Synthesis kit της εταιρίας Stratagene, ενώ το mRNA προέρχονταν από ιστούς αρσενικού ενήλικου ατόμου (Lagos et al. 2005). Το ολικό mRNA λειτούργησε ως εκμαγείο για τη σύνθεση μορίων cDNA, με δράση του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφή (RT). Τα άκρα που τελικά δημιουργήθηκαν κατέστησαν δυνατή την προσανατολισμένη κλωνοποίηση των μορίων cDNA της βιβλιοθήκης σε φορείς λZAP, στις θέσεις αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού *EcoRI* – *XhoI*.

Για την απομόνωση των κλωνοποιημένων μεταγραφόμενων τμημάτων ακολουθήθηκε η προσέγγιση της *in vivo* μαζικής εκτομής (mass excision) των ενθεμάτων από το φάγο λ-ZAP υπό τη μορφή φαγεμιδίων (§ 2.6.3). Ποσότητα των κυττάρων ξενιστών XL0LR που χρησιμοποιήθηκαν για τον σχηματισμό των δίκλωνων φαγεμιδίων επιστρώθηκε σε εκλεκτικό στερεό θρεπτικό μέσο



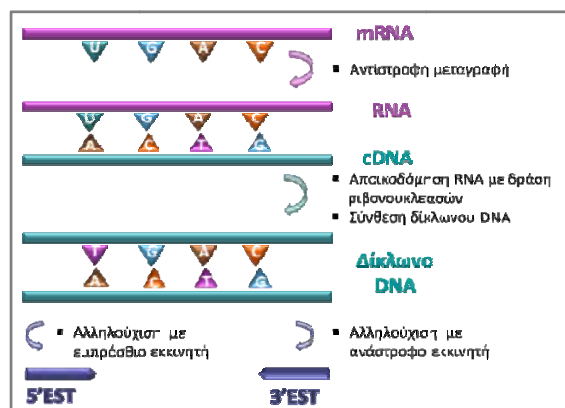
(καναμυκίνης), δημιουργώντας μια συλλογή κλώνων τυχαίων τμημάτων συμπληρωματικού DNA (cDNA) (Εικ. 3.2-1). Η ταυτοποίηση των φαγεμιδίων που προέκυψαν αρχικά πραγματοποιήθηκε βάσει του ελέγχου α-συμπληρωματικότητας.

Ακολούθησε απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, κατάτμησή του με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *EcoRI* – *XhoI* και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, ώστε να επιβεβαιωθεί η ύπαρξη ενθέματος και να προσδιοριστεί το μέγεθός του. Η επιλογή των ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν βασίστηκε στην ύπαρξη των θέσεων αναγνώρισής τους εκατέρωθεν του ενθέματος κατά την κατασκευή της βιβλιοθήκης, που επιτρέπει την εξαγωγή των κλωνοποιημένων τμημάτων. Η παραπάνω διαδικασία απέφερε με τυχαία δειγματοληψία συνολικά 256 κλώνους φαγεμιδίων, στους οποίους ανιχνεύθηκε επιτυχώς η ύπαρξη ενθέματος και επιλέχθηκαν προς ανάλυση της κλωνοποιημένης cDNA αλληλουχίας.

3.2.2 Προσδιορισμός πρωτοδιάταξης και ανάλυση των ESTs

Η πρωτοδιάταξη κάθε κλώνου του μεταγραφόμενου DNA, από το σύνολο των 256 που απομονώθηκαν από τη cDNA βιβλιοθήκη, προσδιορίστηκε με αλληλούχηση μονής αντίδρασης (single-pass sequencing) του 5'-άκρου, χρησιμοποιώντας τον εκκινητή T3 του φαγεμιδίου pBK-CMV. Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες μέσου μήκους 800 bp που προέκυψαν, αποτελούν τις 5'-ετικέτες μεταγραφόμενων αλληλουχιών (5'-ESTs) του γονιδιώματος του δάκου (Εικ. 3.2-2).

Οι αλληλουχίες των 5'-ESTs αναλύθηκαν περαιτέρω *in silico* με χρήση του προγράμματος μοριακής ανάλυσης Omega 2.0, με σκοπό την απομάκρυνση των αλληλουχιών που αντιστοιχούν στον φορέα και την ανίχνευση ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων (ORFs). Ο εντοπισμός των ORFs σε αλληλουχίες που προέρχονται από δυνητικά μεταγραφόμενες περιοχές του γονιδιώματος, επιβεβαιώνει την προέλευσή τους και συνεπώς τις καθιστά δείκτες γονιδίων που

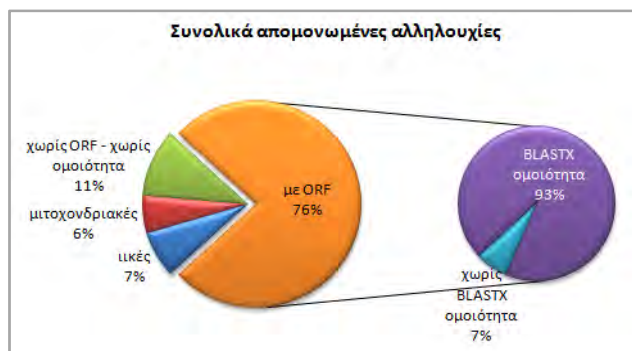


Εικόνα 3.2-2 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας δημιουργίας των ESTs.

κωδικοποιούν συγκεκριμένες πρωτεΐνες. Λόγω της προσανατολισμένης κλωνοποίησης των τμημάτων cDNA στην κατασκευή της βιβλιοθήκης, η αναζήτηση των ORFs πραγματοποιήθηκε με μετάφραση των τριών πλαισίων εμπρόσθιας κατεύθυνσης (forward sense translation). Το ORF με το μεγαλύτερο μέγεθος κατά μήκος της αλληλουχίας επιλέχθηκε ώστε να συγκριθεί σε δημόσιες βάσεις δεδομένων (GenBank) προς αναζήτηση ομοιοτήτων με ήδη γνωστές κατατεθειμένες αμινοξικές ακολουθίες. Η αναζήτηση πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος BLASTX, το οποίο μετέφρασε αυτόματα τις νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που του τροφοδοτήθηκαν. Όριο της στατιστικής σημαντικότητας ορίστηκε η τιμή *E-value* που δεν ξεπερνά τις 10^{-4} μονάδες. Προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων της παραπάνω αναζήτησης, πραγματοποιήθηκε και σύγκριση με χρήση του προγράμματος BLASTP, στο οποίο τροφοδοτήθηκαν αμινοξικές πλέον αλληλουχίες, όπως αυτές καθορίστηκαν από τη μετάφραση του επιλεγμένου ORF από το πρόγραμμα Omega 2.0. Τα αποτελέσματα και στις δύο περιπτώσεις δεν παρουσίασαν καμία αξιολογη διαφορά.

Συγκεκριμένα, από το σύνολο των 256 κλώνων που απομονώθηκαν από τη cDNA βιβλιοθήκη και προσδιορίστηκε η πρωτοδιάταξή τους, μόνο το 76% που αντιστοιχεί σε 195 κλώνους χαρακτηρίστηκαν ως ESTs σύμφωνα με την ύπαρξη ανοιχτού αναγνωστικού πλαισίου. Το 93% των κλώνων αυτών, δηλαδή 182 αλληλουχίες, εμφάνισε στατιστικά σημαντική ομοιότητα με καταχωρήσεις

χαρακτηρισμένων ή υποθετικών πρωτεϊνών (characterized or predicted proteins) της *D. melanogaster*. Το υπόλοιπο 7% των δυνητικών μεταγράφων είτε δεν εμφάνισε αποτελέσματα στις αναζητήσεις μέσω του BLAST, είτε τα παρατηρούμενα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά ($E > 10^{-4}$) και συνεπώς η λειτουργία τους παραμένει αδιευκρίνιστη και αμφίβολη (Εικ. 3.2-3).



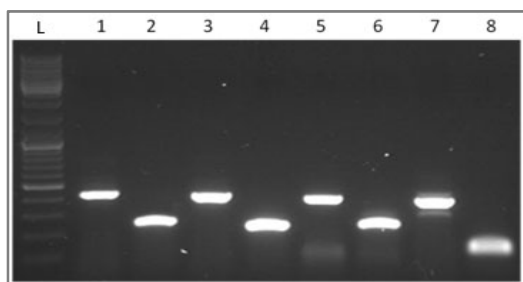
Εικόνα 3.2-3 Αποτελέσματα αναζήτησης ομοιοτήτων των απομονωμένων αλληλουχιών μέσω του προγράμματος BLASTX. Οι αναλογίες αντιπροσωπεύουν το ποσοστό των απομονωμένων αλληλουχιών για τις οποίες έχουν καθοριστεί ή μη ανοιχτά αναγνωστικά πλαίσια (ORFs) και αποτελέσματα ομοιότητας.

Όσον αφορά τις υπόλοιπες 61 αλληλουχίες (24%) που δεν συμπεριλαμβάνονται στο σύνολο των ESTs και εξαιρέθηκαν από τις περαιτέρω αναλύσεις, κατανέμονται σε 3 κατηγορίες βάσει των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους. Η πρώτη περιλαμβάνει 27 κλώνους (11%) για τους οποίους δεν ανιχνεύτηκε ORF και η σύγκρισή τους στη GenBank δεν οδήγησε στον καθορισμό κάποιας ομοιότητας. Ωστόσο δεν αποκλείεται λόγω της απομόνωσής τους από cDNA βιβλιοθήκη να αποτελούν ESTs που αντιπροσωπεύουν 5' ή 3' αμετάφραστες περιοχές (UTRs) ή άλλες μεταγραφόμενες αλληλουχίες, όπως σχολιάζεται εκτενέστερα στη Συζήτηση. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει 15 αλληλουχίες μιτοχονδριακής προέλευσης (6%) με ομοιότητα κυρίως προς τις υπομονάδες της κυτοχρωμικής οξειδάσης (cytochrome oxidase subunits), ενώ οι υπόλοιποι 19 κλώνοι (7%) της τρίτης κατηγορίας αντιστοιχούν σε αλληλουχίες που κωδικοποιούν την πολυπρωτεΐνη του ιού sacbrood των μελισσών (Εικ.3.2-3), παρατήρηση που επίσης σχολιάζεται στη Συζήτηση.

Οι αλληλουχίες των 195 ESTs λόγω της επεξεργασίας τους χαρακτηρίστηκαν ως υψηλής ποιότητας και έχουν κατατεθεί στη νουκλεοτιδική βάση δεδομένων GenBank με τους κωδικούς πρόσβασης HQ383926 - HQ384120 συνοδευόμενες από τις διαθέσιμες πληροφορίες που αφορούν επιπρόσθετα χαρακτηριστικά τους. Συγκεντρωτικά όλα τα παραπάνω δεδομένα παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2-4 του Παραρτήματος.

3.2.3 Ανάλυση με PCR αντίστροφης μεταγραφής των απομονωμένων ESTs

Τα ESTs που απομονώθηκαν από τη cDNA βιβλιοθήκη του δάκου αντιπροσωπεύουν εξ ορισμού δυνητικά μετάγραφα. Για τον έλεγχο και συνεπώς την επιβεβαίωση της δυνατότητας έκφρασής τους πραγματοποιήθηκε αντίδραση αντίστροφης μεταγραφής PCR (RT-PCR) σε ολικό RNA ατόμων δάκου. Για τον σκοπό της ανάλυσης, σχεδιάστηκαν εκκινητές που να ενισχύουν τμήματα των διαθέσιμων αλληλουχιών των ESTs. Επιλέχθηκαν πέντε δυνητικά ESTs, που χαρακτηρίστηκαν επιτυχώς κατά την αναζήτηση ομοιότητας με καταχωρημένα γονιδιακά προϊόντα της βάσης δεδομένων και περιγράφονται στον Πίνακα 5.2-4 του Παραρτήματος με τους κωδικούς BoEST_86, BoEST_95, BoEST_175, BoEST_100 και BoEST_320. Επιπλέον σχεδιάστηκαν δύο ζεύγη εκκινητών για τους κλώνους 87 και 92, οι οποίοι εξαιρέθηκαν από την προηγούμενη ανάλυση λόγω της απουσίας χαρακτηριστικού ORF και ομοιότητας κατά τη σύγκριση με το πρόγραμμα BLASTX. Ως θετικό δείγμα ελέγχου της διαδικασίας χρησιμοποιήθηκε το προϊόν ενίσχυσης τμήματος της αλληλουχίας του εξονίου 10 (Boace10) του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης (Kakani et al. 2008). Οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι θερμοκρασίες υβριδοποίησής τους κατά την αντίδραση, καθώς και το αναμενόμενο μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης παραθέτονται στον Πίνακα 5.2-1 του Παραρτήματος.



Εικόνα 3.2-4 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων RT-PCR επτά δυναμικών μεταγράφων του *B. oleae*: 1: BoEST_86, 2: BoEST_95, 3: BoEST_175, 4: BoEST_100, 5: BoEST_320, 6: BoEST_87, 7: BoEST_92, 8: Boace10[L: Μάρτυρας μοριακού βάρους (SM0331)].

Κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων των συνολικά 7 αντιδράσεων RT-PCR, παρατηρήθηκαν έντονες ζώνες ενίσχυσης επιθυμητού μεγέθους για κάθε ζεύγος εκκινητών, επιβεβαιώνοντας ότι τα εξεταζόμενα ESTs αντιπροσωπεύουν εκφραζόμενες κωδικές αλληλουχίες (Εικ. 3.2-4). Εντούτοις, αξιοσημείωτες είναι οι ζώνες ενίσχυσης που επετεύχθησαν και για τους κλώνους 87 και 92, οι οποίοι όπως προαναφέρθηκε, δεν εμφάνισαν σημαντική ομοιότητα στη βάση δεδομένων ούτε εντοπίστηκε ORF, για λόγους που σχολιάζονται στη Συζήτηση.

3.2.4 Ανάλυση Γονιδιακής Οντολογίας

Η απεικόνιση των λειτουργικών ιδιοτήτων των γονιδίων που αντιπροσωπεύουν τα 195 ESTs αλλά και των πρωτεϊνικών προϊόντων που κωδικοποιούν, πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τους όρους ιεράρχησης της Βάσης Δεδομένων της Γονιδιακής Οντολογίας (Gene Ontology, GO) επιτρέποντας την επισημείωσή τους σύμφωνα με τη μοριακή τους λειτουργία, τη βιολογική διαδικασία που επιτελούν και το κυτταρικό συστατικό που εντοπίζονται.

Ακολουθήθηκε μια ημιαυτόνομη διαδικασία επισημείωσης (annotation) των γονιδίων που αντιπροσωπεύουν τα ESTs για την απόδοση των λειτουργικών χαρακτηριστικών τους, σύμφωνα με τις πληροφορίες που αντιπροσωπεύουν τα γονίδια της βάσης δεδομένων της *Drosophila* (FlyBase) και έχουν ενσωματωθεί στη GO (Deng et al. 2006). Στο

πλαίσιο αυτό, αρχικά συγκεντρώθηκαν οι κωδικοί (σύμβολα) των γονιδίων της *D. melanogaster* που αντιστοιχούν βάσει της ομοιότητας BLASTX στα προς ανάλυση ESTs του δάκου και τροφοδοτήθηκαν στο λογισμικό GO Slimmer Tool του προγράμματος AmiGO (Carbon et al. 2009). Η επιλογή του προγράμματος στηρίχθηκε στη δυνατότητα παροχής υψηλής στάθμης οντολογίας (top level ontology), περιορίζοντας την ταξινόμηση (classification) σε γενικές κατηγορίες – όρους ιεράρχησης. Η υπολογιστική διαδικασία περαιτέρω αφορούσε την ταξινόμηση των δεδομένων στις τρεις οντολογίες σύμφωνα με τους όρους (terms) GO slim που ορίστηκαν (Παράρτημα: Πίνακας 6.2-2), επιλέγοντας στο σύστημα τις καταχωρήσεις της FlyBase προς σύγκριση. Ακολούθως τα αποτελέσματα συγκεντρώθηκαν και απεικονίστηκε γραφικά στο Excel η εκατοστιαία κατανομή τους ανά κατηγορία.

Από τις 182 αλληλουχίες που εμφάνισαν στατιστικά σημαντική ομοιότητα με πρωτεΐνες της *D. melanogaster* κατά την αναζήτηση της βάσης δεδομένων, επισημειώθηκαν με επιτυχία οι 159, που αντιστοιχούν σε ποσοστό 87% (Εικ. 3.2-5). Το υπόλοιπο 13% αφορά 23 αλληλουχίες που απορρίφθηκαν αυτόματα από το πρόγραμμα κατά τη διαδικασία επισημείωσης, καθώς οι καταχωρήσεις των αντίστοιχων γονιδίων της *D. melanogaster* δεν συνοδεύονταν από πληροφορίες βιολογικών στοιχείων και λειτουργιών.

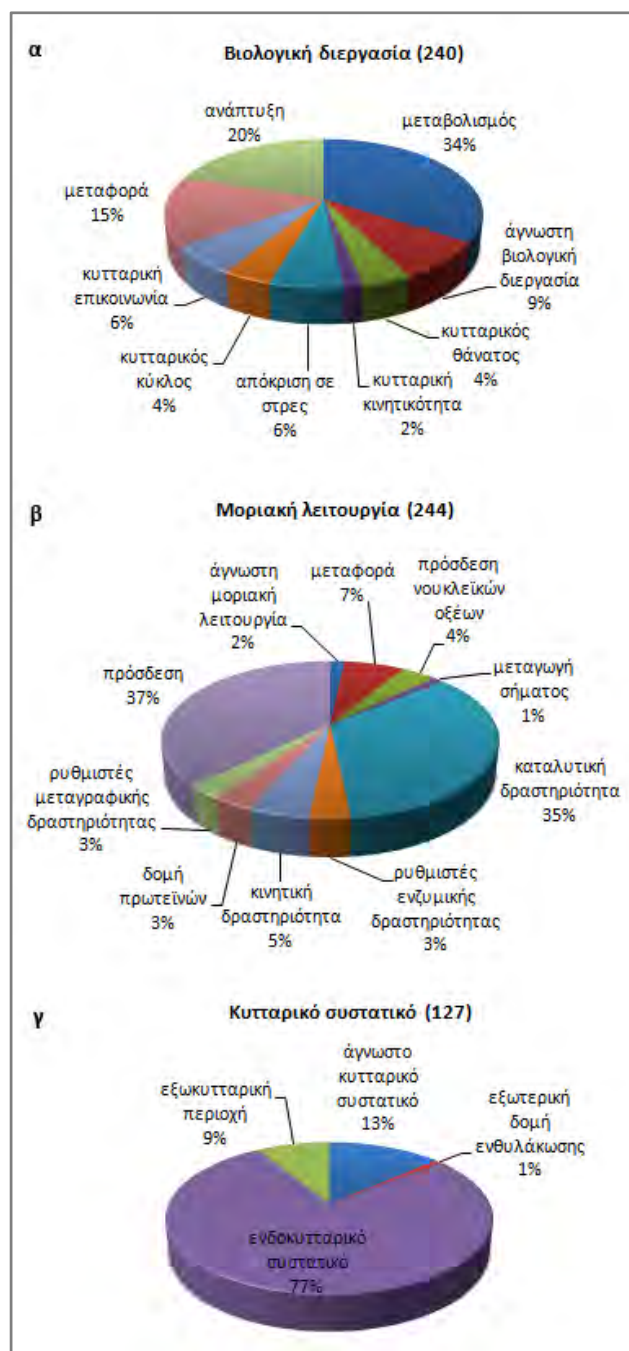


Εικόνα 3.2-5 Ποσοστιαία αναλογία των ESTs που επισημειώθηκαν με όρους γονιδιακής οντολογίας (GO).

Τελικά οι αλληλουχίες που επισημειώθηκαν με τουλάχιστον ένα βιολογικό όρο, μεταξύ των οντολογιών GO εμφάνισαν μια ευρεία κατανομή στις κατηγορίες των όρων που επιλέχθηκαν για την ταξινόμησή τους. Αναλυτικά η σχηματική

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

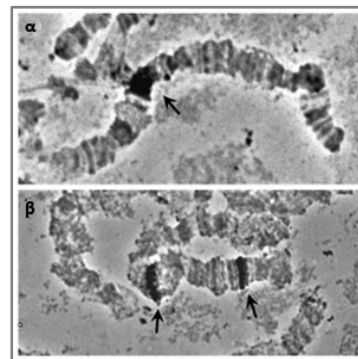
αναπαράσταση των αποτελεσμάτων παρουσιάζεται στα διαγράμματα της Εικόνας 3.2-6. Οι πιο αντιπροσωπευτικοί κλάδοι της οντολογίας βιολογικής διαδικασίας στην οποία καταγράφηκαν 240 επισημειώσεις, είναι ο μεταβολισμός και η κυτταρική ανάπτυξη με ποσοστά 34% και 20% αντίστοιχα. Παρόμοια στις οντολογίες της μοριακής λειτουργίας και κυτταρικής σύστασης, στις οποίες επισημειώθηκαν 244 και 127 ιδιότητες αντίστοιχα, οι όροι με τα μεγαλύτερα ποσοστά εγγραφών παρατηρήθηκαν στους κλάδους πρόσδεσης και καταλυτικής δραστηριότητας με τιμές 37% και 34% αντίστοιχα για την πρώτη κατηγορία, ενώ στην δεύτερη κατηγορία η συντριπτική πλειοψηφία του 77% κατανέμεται στον κλάδο των ενδοκυτταρικών συστατικών. Αξιοσημείωτο είναι επίσης ότι και στις τρεις κατηγορίες οντολογίας ποσοστά που κυμαίνονται από 5-13% αντιπροσωπεύουν γονίδια που τα λειτουργικά τους χαρακτηριστικά παραμένουν αδιευκρίνιστα. Συγκεντρωτικά ησημαιολογική ομοιότητα των πιο πληροφοριακών γονιδίων και αυτών που απορρίφθηκαν κατά την εφαρμογή μεθόδων επισημείωσης παρουσιάζεται στον Πίνακα 5.2-4 του Παραρτήματος, καθώς επίσης και η αριθμητική κατανομή τους κατά την ιεράρχηση GO (Παράρτημα: Πίνακας 6.2-3).



Εικόνα 3.2-6 Ποσοστιαία κατανομή των ESTs στις κατηγορίες GO. Τα ESTs επισημειώθηκαν και ταξινομήθηκαν με βιολογικούς όρους στις οντολογίες α) βιολογικής διαδικασίας, β) μοριακής λειτουργίας και γ) κυτταρικής σύστασης. Ορισμένα γονιδιακά προϊόντα επισημειώθηκαν με περισσότερες του ενός βιολογικούς όρους μεταξύ των οντολογιών GO. Συνεπώς ως 100% θεωρήθηκε ο συνολικός αριθμός των επισημειώσεων σε κάθε οντολογία. Οι αριθμοί στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν την ποσοστιαία αναλογία επί τις εκατό των επισημειωμένων γονιδιακών προϊόντων στις κατηγορίες βιολογικών όρων που επιλέχθηκαν για την ταξινόμηση. Οι αριθμοί στην κορυφή των διαγραμμάτων αντιστοιχούν στο συνολικό αριθμό επισημειώσεων για κάθε οντολογία.

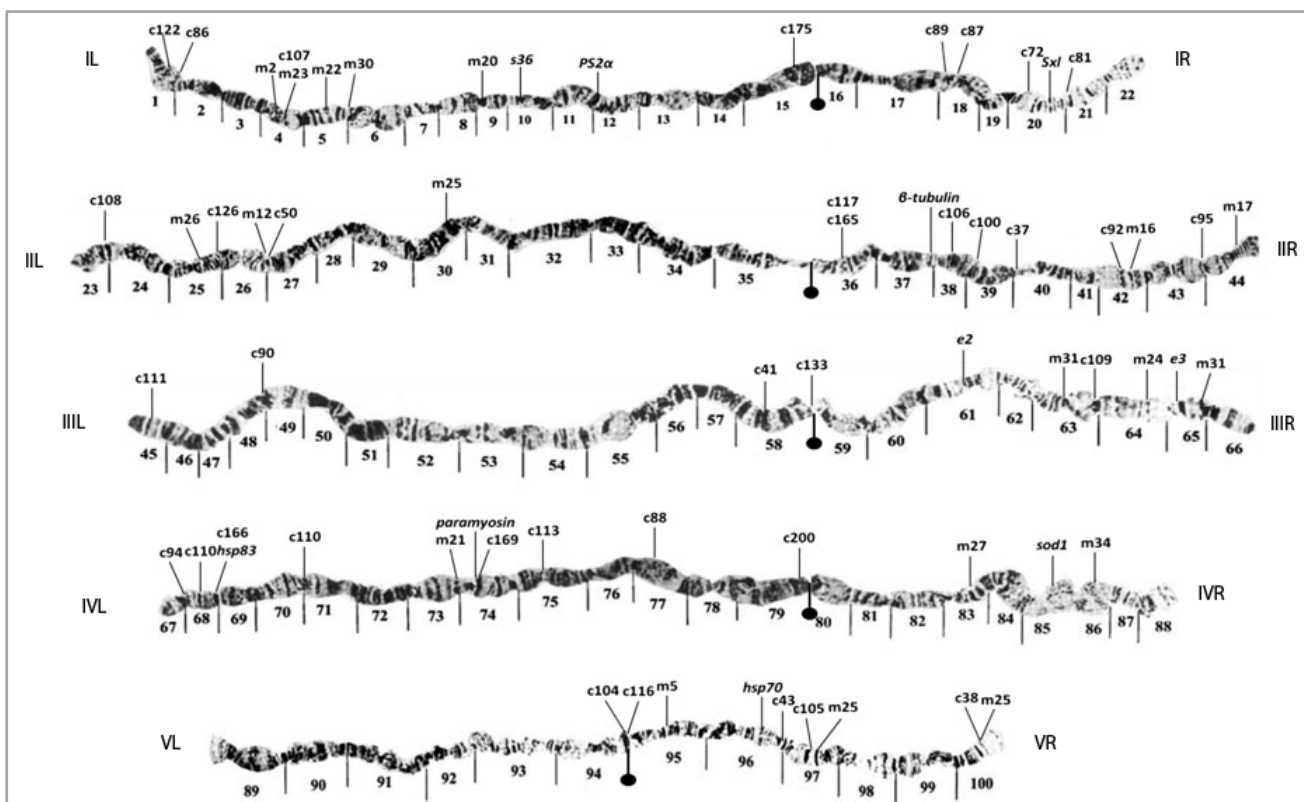
3.2.5 Κυτταρογενετική χαρτογράφηση ESTs μέσω *in situ* υβριδισμού σε πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου

Από το σύνολο των απομονωμένων ESTs καθορίστηκε η ακριβής χρωμοσωμική θέση 35 από αυτά μέσω της διαδικασίας του *in situ* υβριδισμού σε πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου. Οι 35 EST κλώνοι σημάνθηκαν με διγοξigenίνη και χρησιμοποιήθηκαν ως ανιχνευτές σε παρασκευάσματα πολυταινικών χρωμοσωμάτων (Εικ. 3.2-7). Η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός των ακριβών κυτταρογενετικών εντοπισμών των ESTs πραγματοποιήθηκε μετά από σύγκριση με τους διαθέσιμους φωτογραφικούς χάρτες των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του εντόμου (Mavragani-Tsipidou et al. 1992, Zambetaki et al. 1995). Οι θέσεις υβριδισμού συνολικά παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2-1, ενώ ταυτόχρονα παραθέτονται και οι χρωμοσωμικές θέσεις των ορθόλογων γονιδίων της *D. melanogaster*. Εκτός του κλώνου BoEST_110 που



Εικόνα 3.2-7 Ενδεικτικά αποτελέσματα *in situ* υβριδισμού σε πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου με ανιχνευτές τους σημασμένους με διγοξigenίνη κλώνους **α)** BoEST_90, **β)** BoEST_110. Οι θέσεις υβριδισμού υποδεικνύονται με βέλη.

υβριδίστηκε σε δύο διακριτές περιοχές, οι υπόλοιποι εμφάνισαν μοναδικές θέσεις υβριδισμού κατά την ανίχνευση του σήματος με την ανοσοχημική μέθοδο. Μεταξύ αυτών, 5 αλληλουχίες (BoEST_: 104, 116, 133, 175 και 200) εντοπίζονται στις κεντρομερικές περιοχές των χρωμοσωμάτων I, III, IV και V.



Εικόνα 3.2-8 Κυτταρογενετικός χάρτης των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του *B. oleae*. Στο χάρτη συμπεριλαμβάνονται επιπλέον όλα τα βιβλιογραφικά διαθέσιμα *in situ* δεδομένα (Mavragani-Tsipidou 2002; Augustinos et al. 2008). Το γράμμα «m» αντιστοιχεί στους μικροδορυφορικούς δείκτες, το «c» στα ESTs, ενώ τα χαρτογραφημένα γονίδια υποδηλώνονται με ολόκληρα ονόματα ή συντμήσεις. Με συμπαγείς κύκλους χαρακτηρίζονται τα κεντρομερή. Οι αριθμοί που ακολουθούν τα γράμματα «c» είναι σε συμφωνία με την ονοματολογία των ESTs.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Επιπλέον, ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και προσοχής τείνουν τρεις κλώνοι για τους οποίους δεν ανακτήθηκαν αποτελέσματα κατά την αναζήτηση ομοιότητας (BoEST_100) αλλά ούτε καθορίστηκε κάποιο ORF (BoEST_87, BoEST_92). Συγκεντρωτικά, η κυτταρογενετική χαρτογράφηση των παραπάνω ESTs απεικονίστηκε στους φωτογραφικούς χάρτες των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του δάκου. Συμπεριλήφθηκαν

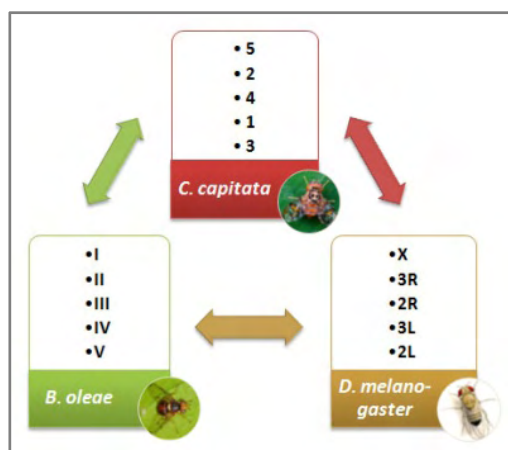
επίσης όλα τα μέχρι στιγμής διαθέσιμα δεδομένα που αφορούν τη χαρτογράφηση δεικτών του γονιδιώματος του εντόμου (μικροδορυφόροι και γονίδια) μέσω *in situ* υβριδισμών από προγενέστερες μελέτες (Mavragani-Tsiripidou 2002, Augustinos et al. 2008). Η αναθεωρημένη μορφή του κυτταρογενετικού χάρτη του δάκου παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.2-8.

Πίνακας 3.2-1 Θέσεις χαρτογράφησης 35 EST κλώνων μετά από *in situ* υβριδισμό σε πολυταινικά χρωμοσώματα σιελογόνων αδένων του *B. oleae*. Οι αντίστοιχες θέσεις χαρτογράφησης των ομόλογων γονιδίων της *D. melanogaster* ανακτήθηκαν από τις πληροφορίες που συνοδεύουν τις καταθέσεις της βάσης δεδομένων FlyBase. Οι κλώνοι BoEST_87, 92 and 100 δεν εμφάνισαν ομοιότητα κατά τη σύγκρισή τους με την αμινοξική βάση δεδομένων BLASTX. Στις θέσεις χαρτογράφησης δηλώνονται η χρωμοσωμική περιοχή ακολουθούμενη από το χρωμόσωμα και τον βραχίονά του αντίστοιχα.

<i>B. oleae</i> EST	Θέση χαρτογράφησης EST	Θέση χαρτογράφησης ομόλογου γονιδίου	Ομόλογο γονίδιο <i>D. melanogaster</i>
BoEST_122	1 IL	42C6-C7 2R	lethal(2)O1289 (CG9432)
BoEST_86	1 IL	77B6 3L	Insulin degrading metalloprotease
BoEST_107	4 IL	98B1 3R	ALG-2 interacting protein X
BoEST_175	Centromere I	2C4-C7 X	alpha actinin
BoEST_89	18 IR	57A9-A10 2R	exuperantia
BoEST_87	18 IR	-	-
BoEST_72	20 IR	13E13-14 X	T-cp1zeta
BoEST_81	20-21 IR	71B5 3L	Protein disulfide isomerase
BoEST_108	23 IIL	18B1 X	Ulp1
BoEST_126	25 IIL	59F5 2R	retained
BoEST_50	26-27 IIL	26F5 2L	CG9232
BoEST_117	36 IIR	96D2 3R	CG11909
BoEST_165	36 IIR	30B5 2L	GDP dissociation inhibitor
BoEST_106	38 IIR	83C4 3R	Rpn5
BoEST_100	39 IIR	-	-
BoEST_37	40 IIR	86E17 3R	CG14721
BoEST_92	42 IIR	-	-
BoEST_95	44 IIR	77B4-B5 3L	Eukaryotic release factor 1
BoEST_111	45 IIIL	92F2 3R	Septin-2
BoEST_90	48 IIIL	43E18 2R	CG1882
BoEST_41	58 IIIL	50E4 2R	CG8485
BoEST_133	Centromere III	41D3 2R	gustavus
BoEST_109	63-64 IIIR	11A2-A3 X	Mucin 11A
BoEST_94	67-68 IVL	-	-
BoEST_110	68, 70-71 IVL	62E3-E4 3L	CG1146
BoEST_166	68 IVL	63B11 3L	heat shock protein 83
BoEST_169	74 IVL	13A1 X	paramyosin
BoEST_113	75 IVL	77C6 3L	CG5059
BoEST_88	77 IVL	76C6 3L	Karyopherin alpha1
BoEST_200	Centromere IV	31B1 2L	chico
BoEST_104	Centromere V	30C5 2L	cAMP-dependent protein kinase 1
BoEST_116	Centromere V	32D5-E1 2L	Ca ²⁺ -channel-protein-β-subunit
BoEST_43	96-97 VR	25C7-C10 2L	Muscle-specific protein 300
BoEST_105	97 VR	25B1 2L	CG11926
BoEST_38	100 VR	22B1 2L	CG17652

3.2.6 Διερεύνηση συνταινιακότητας

Η κυτταρογενετική χαρτογράφηση των EST δεικτών και συνεπώς ο καθορισμός της ακριβούς χρωμοσωμικής θέσης των αντίστοιχων γονιδίων, μπορεί να αποτελέσει την απαρχή για τη διερεύνηση της συνταινιακότητας του δάκου με συγγενικά ή μεγαλύτερης απόκλισης από αυτόν είδη. Η παρούσα προσέγγιση αφορά στη διερεύνηση του βαθμού συγγένειας των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του δάκου με εκείνα της *D. melanogaster*, εφόσον αποτελεί ένα χαρακτηρισμένο οργανισμό-μοντέλο με διαθέσιμα δεδομένα *in silico* και πειραματικής χαρτογράφησης στη βάση δεδομένων της (FlyBase). Αρχικά, καθορίστηκε επαγωγικά η ομολογία των χρωμοσωμάτων δάκου και δροσόφιλας, σύμφωνα με τις ομολογίες που έχουν προσδιορισθεί, από πειραματικά δεδομένα *in situ* υβριδισμών, μεταξύ: i) της *C. capitata* με τη *D. melanogaster* (Gariou-Papalexίου et al. 2002) και ii) του *B. oleae* με τη *C. capitata* (Zampetaki et al. 1999) (Εικ. 3.2-9). Με τον τρόπο αυτό εκτιμήθηκε ότι τα χρωμοσώματα I, II, III, IV και V του δάκου αναμένεται να παρουσιάζουν ομολογία με τα χρωμοσώματα X, 3R, 2R, 3L και 2L της *D. melanogaster* αντίστοιχα.

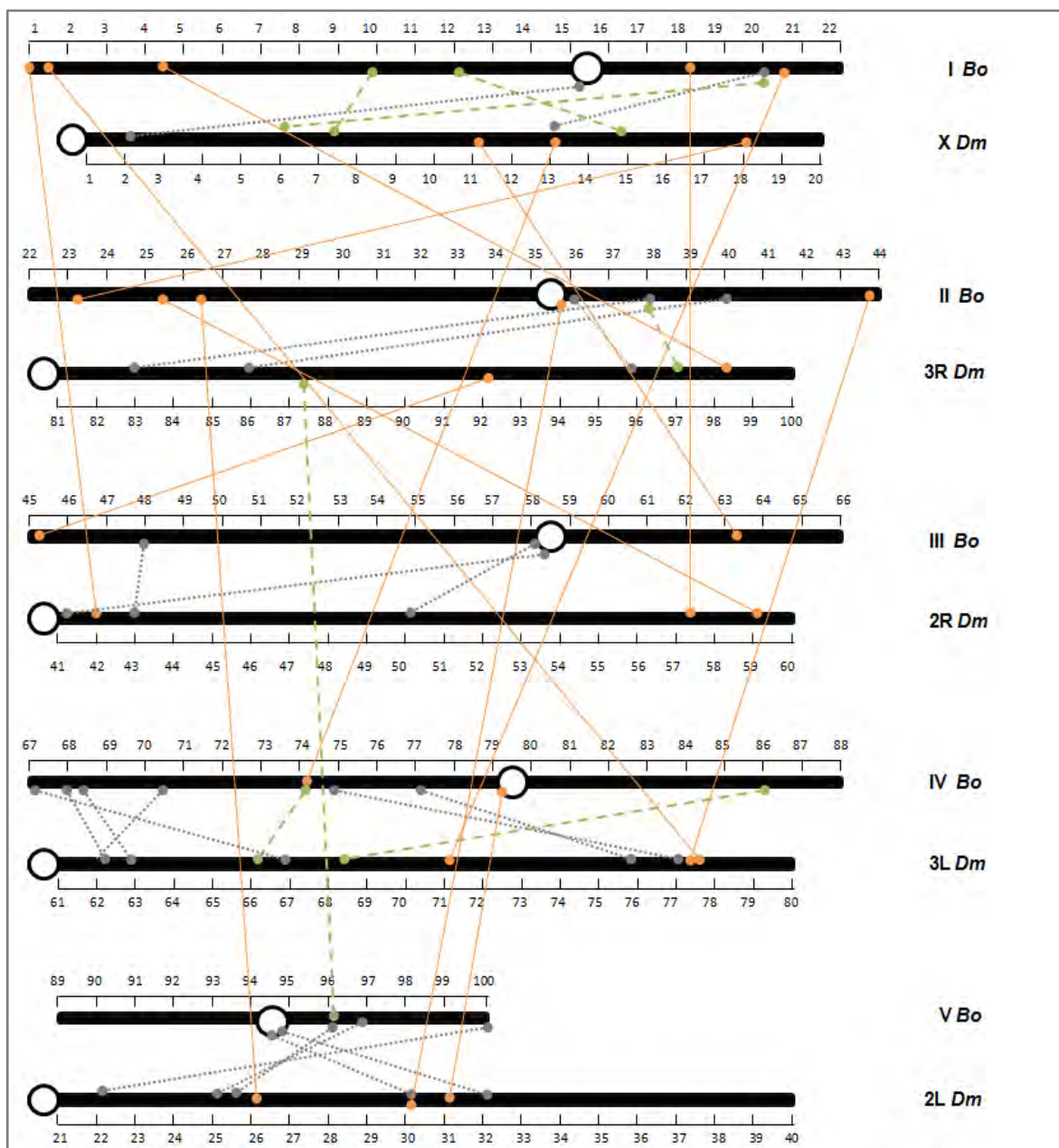


Εικόνα 3.2-9 Ομολογία πολυταινικών χρωμοσωμάτων *B. oleae* – *C. capitata* και *C. capitata* – *D. melanogaster*, βάσει των οποίων καθορίστηκε επαγωγικά η ομολογία μεταξύ των χρωμοσωμικών στοιχείων των *B. oleae* και *D. melanogaster*. Η σειρά που σημειώνονται τα χρωμοσώματα, είναι σε αντιστοιχία με τις παρατηρούμενες χρωμοσωμικές ομολογίες μεταξύ των οργανισμών ως προς τον οριζόντιο άξονα (πχ. I-5-X, II-2-3R, κλπ).

Πράγματι τα αποτελέσματα της σύγκρισης των χρωμοσωμικών θέσεων 31 ταυτοποιημένων και χαρτογραφημένων ESTs του δάκου καθώς και των 8 γονιδίων που συμπεριλαμβάνονται στον χάρτη από προηγούμενες μελέτες (για ανασκόπηση βλέπε Mavragani-Tsipidou 2002) με εκείνες των ορθόλογων γονιδίων της *D. melanogaster*, επιβεβαιώνουν τον παραπάνω ισχυρισμό ομολογίας. Συγκεντρωτικά οι κυτταρογενετικές θέσεις των 31 ESTs και των ομόλογων γονιδίων τους παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2-1.

Συγκεκριμένα, όπως απεικονίζεται και σχηματικά στην Εικόνα 3.2-10, για 18 από τα εξεταζόμενα ESTs (γκρι γραμμές) και 7 από τα ήδη χαρτογραφημένα γονίδια (πράσινες γραμμές) (Mavragani-Tsipidou 2002) τα ορθόλογά τους γονίδια εντοπίζονται κυτταρογενετικά σε χρωμοσώματα που συμφωνούν με την προτεινόμενη ομολογία. Παρ' όλα αυτά, για τα υπόλοιπα 14 (πορτοκαλί γραμμές) δεν φαίνεται να ακολουθείται το παραπάνω πρότυπο, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη χρωμοσωμικών αναδιατάξεων κατά τον εξελικτικό διαχωρισμό των δύο ειδών. Επιπλέον η δημιουργία του χάρτη συνταινιακότητας μεταξύ των δύο οργανισμών κατέστησε δυνατή την ταυτοποίηση συνταινιακών ενοτήτων (syntenic blocks), δηλαδή συγκεκριμένων περιοχών που εμφανίζουν υψηλή συντηρητικότητα συνταινίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων ενοτήτων συντηρημένης διάταξης αποτελεί η περιοχή 95-98 του χρωμοσώματος V του *B. oleae* με την αντίστοιχη περιοχή 21-25 του χρωμοσώματος 2L της *D. melanogaster*, με αντίθετο ωστόσο προσανατολισμό υποδηλώνοντας πιθανή χρωμοσωμική αναστροφή, όπως επίσης και η περιοχή 26-35 του χρωμοσώματος II του *B. oleae* με την αντίστοιχη περιοχή 25-30 του χρωμοσώματος 2L της *D. melanogaster*, υποδηλώνοντας μετατόπιση.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



Εικόνα 3.2-10 Σχηματική συγκριτική απεικόνιση των ομόλογων πολυταινικών χρωμοσωμάτων του *B. oleae* και της *D. melanogaster*. Οι αριθμοί αντιστοιχούν στις χρωμοσωμικές περιοχές των δύο οργανισμών. Οι γραμμές συνδέουν τις αντίστοιχες θέσεις χαρτογράφησης μεταξύ των ESTs και των ομόλογών τους γονιδίων, αποδίδοντας ταυτόχρονα το βαθμό συνταινιακότητας. Τα κεντρομερή δηλώνονται με τους κύκλους. Οι γκρι γραμμές αντιπροσωπεύουν τις συγκρίσεις που συμφωνούν με την προτεινόμενη ομολογία των χρωμοσωμάτων, σε αντίθεση με τις πορτοκαλί που δεν ακολουθούν το πρότυπο ομολογίας. Οι πράσινες γραμμές αντιπροσωπεύουν τις συγκριτικές θέσεις χαρτογράφησης των γονιδίων, που αναφέρονται ήδη στη βιβλιογραφία (Mavragani-Tsiridou, 2002) και έχουν καθοριστεί με χρήση ετερόλογων δεικτών.

3.2.7 Ανάλυση συχνότητας επιλογής κωδικονίων

Η ταυτοποίηση των ORFs των 195 ESTs έδωσε τη δυνατότητα ανάλυσης των συχνότητων χρήσης των κωδικονίων που αντιστοιχούν στα αμινοξέα των προϊόντων έκφρασης. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο σύνολο των αλληλουχιών ελέγχοντας το πρότυπο των κωδικονίων συνολικά σε επίπεδο ενιαίου μεταγραφικού προφίλ και όχι μεμονωμένων γονιδίων. Με χρήση του προγράμματος OMIGA 2.0, καθορίστηκε *in silico* η προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία κάθε EST και έτσι προσδιορίστηκαν συνολικά 40,359 κωδικόνια. Ακολούθως με χρήση του προγράμματος GCUA πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός των συχνότητων χρήσης των κωδικονίων για τις κωδικές νουκλεοτιδικές αλληλουχίες που υποβλήθηκαν. Επιπλέον, συμπεριλήφθηκαν και 12 μοναδικές κωδικές αλληλουχίες του γονιδιώματος που ήταν διαθέσιμες στη GenBank και αφορούσαν τα γονίδια: acetylcholinesterase (*ace*), alcohol dehydrogenase 1 και 2 (*adh1*, *adh2*) 6-phosphogluconic dehydrogenase (*6-Pgd*), *onoA*,

onoB, female-specific doublesex (*dsx*), male-specific doublesex (*dsx*), female-specific transformer (*f-tra*), male-specific transformer (*m-tra*), sex-lethal (*sxl*), transformer-2 (*tra-2*). Τα δεδομένα των συχνότητων συλλέχθηκαν και η τελική συχνότητα χρήσης κάθε κωδικονίου υπολογίστηκε μέσω του προγράμματος Excel. Στον Πίνακα 3.2-2 παραθέτονται οι συχνότητες χρήσης των κωδικονίων του *B. oleae* όπως αυτές προκύπτουν από την ανάλυση 45,762 τριπλετών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του οργανισμού.

Το πρότυπο χρήσης των κωδικονίων που καθορίστηκε, συγκρίθηκε περαιτέρω με τα πρότυπα 11 οργανισμών που ανακτήθηκαν επίσης από τη βάση δεδομένων Codon Usage Database. Οι οργανισμοί επιλέχθηκαν να αντιπροσωπεύουν τις βιολογικές τάξεις των αρθρόποδων (Insecta: *Ceratitis capitata*, *Musca domestica*, *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*) και των σπονδυλωτών [(Amphibia: *Xenopus tropicalis*), (Actinopterygii: *Danio rerio*), (Mammalia: *Mus musculus*), (Aves: *Gallus gallus*)]. Ακολούθως

Πίνακας 3.2-2 Πρότυπο συχνότητων επιλογής κωδικονίων του *B. oleae*. Οι συχνότητες χρήσης υπολογίστηκαν από την ανάλυση 45,762 τριπλετών που κωδικοποιούν πρωτεΐνες του οργανισμού. Οι αριθμοί με έντονη γραφή υποδηλώνουν το κωδικόνιο με τη μεγαλύτερη συχνότητα χρήσης.

Phe	UUU	0.49	Ser	UCU	0.16	Tyr	UAU	0.61	Cys	UGU	0.54
	UUC	0.51		UCC	0.14		UAC	0.39		UGC	0.46
Leu	UUA	0.21		UCA	0.20	TER	UAA	0.60	TER	UGA	0.27
	UUG	0.31		UCG	0.16		UAG	0.12	Trp	UGG	1.00
	CUU	0.12	Pro	CCU	0.18	His	CAU	0.60	Arg	CGU	0.37
	CUC	0.10		CCC	0.18		CAC	0.40		CGC	0.26
	CUA	0.11		CCA	0.46	Gln	CAA	0.68		CGA	0.12
	CUG	0.15		CCG	0.18		CAG	0.32		CGG	0.07
Ile	AUU	0.47	Thr	ACU	0.27	Asn	AAU	0.64	Ser	AGU	0.18
	AUC	0.25		ACC	0.23		AAC	0.36		AGC	0.17
	AUA	0.28		ACA	0.35	Lys	AAA	0.57	Arg	AGA	0.12
Met	AUG	1.00		ACG	0.15		AAG	0.43		AGG	0.05
Val	GUU	0.31	Ala	GCU	0.32	Asp	GAU	0.70	Gly	GGU	0.44
	GUC	0.17		GCC	0.24		GAC	0.30		GGC	0.31
	GUA	0.24		GCA	0.28	Glu	GAA	0.64		GGA	0.20
	GUG	0.28		GCG	0.17		GAG	0.36		GGG	0.06

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

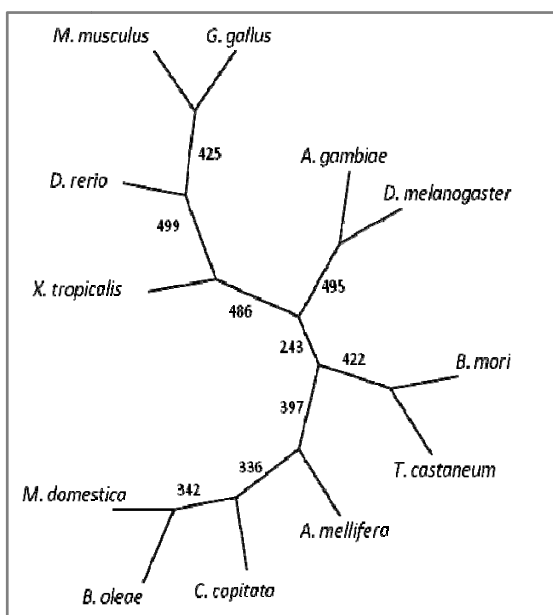
υπολογίστηκαν οι γενετικές αποστάσεις κατά Nei (1972), βασισμένες στις διαφορές των συχνοτήτων εμφάνισης κάθε κωδικονίου ανά οργανισμό, όπως φαίνονται στον πίνακα συχνοτήτων (Πίνακας 6.2-5) που παρατίθεται στο Παράρτημα. Στη συνέχεια κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα (Εικ. 3.2-10), εφαρμόζοντας τον αλγόριθμο N-J εισάγοντας τις συχνότητες στο πρόγραμμα PHYLIP 3.6C (Felsenstein 2004). Συγκεκριμένα, κατά την εισαγωγή των δεδομένων, οι συχνότητες των συνώνυμων κωδικονίων για κάθε αμινοξύ,

αντιμετωπίστηκαν ως συχνότητες αλληλομόρφων ενός γενετικού τόπου, ενώ τα αμινοξέα ως γενετικοί τόποι ενός πληθυσμού. Η αξιοπιστία κάθε κλάδου ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap, πραγματοποιώντας 500 ψευδο-επαναλήψεις. Το πρότυπο χρήσης κωδικονίων του *B. oleae* αλλά και των υπόλοιπων αρθρόποδων διαχωρίζονται εμφανώς, από τους υπόλοιπους οργανισμούς των σπονδυλωτών που συγκρίθηκαν. Εντούτοις και μεταξύ των αρθρόποδων ακολουθούνται σε αδρές



Εικόνα 3.2-11 Συγκριτικό διάγραμμα συχνοτήτων χρήσης των κωδικονίων του *B. oleae* (Bo) και των υπόλοιπων Διπτέρων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση. [Cc: *C. capitata*, Md: *M. domestica*, Dm: *D. melanogaster*, Ag: *A. gambiae*]

3.2.8 Ανάπτυξη EPIC δεικτών

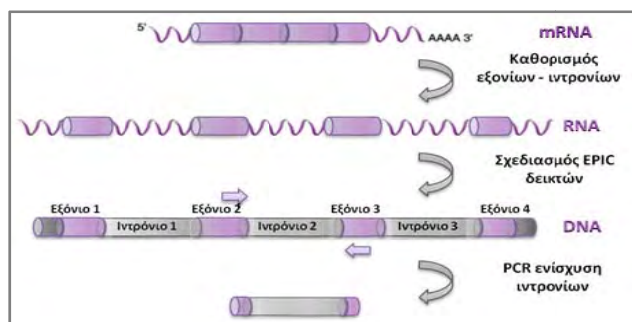


Εικόνα 3.2-12 Σχηματική απεικόνιση με τη μορφή δενδρογράμματος των γενετικών αποστάσεων 12 συνολικά ευκαρυωτικών οργανισμών σύμφωνα με τις διαφορές των συχνοτήτων χρήσης των κωδικονίων τους, εφαρμόζοντας τη μέθοδο UPGMA. Η αξιοπιστία κάθε κλάδου ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap, πραγματοποιώντας 500 ψευδο-επαναλήψεις.

γραμμές οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών, κάτι που συμφωνεί με ότι η χρήση των κωδικονίων είναι χαρακτηριστική για κάθε οργανισμό. Ωστόσο ο δάκος, όσον αφορά το πρότυπο χρήσης των κωδικονίων του, φαίνεται να ομαδοποιείται με τα πιο συγγενικά του είδη, *C. capitata* και *M. domestica*, ενώ αποκλίνει σημαντικά από τα αντίστοιχα πρότυπα των άλλων δύο ειδών των Διπτέρων *D. melanogaster* και *A. gambiae*. Στην Εικόνα 3.2-11 παρουσιάζονται συγκριτικά τα πρότυπα χρήσης των 5 ειδών των παραπάνω Διπτέρων.

Τα ESTs, ως προϊόντα μεταγραφικών μονάδων, δεν περιέχουν ιντρόνια. Η σύγκριση, όμως, των αλληλουχιών τους με ομόλογες αλληλουχίες οργανισμών γνωστής γονιδιωματικής οργάνωσης (όπως, για παράδειγμα, της *D. melanogaster*) μπορεί να υποδείξει τα σημεία όπου παρεμβάλλονται ιντρόνια. Στη συνέχεια, οι συντηρημένες εξονικές αλληλουχίες εκατέρωθεν των σημείων παρεμβολής των ιντρονίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχεδιασμό εκκινητών με σκοπό την ενίσχυση του παρεμβαλλόμενου ιντρονίου (Έχον Primed-Intron Crossing, EPIC) (Εικ. 3.2.11). Η προσέγγιση αυτή αποσκοπεί στη διερεύνηση φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ συγγενικών ειδών μέσω της σύγκρισης ιντρονικών αλληλουχιών. Η δια-ειδική ενίσχυση (cross-species amplification) αφορά στη χρήση εκκινητών που έχουν σχεδιαστεί βάσει της αλληλουχίας ενός οργανισμού και έχουν τη δυνατότητα να ενισχύουν την ίδια γονιδιωματική περιοχή και σε συγγενικά είδη. Όσο μικρότερη είναι η εξελικτική απόσταση μεταξύ των προς ανάλυση ειδών, τόσο λιγότερες αλλαγές αναμένεται να έχουν ενσωματωθεί στο γονιδίωμά τους, αυξάνοντας συνεπώς το ποσοστό των εκκινητών που πρόκειται να ενισχυθούν αποτελεσματικά κατά τη δια-ειδική εφαρμογή τους.

Στην παρούσα μελέτη ο καθορισμός των δυνητικών εξονίων επιτεύχθηκε μετά από συγκριτική ανάλυση των μεταγραφόμενων αλληλουχιών ESTs με τις αντίστοιχες νουκλεοτιδικές γονιδιωματικές αλληλουχίες της *D. melanogaster* με χρήση του προγράμματος BLASTN. Αφού οι αλληλουχίες στοιχήθηκαν, προσδιορίστηκε το



Εικόνα 3.2-13 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας EPIC-PCR.

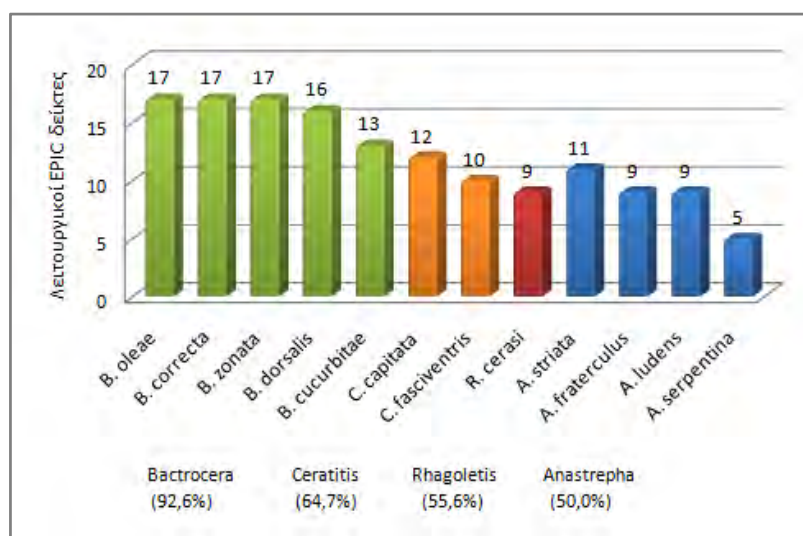
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μέγεθος των παρεμβαλλόμενων ιντρονίων και για την ενίσχυσή σχεδιάστηκαν 20 ζεύγη εκκινητών τους με χρήση του προγράμματος Omega 2.0, με προϋπόθεση το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης να κυμαίνεται από 300 έως 1000 bp. Για την διερεύνηση της δια-ειδικής εφαρμογής τους, οι EPIC εκκινητές του *B. oleae* χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις PCR με μήτρα DNA (10 ng) 11 ειδών της οικογένειας Terphritidae των εντόμων. Ανάμεσα στα είδη που εξετάστηκαν, 4 ανήκαν στο γένος *Bactrocera* (*B. correcta*, *B. cucurbitae*, *B. dorsalis* και *B. zonata*), 4 στο γένος *Anastrepha* (*A. fraterculus*, *A. ludens*, *A. serpentina* και *A. striata*), 2 στο γένος *Ceratitis* (*C. capitata* και *C. fasciventris*) και ένα στο γένος *Rhagoletis* (*R. cerasi*). Οι αλληλουχίες των εκκινητών, οι θερμοκρασίες υβριδοποίησής τους και τα προϊόντα ενίσχυσης για κάθε είδος παρουσιάζονται αναλυτικά στον Πίνακα 6.2-6 του Παραρτήματος. Τα προϊόντα των αντιδράσεων στη συνέχεια ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης ώστε να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης. Από τα 20 συνολικά ζεύγη EPIC εκκινητών που σχεδιάστηκαν, λειτουργικά αποδείχτηκαν τα 17 καθώς ενίσχυσαν τμήματα αναμενόμενου μεγέθους σε τουλάχιστον ένα από τα εξεταζόμενα είδη, συμπεριλαμβανομένου και του *B. oleae* που χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου (Εικ. 3.2-14). Για τα υπόλοιπα τρία δεν ήταν αποτελεσματική η ενίσχυση σε κανένα είδος για λόγους που σχολιάζονται περαιτέρω στη Συζήτηση. Όπως αναμενόταν, η μέση

μεταβιβασιμότητα (transferability) των EPIC δεικτών ανάμεσα στα είδη της οικογένειας Terphritidae, δηλαδή η αποτελεσματικότερη δια-ειδική ενίσχυση μειώθηκε εντός του γένους *Bactrocera* (92.6%). Ωστόσο ανάμεσα στα είδη του γένους *Bactrocera*, ανιχνεύτηκε ανομοιομορφία όσον αφορά τη λειτουργικότητα των εκκινητών, καθώς το είδος *B. cucurbitae* εμφάνισε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό ενίσχυσης (76.5%) συγκρίσιμο με εκείνο του γένους *Ceratitis* (64.7%). Τέλος, η αποτελεσματικότητα της ενίσχυσης εντός του γένους *Anastrepha* και *Rhagoletis* εκτιμήθηκε 50% και 56.6% αντίστοιχα (Εικόνα 3.2-14).

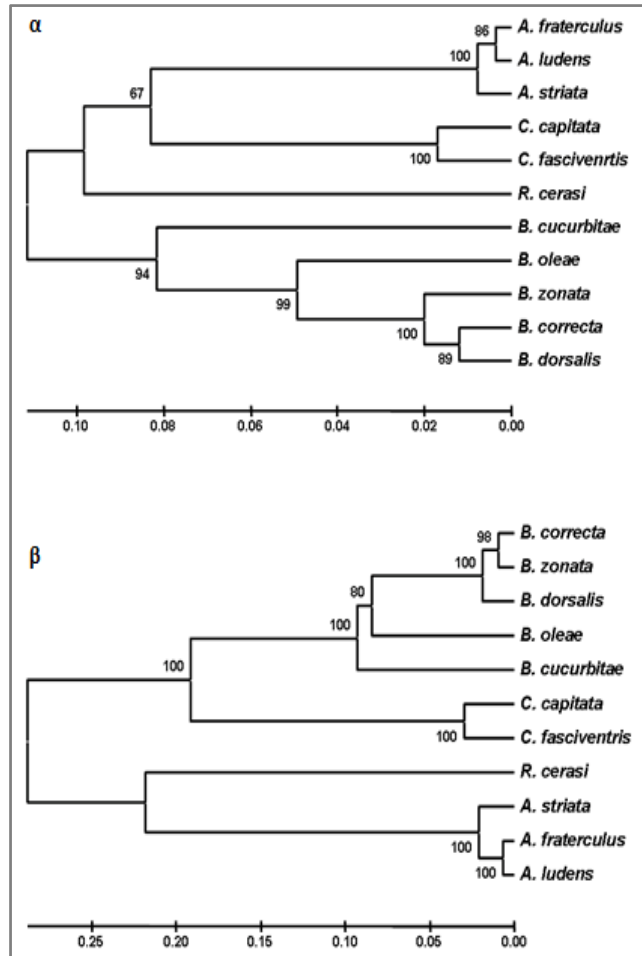
Τα συνολικά 145 προϊόντα ενίσχυσης απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και 98 από αυτά κλωνοποιήθηκαν σε φορέα pBS-SK(+) με T-άκρα (Παράρτημα: Πίνακας 6.2-6). Το πλασμιδιακό DNA που απομονώθηκε για κάθε κλώνο, ταυτοποιήθηκε με κατάτμηση με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *EcoRI* και *XhoI* και ακολούθως προσδιορίστηκε η πρωτοταγής του δομή με αλληλούχηση. Η σύγκριση των ακολουθιών που δυνητικά αντιπροσωπεύουν ιντρόνια και συνεπώς λιγότερο συντηρημένες περιοχές του γονιδιώματος, θα παρείχε σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά την εκτίμηση της απόκλισης μεταξύ των ενισχυόμενων αλληλουχιών των εξεταζόμενων ειδών. Τα αποτελέσματα των ομοπαράθεσεων των EPIC ακολουθιών που στοιχήθηκαν μέσω του προγράμματος ClustalW, το οποίο παρέχεται στο πακέτο προγραμμάτων του MEGA 2.1,

Εικόνα 3.2-14 Διάγραμμα απεικόνισης της αποτελεσματικότητας της δια-ενίσχυσης των EPIC δεικτών του *B. oleae* σε 4 γένη της οικογένειας Terphritidae. Οι αριθμοί στην κορυφή κάθε ράβδου αντιπροσωπεύουν τον αριθμό λειτουργικών δεικτών σε κάθε είδος, από τους συνολικά 17 δείκτες για τους οποίους παρατηρήθηκε το αναμενόμενο προϊόν ενίσχυσης στο *B. oleae*.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων βάσει των διαφορών των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών, σύμφωνα με τις οποίες κατασκευάστηκαν τα αντίστοιχα δενδρογράμματα, με τη μέθοδο N-J (Neighbour-Joining) μετά από 100 bootstrap ψευδο-επαναλήψεις. Στην Εικόνα 3.2-15 παρουσιάζονται ενδεικτικά τα δενδρογράμματα που προέκυψαν από τη σύγκριση των ακολουθιών των προϊόντων δια-ειδικής ενίσχυσης των EPIC δεικτών *ericBo149* και *ericBo215*. Τα δενδρογράμματα για τους υπόλοιπους EPIC δείκτες που κλωνοποιήθηκαν και αλληλουχήθηκαν επιτυχώς, παραθέτονται στο Παράρτημα (Εικ. 6.2-1). Οι τέσσερις ομάδες που αντιπροσωπεύουν τα αντίστοιχα γένη που ελέγχθηκαν, διαχωρίστηκαν εμφανώς με υψηλές τιμές bootstrap. Από τη μελέτη των δενδρογραμμάτων διακρίνεται επίσης η υψηλή συγγένεια του δάκου σε επίπεδο γονιδιώματος με τα υπόλοιπα είδη του γένους *Bactrocera* (*B. correcta*, *B. dorsalis* και *B. zonata*) που εμφανίζονται να ομαδοποιούνται διακριτά σε ξεχωριστό κλάδο, σημειώνοντας ωστόσο την εξελικτική απόσταση του είδους *B. cucurbitae*. Επιπλέον, το σύνολο των δενδρογραμμάτων που παράχθηκαν εμφανίζεται να υποστηρίζει τη φυλογενετική σύνδεση του γένους *Bactrocera* με εκείνο των *Ceratitis*, ενώ ακολουθούν με μικρότερη συγγένεια τα γένη *Anastrepha* και *Rhagoletis*.



Εικόνα 3.2-15 Δενδρογράμματα φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ 12 ειδών της οικογένειας Terphritidae, σύμφωνα με τις διαφορές των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ιντρονίων που ενισχύθηκαν με τους EPIC δείκτες **α)** *ericBo149* και **β)** *ericBo215*. Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν βάσει του αλγόριθμου N-J και η αξιοπιστία κάθε κλάδο ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap, πραγματοποιώντας 100 ψευδο-επαναλήψεις.

3.3 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΤΟΥ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ *ACHILLES* ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Στα πλαίσια της μελέτης της οργάνωσης του Υ χρωμοσώματος του δάκου, προγενέστερες αναλύσεις εστίασαν στην απομόνωση Υ-ειδικών αλληλουχιών του *B. oleae* (Μαθθιόπουλος, μη δημοσιευμένα δεδομένα). Το μικρό, συγκριτικά, μέγεθος του Υ χρωμοσώματος και η μεγάλη του διαφορά από τα υπόλοιπα χρωμοσώματα του εντόμου έδωσε τη δυνατότητα διαχωρισμού του σε ηλεκτροφόρηση παλμικού πεδίου (PFGE). Το απομονωμένο από το πήκτωμα της ηλεκτροφόρησης Υ-DNA αποτέλεσε πρώτη ύλη για την κατασκευή Υ-εμπλουτισμένων βιβλιοθηκών. Ακολούθως, έγινε παράλληλη διαλογή των βιβλιοθηκών αυτών με ανιχνευτές γονιδιωματικό DNA από θηλυκά και αρσενικά άτομα ώστε να απομονωθούν κλώνοι που υβριδοποιούνταν κατά προτίμηση με ανιχνευτή το DNA αρσενικών ατόμων. Η μεγαλύτερη διαφορά έντασης σήματος στην υβριδοποίηση παρατηρήθηκε για τον κλώνο 5FF. Ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του κλώνου έδειξε ότι υπάρχει ανοικτό αναγνωστικό πλαίσιο με μεγάλη ομοιότητα με την τρανσποζάση gag του ρετρομεταθετού στοιχείου MAX της *D. melanogaster*, που ανήκει στην οικογένεια BEL-Pao. Το δυνητικό αυτό στοιχείο αναφέρεται στο εξής ως *Achilles*.

Το ρετρομεταθετό στοιχείο MAX της *D. melanogaster* εντοπίζεται στις ετεροχρωματινικές περιοχές των αυτοσωμάτων ενώ είναι διάσπαρτο στο Υ χρωμόσωμα. Παρόμοια κατανομή εμφάνισε και το *Achilles* κατά τον *in situ* υβριδισμό του σε πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου. Δεδομένου ότι αφενός δεν έχουν περιγραφεί καθόλου μεταθετά στοιχεία στο δάκο και αφετέρου του ιδιαίτερου ενδιαφέροντος που παρουσιάζει η κατανομή του *Achilles* κατά προτίμηση στο Υ χρωμόσωμα, κρίθηκε αναγκαία η προσπάθεια απομόνωσης της συνολικής αλληλουχίας του ρετρομεταθετού και ο χαρακτηρισμός του. Στα πλαίσια της απομόνωσης ενός ακέραιου στοιχείου *Achilles* πραγματοποιήθηκε διαλογή της

γονιδιωματικής λ βιβλιοθήκης του δάκου με χρήση τμήματος του *Achilles* ως ανιχνευτή. Η μοριακή ανάλυση των κλώνων που απομονώθηκαν, οδήγησαν στη διαλεύκανση της οργάνωσης του ρετρομεταθετού *Achilles* του δάκου σύμφωνα με την αντίστοιχη δομή του στοιχείου MAX της *D. melanogaster*, ενώ παράλληλα καθορίστηκε και η συμμετοχή του στη δομή του γονιδιώματος.

3.3.1 Απευθείας διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Η ανίχνευση και απομόνωση ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων λ που φέρουν ακέραιο το ρετρομεταθετό στοιχείο *Achilles* του δάκου ή τμήμα αυτού, πραγματοποιήθηκε με διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης λ-DASH®II ενήλικων ατόμων του εντόμου. Η βιβλιοθήκη ήταν προσφορά του εργαστηρίου της Δρ. Κομητοπούλου και περιγράφεται από τους Lagos et al. 2005.

Η απευθείας διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου πραγματοποιήθηκε περίπου σε 40,000 πλάκες ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων λ. Δεδομένης της εκτίμησης του μεγέθους του γονιδιώματος του δάκου (3.22×10^8 bp), του μέσου μεγέθους του ενθέματος του βακτηριοφάγου λ (~15 kb) και της σχέσης $N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-x/y)}$ (βλέπε Υλικά & Μέθοδοι §2.6.5), υπολογίζεται ότι η διαλογή 65,000 φαγικών κλώνων θα επέτρεπε την απομόνωση μιας μοναδικής αλληλουχίας με πιθανότητα 95%. Το γεγονός ότι το προς απομόνωση ρετρομεταθετό στοιχείο αναμενόταν να εντοπιστεί σε περισσότερες της μίας γονιδιωματικές περιοχές, κρίθηκε εξίσου αποτελεσματική τελικά η διαλογή 40,000 πλακών.

Η διαλογή πραγματοποιήθηκε σε αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης (θερμοκρασία 65°C) χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή το τμήμα των 1.2 kb του αρρενο-ειδικού κλώνου 5FF του δάκου (που αναφέρεται από εδώ και πέρα ως 1.2-5FF). Το τμήμα 1.2-5FF απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης μετά από κατάτμηση του πλασμιδίου όπου ήταν κλωνοποιημένο με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI. Ακολούθως σημάνθηκε με

βιοτίνη με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινήτων, ώστε να λειτουργήσει ως ανιχνευτής. Αποτέλεσμα της διαλογής, η οποία επιβεβαιώθηκε περαιτέρω με επαναδιαλογή (secondary screening), ήταν η απομόνωση των φαγικών κλώνων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3-1.

Οι βακτηριοφαγικοί αυτοί κλώνοι αναλύθηκαν δομικά όσον αφορά το πρότυπο κατάτμησής τους με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες EcoRI και HindIII, ενώ ακολούθησε και ανάλυση κατά Southern με ανιχνευτή το τμήμα 1.2-5FF (θερμοκρασία 65°C). Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν αναλύονται περαιτέρω στο παρόν κείμενο, εφόσον οι συγκεκριμένοι κλώνοι κρίθηκαν ακατάλληλοι κατά την επεξεργασία τους για την απομόνωση του *Achilles*. Στην επιλογή αυτή οδήγησαν δεδομένα όπως:

1. Η υποκλωνοποίηση των θετικών θραυσμάτων των φαγικών κλώνων και ακολούθως ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξής τους δεν επιβεβαίωσε την αναμενόμενη ομολογία με το στοιχείο MAX της *D. melanogaster* (φαγικοί κλώνοι: 6, 11, 12 και 13).
2. Κατά την αντίδραση PCR τους με τους εκκινήτες AchillF και AchillR, που ενισχύουν τμήμα 338 bp του στοιχείου *Achilles*, δεν ενισχύθηκε το αναμενόμενο προϊόν (φαγικοί κλώνοι: 1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 14 και 15).

Όπως διαπιστώθηκε από μεταγενέστερες αναλύσεις, το τμήμα 1.2-5FF που χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής για την απομόνωση του ρετρομεταθετού, περιείχε επιπλέον στο 3' άκρο του και αλληλουχίες υψηλά επαναλαμβανόμενης φύσης, όπως θα αναλυθεί παρακάτω (§ 3. 4).

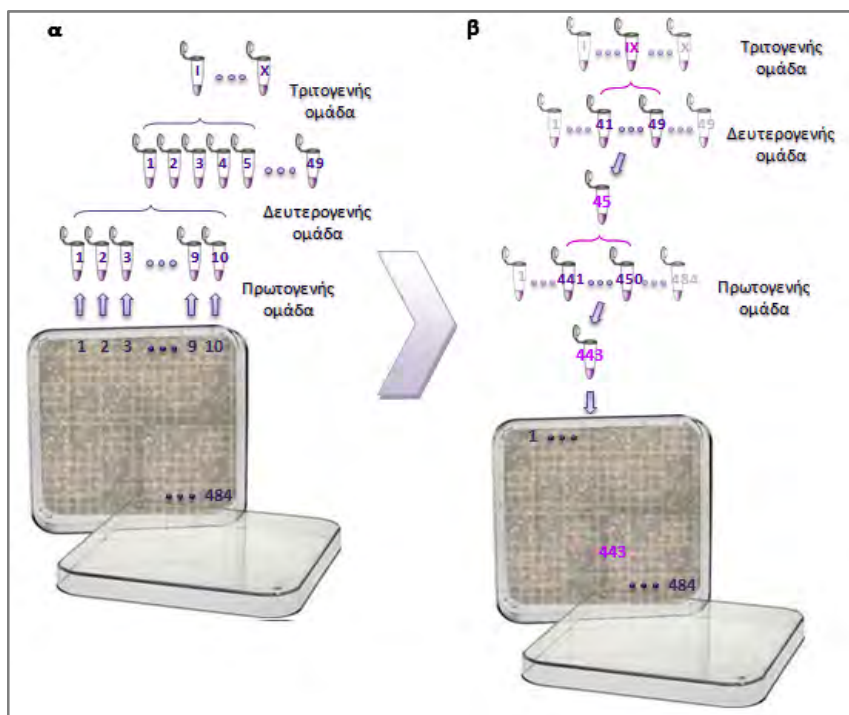
3.3.2 Διαλογή προεπιλεγμένων κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε για την απομόνωση νέων βακτηριοφαγικών κλώνων με σκοπό την απομόνωση του ακέραιου ρετρομεταθετού *Achilles*, αφορούσε τη διαλογή προεπιλεγμένων μέσω PCR κλασμάτων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης.

Συνολικά η συλλογή των κλασμάτων που χρησιμοποιήθηκε αποτελούταν από περίπου 10⁵ ανασυνδυασμένους βακτηριοφάγους της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου, οι οποίοι αρχικά είχαν επιστρωθεί σε τετράγωνο τρυβλίο 22 x 22 cm². Το τρυβλίο αυτό διαχωρίστηκε σε 484 μικρότερα τεμάχια που συλλέχθηκαν σε διαφορετικά σωληνάκια erpendorf, αποτελώντας την πρωτογενή ομάδα των κλασμάτων που περιείχαν ~200 φαγικού κλώνους το καθένα. Ακολούθως τα κλάσματα της ομάδας αυτής, συνδυαζόμενα ανά 10 οδήγησαν στο σχηματισμό των 49 κλασμάτων της δευτερογενούς ομάδας, καθένα από τα οποία περιελάμβανε ~2000 κλώνους. Αντίστοιχα από το συνδυασμό των τελευταίων ανά 5, δημιουργήθηκε η τριτογενής ομάδα κλασμάτων, με ~10000 κλώνους το καθένα (Κακάνη 2009). Μέσω της παραπάνω συλλογής κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης δίνεται η δυνατότητα ανεύρεσης ενός επιθυμητού κλώνου μετά από διαδοχικές αντιδράσεις PCR στην ομάδα των τριτογενών, δευτερογενών και πρωτογενών κλασμάτων της αρχικής βιβλιοθήκης και μιας τελικής διαλογής στο πρωτογενές κλάσμα των ~200 κλώνων (Εικ.3.3-1α).

Πίνακας 3.3-1 Συνολική παρουσίαση των διαφορετικών βακτηριοφαγικών κλώνων που απομονώθηκαν. Παρουσιάζονται διαδοχικά η διαδικασία απομόνωσής τους, ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε και η επεξεργασία τους (✓) ή μη (✗), όσον αφορά τη δομική ανάλυση και χαρτογράφηση των ενθεμάτων τους και επιπλέον την υποκλωνοποίηση τουλάχιστον των θετικών θραυσμάτων τους.

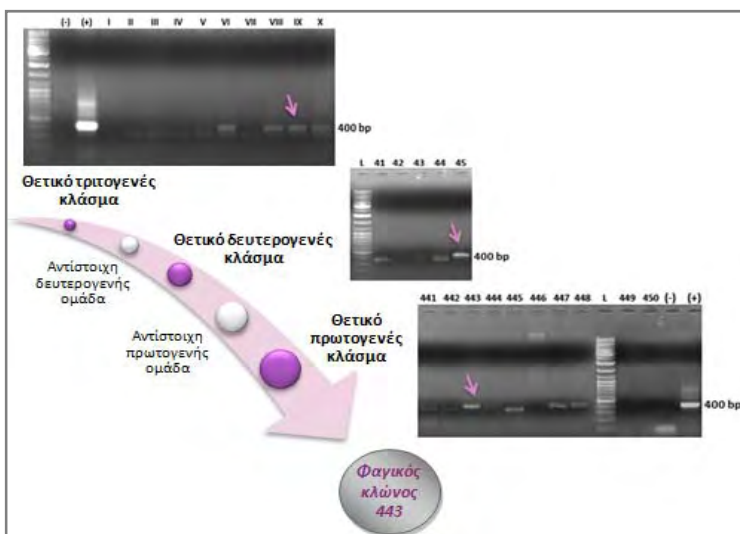
Φαγικοί κλώνοι	Διαδικασία απομόνωσης	Ανιχνευτής	Δομική ανάλυση – Χαρτογράφηση	Υποκλωνοποίηση θραυσμάτων
6, 12	Απευθείας διαλογή	1.2-5FF	✓ - ✗	✓
11, 13	Απευθείας διαλογή	1.2-5FF	✓ - ✓	✓
1, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 14, 15	Απευθείας διαλογή	1.2-5FF	✓ - ✗	✗
443, 447, 448, 255	Διαλογή προεπιλεγμένων κλασμάτων	Achill400	✓ - ✓	✓
273, 276, 278	Διαλογή προεπιλεγμένων κλασμάτων	1.2-5FF	✓ - ✓	✓



Εικόνα 3.3-1 Σχηματική απεικόνιση διαδικασίας δημιουργίας κλασμάτων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου και διαλογής των προεπιλεγμένων κλασμάτων. **α)** Η βιβλιοθήκη που έχει επιστρωθεί, διαιρείται σε ισομεγέθη τμήματα, από τα οποία προκύπτουν τα ισάριθμα αρχικά κλάσματα της συλλογής (πρωτογενής ομάδα). Ακολούθως τα κλάσματα αυτά αναμειγνύονται διαδοχικά ανά δέκα ώστε να αντιπροσωπεύονται μοναδικά στα υποσύνολα της ομάδας του επόμενου επιπέδου (δευτερογενής ομάδα). Παρόμοια από το συνδυασμό πέντε τέτοιων διαδοχικών υποσυνόλων προκύπτουν τα αντίστοιχα υποσύνολα της επόμενης ομάδας (τριτοταγής ομάδα). Αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι το σύνολο των φαγικών κλώνων της βιβλιοθήκης να αντιπροσωπεύεται βαθμιδωτά σε κλάσματα τριών επιπέδων (Κακάνη 2009). **β)** Διαλογή προεπιλεγμένων μέσω PCR γονιδιωματικής βιβλιοθήκης δάκου που οδήγησαν στην απομόνωση του φαγικού κλώνου φ443. Το προϊόν ενίσχυσης της PCR των τριτογενών κλασμάτων (errpendorf κλάματος IX) οδήγησε σε 5 κλάσματα της δευτερογενούς ομάδας (errpendorfs 41-49). Το προϊόν ενίσχυσης της PCR αυτών των 5 δευτερογενών κλασμάτων (errpendorf κλάματος 45) οδήγησε σε 10 κλάσματα της πρωτογενούς ομάδας (errpendorfs 441-450) και αντίστοιχα από την ενίσχυσή τους επιλέχθηκε το τελικό κλάσμα (errpendorf 443) για διαλογή.

Αναλυτικότερα, οι αντιδράσεις PCR στα κλάσματα της συλλογής πραγματοποιήθηκαν με χρήση των εκκινητών AchillF και AchillR, που ενισχύουν τμήμα 338 bp του προς απομόνωση ρετρομεταθετού στοιχείου (Παράρτημα: Πίνακας 6.3-1). Το προϊόν ενίσχυσης σε ορισμένο κλάσμα της τριτογενούς ομάδας υποδείκνυε την επακόλουθη PCR των δευτερογενών συστατικών του, δηλαδή τη δευτερογενή ομάδα 5 κλασμάτων. Ακολούθως το προϊόν ενίσχυσης σε ορισμένο κλάσμα της δευτερογενούς ομάδας υποδείκνυε την επακόλουθη PCR των πρωτογενών συστατικών του, δηλαδή την αντίστοιχη δεκάδα των κλασμάτων της πρωτογενούς ομάδας. Τελικά, το προϊόν ενίσχυσης σε ορισμένο κλάσμα της πρωτογενούς ομάδας υποδείκνυε τη διαλογή του συγκεκριμένου κλάσματος (Εικ.3.3-1β).

Κατά τη διαλογή σαρώθηκαν περίπου 2,000 πλάκες ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί η αντιπροσώπευση κάθε βακτηριοφάγου περίπου 10 φορές, εφόσον σε κάθε κλάσμα περιέχονται ~200 βακτηριοφάγοι. Η διαλογή των πρωτογενών κλασμάτων πραγματοποιήθηκε σε αυστηρές συνθήκες υβριδοποίησης (θερμοκρασία 65°C), με ανιχνευτή το προϊόν ενίσχυσης των εκκινητών AchillF και AchillR στην αντίδραση PCR με εκμαγείο το τμήμα 1.2kb του Υ-ειδικού κλώνου 5FF. Η αλληλουχία μεγέθους 338 bp που ενισχύθηκε (και αναφέρεται από εδώ και πέρα ως Achill400), απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης και σημάνθηκε με βιοτίνη με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών, ώστε να λειτουργήσει ως ανιχνευτής. Αποτέλεσμα της διαλογής, η οποία επιβεβαιώθηκε



Εικόνα 3.3-2 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% των προϊόντων ενίσχυσης με PCR των προεπιλεγμένων κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης. Στην εικόνα σημειώνονται ενδεικτικά τα διαδοχικά προϊόντα ενίσχυσης των κλασμάτων που οδήγησαν στην απομόνωση του φαγικού κλώνου φ443. Επίσης από την ίδια πρωτογενή ομάδα (κλάσματα 441-450) προέκυψαν επιπλέον τα τελικά κλάσματα 447 και 448, που οδήγησαν στην απομόνωση των φαγικών κλώνων φ447 και φ448.

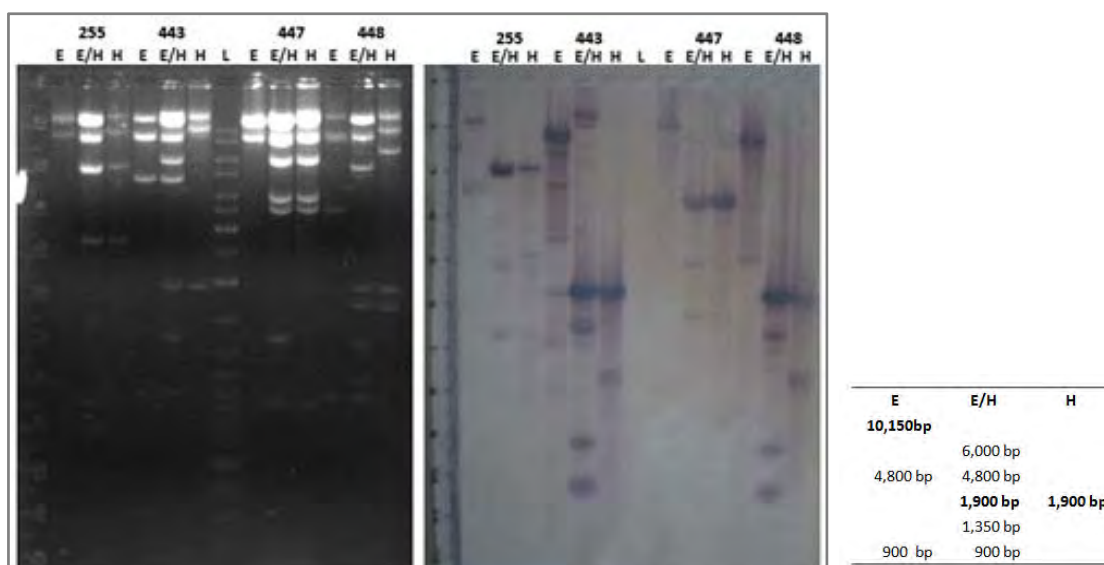
περαιτέρω με επαναδιαλογή (secondary screening), ήταν η απομόνωση 4 φαγικών κλώνων που ονομάστηκαν φ255, φ443, φ447 και φ448. Τα προϊόντα ενίσχυσης των κλασμάτων της βιβλιοθήκης και τα αποτελέσματα της διαλογής παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.3-2.

3.3.3 Δομική ανάλυση των απομονωμένων φαγικών κλώνων

Η διαλογή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης απέφερε ένα σύνολο ανασυνδυασμένων βακτηριοφάγων, εκ των οποίων επιλέχθηκαν τέσσερις προς ανάλυση. Ο εντοπισμός της επιθυμητής αλληλουχίας Achill400 σε μεγάλο αριθμό κλασμάτων κατά τη διαλογή, θεωρήθηκε αναμενόμενος δεδομένης της υψηλής συχνότητας των ρετρομεταθετών στοιχείων στο γονιδίωμα αλλά και της ευρείας κατανομής τους σε διαφορετικές χρωμοσωμικές περιοχές. Οι κλώνοι των βακτηριοφάγων που συλλέχθηκαν από τη διαλογή, πολλαπλασιάστηκαν μετά από επιμόλυνση και λύση υγρής βακτηριακής καλλιέργειας (§ 2.6.3) και ακολούθησε απομόνωση του φαγικού DNA. Με σκοπό τη διερεύνηση των ενθεμάτων τους και τον καθορισμό τυχόν ομοιογένειάς τους, ελέγχθηκαν τα πρότυπα κατάτμησης κάθε κλώνου με χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού και ακολούθως αυτά συγκρίθηκαν μεταξύ τους. Οι ενδονουκλεάσες

περιορισμού που επιλέχθηκαν για την κατάτμηση του ανασυνδυασμένου φαγικού DNA (2.5 μg) των απομονωμένων κλώνων ήταν οι EcoRI και HindIII, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις μεμονωμένα αλλά και σε συνδυασμό. Το μέγεθος των θραυσμάτων περιορισμού που προέκυψαν, αθροιστικά καθόρισε το μέγεθος του ενθέματος κάθε βακτηριοφάγου. Τα πρότυπα κατάτμησης των τριών από τους τέσσερις απομονωμένους κλώνους παρουσίασαν σχετική ανομοιομορφία κατά τη σύγκρισή τους, γεγονός που υποδηλώνει την απομόνωση διαφορετικών περιοχών του γονιδιώματος.

Για την επιβεβαίωση της ομολογίας των απομονωμένων κλώνων με την αλληλουχία Achill400 και ταυτόχρονα την ανίχνευση των ομόλογών της περιοχών σε κάθε ένθεμα, πραγματοποιήθηκε ανάλυσή τους κατά Southern. Τα προϊόντα των αντιδράσεων κατάτμησης του απομονωμένου φαγικού DNA των τεσσάρων ανασυνδυασμένων κλώνων με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού EcoRI, HindIII και το συνδυασμό τους, μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αгарόζης και ακολούθως υβριδοποιήθηκαν σε θερμοκρασία 65°C με ανιχνευτή την αλληλουχία Achill400 (Εικ. 3.3-1).

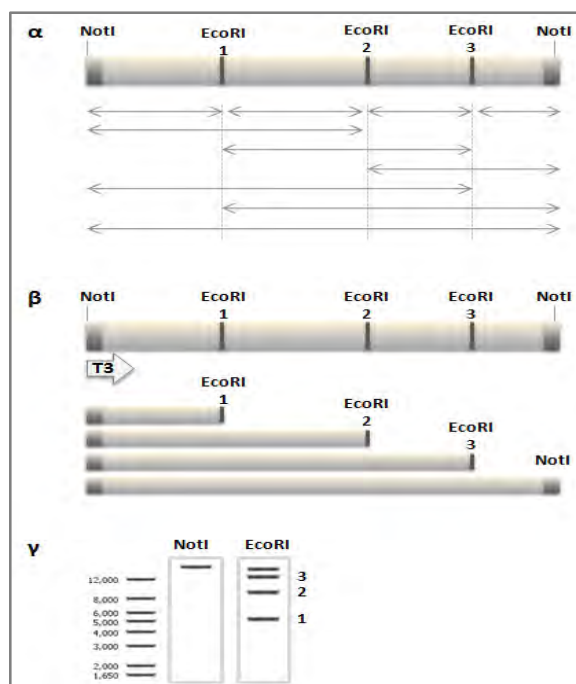


Εικόνα 3.3-3 Ανάλυση κατά Southern των προϊόντων ολικής κατάρτησης των βακτηριοφαγικών κλώνων 255, 443, 447 και 448 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *EcoRI* (E) και *HindIII* (H) μεμονωμένα, αλλά και το συνδυασμό τους (E/H). Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 65°C με ανιχνευτή τη σημασμένη με βιοτίνη αλληλουχία AchII400. Στον πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά τα μεγέθη των θραυσμάτων που προέκυψαν από τις τρεις αντιδράσεις κατατμήσης για τον φαγικό κλώνο 443. Με έντονη γραφή σημειώνονται τα θετικά θραύσματα. [L: Μάρτυρας μοριακού βάρους]

Η εμφάνιση του σήματος της υβριδοποίησης έδωσε θετικά αποτελέσματα και για τους τέσσερις φαγικούς κλώνους που ελέγχθηκαν, αποκαλύπτοντας τις ομόλογες προς τον ανιχνευτή περιοχές των ενθεμάτων. Λόγω της ομοιότητας των προτύπων κατάρτησης των φαγικών κλώνων φ443 και φ448 καθώς και των προτύπων υβριδοποίησης τους, θεωρήθηκε ότι αποτελούν τον ίδιο κλώνο. Οι υπόλοιποι δύο κλώνοι, φ255 και φ447, επεξεργάστηκαν με σκοπό την υποκλωνοποίηση των θραυσμάτων τους.

Εικόνα 3.3-4 Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας χαρτογράφησης των θέσεων αναγνώρισης της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *EcoRI* σε ένθεμα βακτηριοφαγικού κλώνου. **α)** Αποκοπή ενθέματος με χρήση της περιοριστικής ενδονουκλεάσης *NotI* (ολική κατάρτηση) και ακολούθως μερική κατάρτησή του με την περιοριστική ενδονουκλεάση *EcoRI*. Τα διπλά βέλη υποδηλώνουν τα πιθανά θραύσματα που προκύπτουν. **β)** Υβριδοποίηση κατά Southern των προϊόντων κατάρτησης και ανίχνευση των αλληλεπικαλυπτόμενων θραυσμάτων *EcoRI* (1-3), βάσει των άκρων του ενθέματος με χρήση του τελοειδικού T3 ανιχνευτή. **γ)** Αναπαράσταση μεμβρανών κατά την εμφάνιση του σήματος της υβριδοποίησης για την ολική (*NotI*) και μερική (*EcoRI*) κατάρτηση και καθορισμός των μεγεθών των θραυσμάτων.

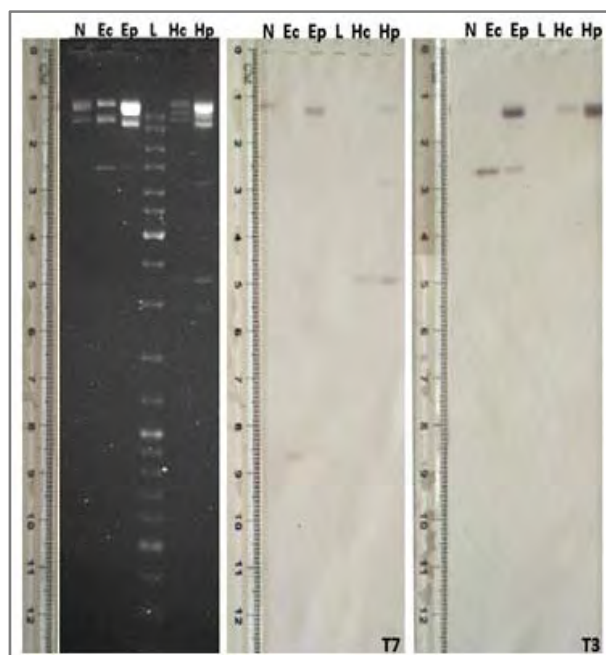
Ωστόσο εξαιτίας της δυσκολίας χειρισμού τους και του μεγάλου μεγέθους των θετικών κατά την υβριδοποίηση θραυσμάτων τους, με σκοπό τον αποτελεσματικό καθορισμό της συνολικής αλληλουχίας τους, τελικά προς περαιτέρω ανάλυση επιλέχθηκε ο κλώνος φ443.



3.3.4 Χαρτογράφηση και ανάλυση πρωτο-διάταξης του φαγικού κλώνου φ443

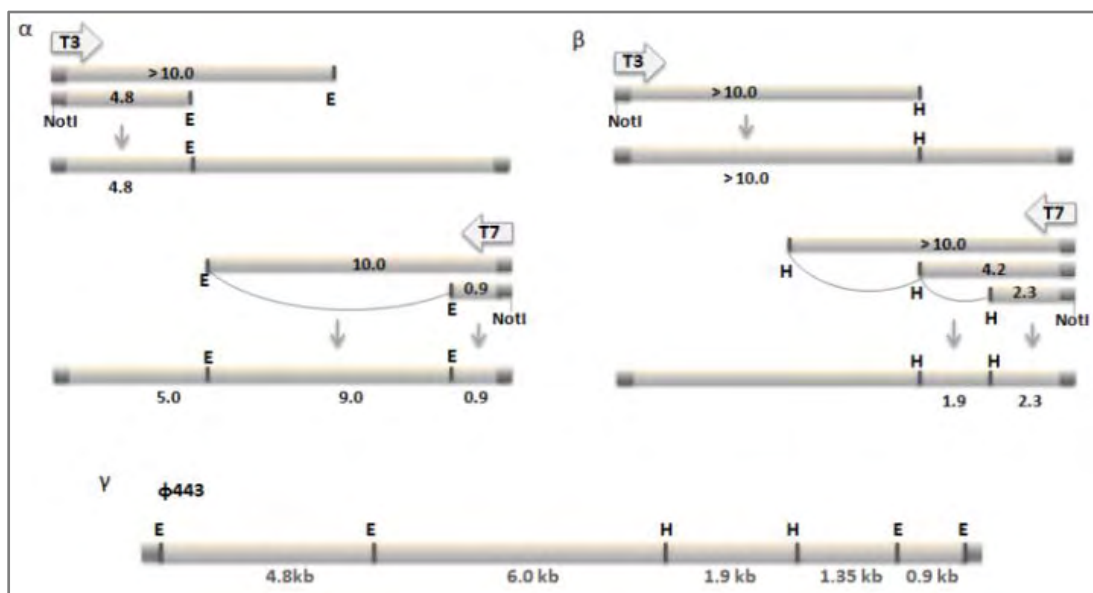
Για τον καθορισμό της ακριβούς διευθέτησης των θραυσμάτων που προέκυψαν, κατά μήκος του ενθέματος του φαγικού κλώνου φ443, πραγματοποιήθηκε χαρτογράφηση του με μερική κατάτμηση. Κατά τη διαδικασία αυτή, τη μερική πέψη του φαγικού DNA με συγκεκριμένη ενδονουκλεάση ακολουθεί υβριδοποίηση με ανιχνευτή το άκρο του ενθέματος (η παρουσία των τελο-ειδικών T3 και T7 υποκινητών δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας παρόμοιων ανιχνευτών). Η υβριδοποίηση αυτή αποκαλύπτει μόνο τα θραύσματα εκείνα που έχουν ένα κοινό άκρο. Κατά συνέπεια, τα μεγέθη των ζωνών που υβριδοποιούνται αντιστοιχούν στις αποστάσεις των θέσεων αναγνώρισης της ενδονουκλεάσης που χρησιμοποιήθηκε, από το άκρο του ενθέματος που λειτούργησε ως εκμαγείο για τη δημιουργία του ανιχνευτή. Η σχηματική αναπαράσταση της προσέγγισης παρουσιάζεται στην Εικόνα 3.3-4.

Η πειραματική διαδικασία περιελάμβανε την εξαγωγή του ενθέματος από τον φορέα, μετά από ολική κατάτμηση του φαγικού κλώνου (4 μg) με χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού *NotI* και ακολούθως τη μερική κατάτμηση του με την επιθυμητή ενδονουκλεάση περιορισμού. Στην περίπτωση του φαγικού DNA του κλώνου φ443 πραγματοποιήθηκαν δύο διακριτές αντιδράσεις μερικής κατάτμησης με τα ένζυμα *EcoRI* και *HindIII* αντίστοιχα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αλληλεπικαλυπτόμενων θραυσμάτων ποικίλων μεγεθών. Στη συνέχεια τα προϊόντα κατάτμησης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και ακολούθησαν δύο αναλύσεις κατά Southern, χρησιμοποιώντας τους δύο τελο-ειδικούς T3 και T7 RNA ανιχνευτές του φάγου φ443 αντίστοιχα (Εικ. 3.3-5). Σύμφωνα με την οργάνωση του φορέα λ DASH®II, εκατέρωθεν του κλωνοποιημένου ενθέματος εντοπίζονται μοναδικά οι υποκινητές των RNA πολυμερασών T3 και T7 επιτρέποντας τη δημιουργία τελο-ειδικών RNA ανιχνευτών (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι § 2.10.1.2). Οι συγκεκριμένοι ανιχνευτές υβριδοποιούνται με όλα τα θραύσματα



Εικόνα 3.3-5 Ανάλυση κατά Southern των προϊόντων ολικής κατάτμησης του βακτηριοφάγου φ443 με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *NotI*, *HindIII* και *EcoRI* (διαδρομές: N, Hc και Ec αντίστοιχα) και των προϊόντων μερικής κατάτμησης με τις περιοριστικές ενδονουκλεάσες *HindIII* και *EcoRI* (διαδρομές: Hp και Ep αντίστοιχα). Κάθε υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 60°C, με χρήση των σημειωμένων με βιοτίνη τελοειδικών T7 και T3 RNA ανιχνευτών του φ443. [L: Μάρτυρας μοριακού βάρους (SM0331)]

των οποίων το άκρο οριοθετείται από τη θέση αναγνώρισης του ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή του ενθέματος από τον φορέα (*NotI*) έως και μερικές βάσεις εσωτερικά του ενθέματος. Το γεγονός αυτό επέτρεψε τη διεύθετηση των θραυσμάτων κάθε αντίδρασης μερικής κατάτμησης βάσει των άκρων του ενθέματος, όπως αυτά καθορίστηκαν από την υβριδοποίηση των ανιχνευτών, οδηγώντας έτσι στον εντοπισμό των θέσεων αναγνώρισης των ενζύμων περιορισμού (Εικ. 3.3-6) και την κατασκευή του αντίστοιχου χάρτη.

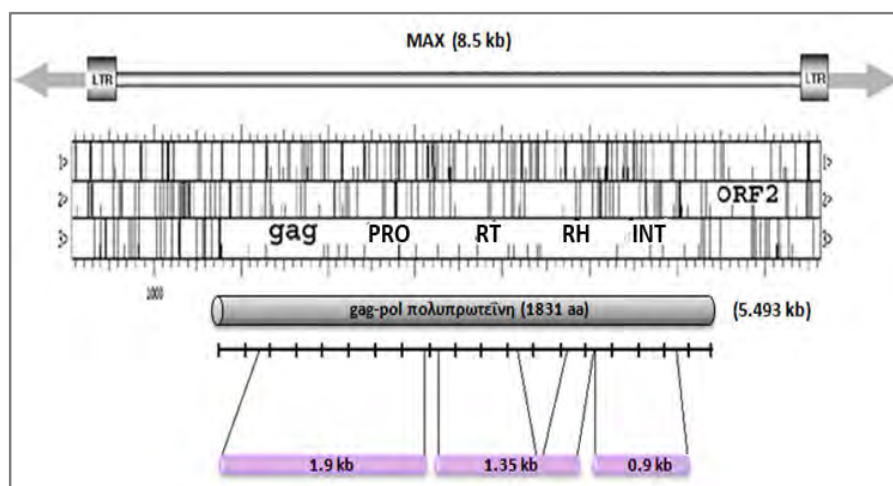


Εικόνα 3.3-6 α,β) Σχηματική απεικόνιση της επεξεργασίας των σημάτων υβριδοποίησης με τους τελειοδικούς ανιχνευτές T3 και T7, για τον καθορισμό των θέσεων αναγνώρισης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Hind*III (H) και *Eco*RI (E) αντίστοιχα. **γ)** Σχηματικός χάρτης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Hind*III και *Eco*RI του φαγικού κλώνου φ443.

Στη συνέχεια σκοπός ήταν ο προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του θετικού θραύσματος, αλλά και των υπόλοιπων θραυσμάτων που εντοπίστηκαν είτε ανοδικά, είτε καθοδικά αυτού βάσει της χαρτογράφησης του ενθέματος, με σκοπό τον καθορισμό της πλήρους αλληλουχίας του ρετρομεταθετού στοιχείου. Προς την κατεύθυνση αυτή οι αντίστοιχες ζώνες απομονώθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης και υποκλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακούς φορείς *pBS-SK(+)* και *pUC19* με κατάλληλα άκρα. Από τη διαδικασία αυτή επιτεύχθηκε η κλωνοποίηση των θραυσμάτων 4.8 kb (*pUC19_EcoRI*), 1.9 kb [*pBS-SK(+)_HindIII*], 1.35kb

και 0.9kb [*pBS-SK(+)_HindIII-EcoRI*]. Δεδομένου του περιορισμού της αποτελεσματικής αλληλούχησης τμημάτων μεγέθους ~800bp, για κάθε κλώνο πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις ανάλυσης της πρωτοδιάταξής τους χρησιμοποιώντας τους διαθέσιμους εμπορικά εξωτερικούς εκκινητές των φορέων M13F και M13R, με εμπρόσθια και ανάστροφη κατεύθυνση αντίστοιχα. Οι αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν, ακολούθως συγκρίθηκαν μέσω του προγράμματος BLASTX προς αναζήτηση ομολογιών. Εκτός του κλώνου 4.8 kb, οι υπόλοιποι τρεις, εμφάνισαν ομοιότητα με περιοχές του αναγνωστικού πλαισίου της πολυπρωτεΐνης *gag-pol*

Εικόνα 3.3-7 Σχηματικός χάρτης της μοριακής οργάνωσης του LTR ρετρομεταθετού στοιχείου MAX της *D. melanogaster*. Το στοιχείο MAX, συνολικού μήκους 8.5 kb, αποτελείται από δύο ομόρροπες LTR περιοχές που οριοθετούν δυο αναγνωστικά πλαίσια (Marsano et al. 2004). Στο σχήμα σημειώνονται επίσης οι υποκλώνοι των 1.9 kb, 1.35 kb και 0.9 kb του βακτηριοφάγου φ443 και οι περιοχές ομολογίας τους με το αναγνωστικό πλαίσιο των 1831 αμινοξέων που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη *gag-pol* του MAX.



του ρετρομεταθετού στοιχείου MAX της *D. melanogaster* (Εικ. 3.3-7). Στην περίπτωση του κλώνου 1.9 kb, του οποίου το μέγεθος ξεπερνούσε τα όρια της αποτελεσματικής αλληλούχησης, πραγματοποιήθηκε κατάτμησή του με χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού *HincII* και υποκλωνοποίηση των επιμέρους θραυσμάτων που προέκυψαν, μεγέθους 1.0 και 0.9 kb αντίστοιχα. Συνολικά η πρωτοδιάταξη του αρχικού κλώνου 1.9 kb καθορίστηκε μετά από συναρμολόγηση των επιμέρους αλληλουχιών των δύο υποκλώνων, με χρήση του προγράμματος Omiga 2.0.

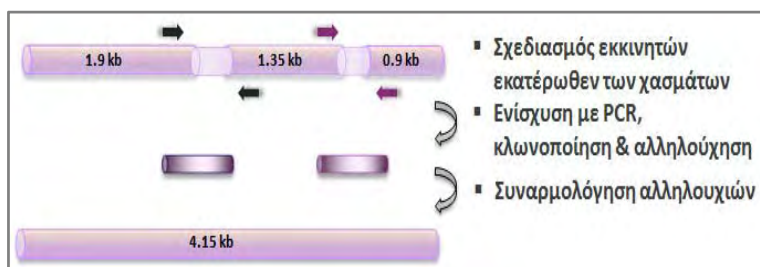
Επιπλέον, κλωνοποιήθηκαν οι παρεμβαλλόμενες αλληλουχίες μεταξύ των τριών κλώνων 1.9 kb, 1.35 kb και 0.9 kb ώστε να προσδιοριστεί η πλήρης πρωτοδιάταξη της συνολικής περιοχής που καλύπτουν. Συγκεκριμένα σχεδιάστηκαν εκκινητές εκατέρωθεν κάθε χάσματος (Εικ. 3.3-8, Παράρτημα: Πίνακας 6.3-5) και τα προϊόντα ενίσχυσής τους μέσω PCR με μήτρα το φαγικό DNA, απομονώθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και κλωνοποιήθηκαν σε πλασμιδιακό φορέα *pBS-SK(+)* με T άκρα. Οι αντιδράσεις ανάλυσης της πρωτοδιάταξης των δύο κλώνων που προέκυψαν, πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τον εμπρόσθιο εξωτερικό εκκινητή M13F του φορέα. Συνολικά η παραπάνω διαδικασία είχε σαν αποτέλεσμα τη συναρμολόγηση της περιοχής των 4.15 kb, που περιελάμβανε το θετικό κλώνο κατά την υβριδοποίηση και καθοδικά αυτού τους δύο κλώνους που οριοθετούν το 3' άκρο του ενθέματος του βακτηριοφάγου φ443.

Τέλος, όσον αφορά το τμήμα 6.0 kb που

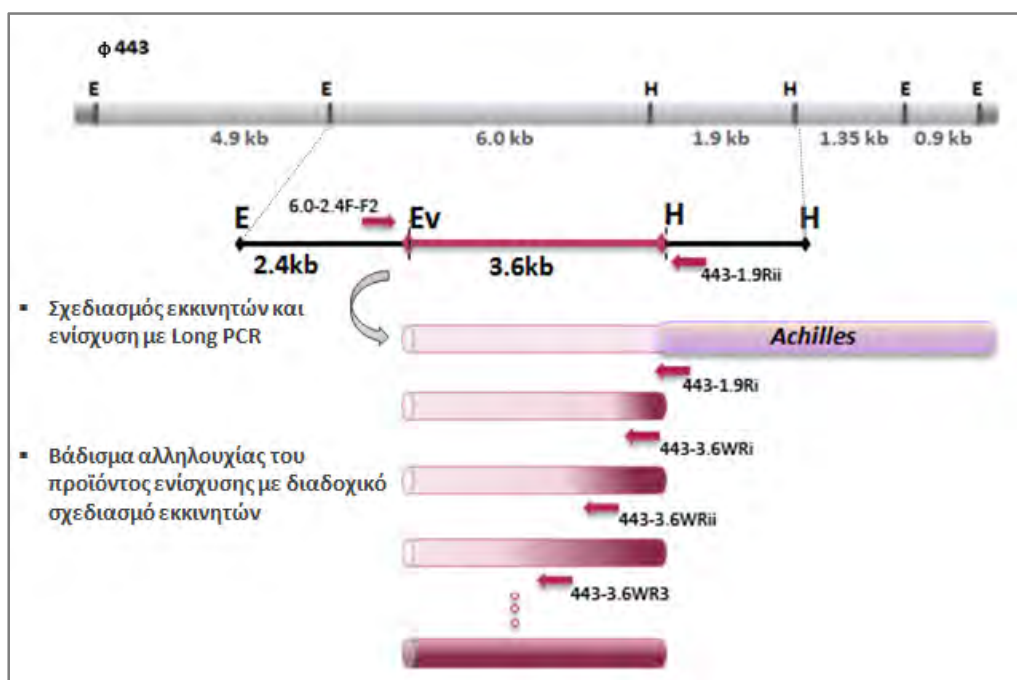
εντοπίζεται ανοδικά του θετικού κλώνου 1.9 kb, δεν ήταν δυνατή η κλωνοποίησή του, γεγονός που πιθανόν να οφείλεται στη δυσαναλογία του μεγέθους του σε σχέση με τους φορείς που χρησιμοποιήθηκαν. Εναλλακτικά, οι προσπάθειες υποκλωνοποίησής του οδήγησαν στη χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού *EcoRV*, από την οποία προέκυψαν δύο θραύσματα μεγέθους 2.4 kb και 3.6 kb αντίστοιχα. Ωστόσο ήταν εφικτή η κλωνοποίηση μόνο του υποκλώνου 2.4 kb, σε πλασμιδιακό φορέα *pBS-SK(+)* με άκρα *HindIII-EcoRV* και ακολούθως η αλληλούχησης του με τους εξωτερικούς εκκινητές του φορέα M13F και M13R.

Η αδυναμία τόσο της κλωνοποίησης του θραύσματος των 3.6 kb αλλά και της κατάτμησής του με ενδονουκλεάσες περιορισμού με σκοπό την υποκλωνοποίηση μικρότερων τμημάτων του, υποδηλώνει τον πιθανό σχηματισμό δευτεροταγών δομών ή δομών φουρκέτας κατά μήκος της αλληλουχίας του, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται ο χειρισμός του. Το γεγονός αυτό κατέστησε αναγκαία την εφαρμογή εναλλακτικών προσεγγίσεων με σκοπό την ανάλυση της αλληλουχίας του θραύσματος των 3.6 kb, ώστε να διερευνηθεί η περιοχή του *Achilles* στην οποία θα εντοπιζόταν δυνητικά η 5' LTR περιοχή και η υπόλοιπη αλληλουχία του ORF που καθορίζει την έναρξη της μεταγραφής.

Για το λόγο αυτό, σχεδιάστηκαν εκκινητές εκατέρωθεν του θραύσματος των 3.6 kb με σκοπό την ενίσχυσή του μέσω Long PCR, χρησιμοποιώντας ως μήτρα το φαγικό DNA. Ακολούθως το προϊόν της



Εικόνα 3.3-8 Σχηματική απεικόνιση των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των χασμάτων μεταξύ των υποκλώνων 1.9 kb, 1.35 kb και 0.9 kb. Η συναρμολόγηση της συνολικής αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος μοριακής ανάλυσης Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd).



Εικόνα 3.3-9 Σχηματική απεικόνιση της πορείας βαδίσματος της αλληλουχίας με ανάστροφη κατεύθυνση (3'-5'). Στην εικόνα παρουσιάζονται οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση της αλληλουχίας των 3.6 kb ανοδικά των κλωνοποιημένων αλληλουχιών του φαγικού κλώνου φ443 και ακολούθως για τη διαδικασία βαδίσματος του προϊόντος ενίσχυσης. Ανάλογη ήταν η πορεία και για την εμπρόσθια κατεύθυνση.

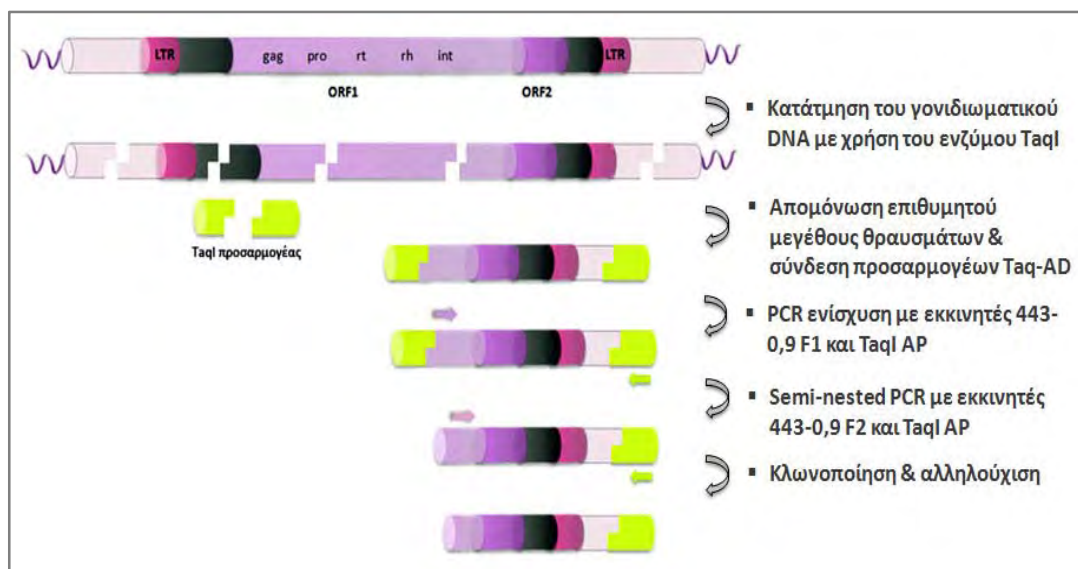
ενίσχυσης, αποτέλεσε τη μήτρα των αντιδράσεων αλληλούχησης, με τους ίδιους εκκινητές. Στη συνέχεια, σύμφωνα με τις αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν, σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές και πραγματοποιήθηκε νέος κύκλος αντιδράσεων αλληλούχησης. Η διαδικασία βαδίσματος (walking) επαναλήφθηκε έως ότου καλύφθηκε πλήρως η αλληλουχία των 3.6 kb (Εικ. 3.3-9). Συνολικά οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.3-3 του Παραρτήματος. Τελικά, η συναρμολόγηση των αλληλεπικαλυπτόμενων αλληλουχιών που προσδιορίστηκαν πραγματοποιήθηκε με χρήση του προγράμματος Omega 2.0.

Μέσω των παραπάνω διαδικασιών επιτεύχθηκε ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του ενθέματος του φαγικού κλώνου φ443 η οποία αντιστοιχεί στην περιοχή του *Achilles*, που οριοθετείται από το 5' άκρο του μέχρι εσωτερικά του ORF. Ο καθορισμός των περιοχών αυτών βασίστηκε στην ομολογία τους με το ρετρομετα-

θετό στοιχείο MAX και την αντίστοιχη δομή του (Marsano et al. 2004).

3.3.5 Ανίχνευση της 3' περιοχής του Achilles

Τα δεδομένα αλληλούχησης του ενθέματος, αποκάλυψαν μερικώς τη δομή του *Achilles*, εφόσον απουσίαζε η 3' περιοχή του. Η αλληλουχία του *Achilles* προφανώς κατατμήθηκε κατά την κατασκευή της βιβλιοθήκης, με αποτέλεσμα η γονιδιωματική περιοχή που κλωνοποιήθηκε στον συγκεκριμένο βακτηριοφάγο να μην περιλαμβάνει ολόκληρο το στοιχείο. Για την ανάκτηση της υπόλοιπης αλληλουχίας που απαιτούνταν για την ολοκλήρωση του ORF και τον καθορισμό του 3' LTR του *Achilles*, ακολουθήθηκε μια τροποποιημένη προσέγγιση (Εικ. 3.3-11) της διαδικασίας που ανέπτυξαν οι Pearce et al. 1999 για την ανίχνευση των LTR περιοχών των ρετρομεταθετών στοιχείων *Ty1-copia*.



Εικόνα 3.3-10 Συνοπτική παρουσίαση της πειραματικής πορείας ανίχνευσης της 3' περιοχής του *Achilles*. Η δυνητική συνολική δομή του *Achilles* που παρουσιάζεται βασίζεται στην αντίστοιχη δομή του ρετρομεταθετού στοιχείου MAX της *D. melanogaster*.

Η πειραματική διαδικασία αρχικά περιελάμβανε τη μερική κατάτμηση του γονιδιωματικού DNA (2 μg) με χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού *TaqI* και τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Ακολούθως για τα θραύσματα μεγέθους μεταξύ 0.7-1.5 kb που απομονώθηκαν μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης του κλάσματος των 5 min, πραγματοποιήθηκε αντίδραση σύνδεσής τους (50 ng εκλούσματος) με 2 pmol δίκλωνων προσαρμογών (adapters) *TaqI-AD*. Ακολούθως στο προϊόν της αντίδρασης σύνδεσης πραγματοποιήθηκε αντίδραση PCR με εκκινητές ομόλογους προς την αλληλουχία του ακραίου τμήματος 0.9 kb του ενθέματος (εμπρόσθιος εκκινητής 443-0.9 F1) και του προσαρμογέα (ανάστροφος εκκινητής, *TaqI AP*) σε αναλογία 5 : 1 (0.8 μg : 0.15 μg) αντίστοιχα (Παράρτημα: Πίνακες 6.3-3 & 4). Η αποτελεσματικότητα των προϊόντων ενίσχυσης ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης. Η περιοχή που περιελάμβανε τμήματα αναμενόμενου μεγέθους από 0.5 – 1.2 kb απομονώθηκε και ποσότητα (1/10 του όγκου) ενισχύθηκε περαιτέρω πραγματοποιώντας semi-nested PCR, ώστε να εξασφαλιστεί η ειδικότητα των

προϊόντων. Για την ενίσχυση χρησιμοποιήθηκαν ο εμπρόσθιος εσωτερικός εκκινητής του τμήματος 0.9kb (443-0.9 F2) και ο ανάστροφος εκκινητής του προσαρμογέα (*TaqI AP*) που χρησιμοποιήθηκε και στην αρχική αντίδραση PCR (Εικ. 3.3-10). Τα προϊόντα ενίσχυσης στη συνέχεια απομονώθηκαν και κλωνοποιήθηκαν σε φορέα *pBS-SK(+)* με T άκρα. Εφόσον τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προέκυψαν, προέρχονταν από συλλογή και όχι από μεμονωμένα τμήματα ενίσχυσης, για την ταυτοποίησή τους ελέγχθηκαν 30 τυχαίοι κλώνοι. Τα αποτελέσματα ανάλυσης της πρωτοδιάταξής τους, οδήγησαν στην ανάκτηση κλώνων που εμφάνισαν ομολογία με την ήδη διαθέσιμη ακραία αλληλουχία του *Achilles*, εμπλουτίζοντάς την καθοδικά, χωρίς ωστόσο να ολοκληρωθεί η δομή του στοιχείου. Για το λόγο αυτό σχεδιάστηκαν νέοι εκκινητές, οι L19-F1 και L19-F2 (Παράρτημα: Πίνακας 6.3-4), που υβριδοποιούνταν στις νέες αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν και πραγματοποιήθηκε δεύτερος κύκλος της πειραματικής διαδικασίας που περιγράφηκε παραπάνω. Η ανάκτηση και ανάλυση των νέων κλώνων, είχε σαν αποτέλεσμα τον προσδιορισμό της πλήρους αλληλουχίας του ORF του *Achilles*, που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη gag-pol του

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

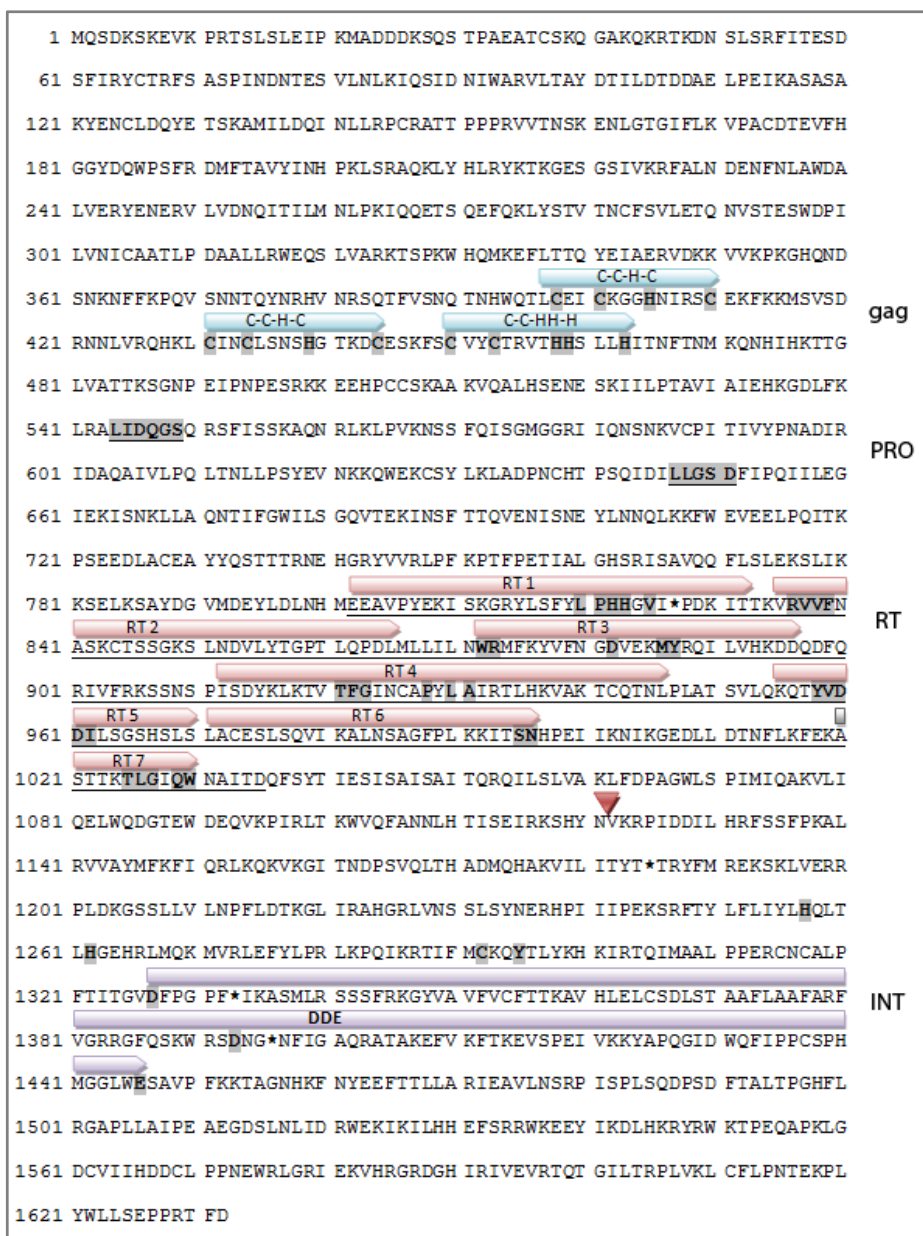
ρετρομεταθετού. Παρ' όλα αυτά δεν ήταν αποτελεσματική η συνεισφορά της διαδικασίας που εφαρμόστηκε για την ανίχνευση του 3' LTR άκρου του ρετρομεταθετού.

3.3.6 Καθορισμός της δομής του *Achilles*

Τα αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης αποκάλυψαν την ύπαρξη ενός αναγνωστικού πλαισίου (ORF) και παράλληλα την αλληλουχία της 5' μη κωδικής περιοχής του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles* ανοδικά του ORF. Το μήκος του ORF του *Achilles*, που οριοθετήθηκε από το κωδικόνιο έναρξης ATG στη θέση 2588 bp της

συνολικής αλληλουχίας έως το κωδικόνιο λήξης TAA, καθορίστηκε ως 7486 bp (Παράρτημα 6.5-1). Κωδικοποιεί δυνητικά μια ενιαία πολυπεπτιδική αλυσίδα μήκους 1632 αμινοξέων της πολυπρωτεΐνης gag-pol (Παράρτημα 6.5-2) με ομοιότητα με την πρόδρομη πολυπρωτεΐνη gag-pol του ρετρομεταθετού στοιχείου MAX της *D. melanogaster*. Στην αμινοξική αυτή αλληλουχία αναγνωρίστηκαν διαδοχικά τα χαρακτηριστικά μοτίβα του γονιδίου gag, καθώς και οι περιοχές που κωδικοποιούν την ασπαρτική πρωτεάση (PRO), την αντίστροφη μεταγραφάση (RT) και την ιντεγκράση (INT). Η σειρά διευθέτησης των γονιδίων αυτών με κατεύθυνση 5' – 3' στο ίδιο αναγνωστικό πλαίσιο είναι χαρακτηριστική των ρετρομεταθετών

Εικόνα 3.3-11 Προβλεπόμενη αμινοξική αλληλουχία του ORF του *Achilles*. Τα αμινοξέα με σκίαση και έντονη γραφή αντιστοιχούν στα συντηρημένα κατάλοιπα των χαρακτηριστικών περιοχών των γονιδίων. Τα βέλη C-C-H-C και C-C-HH-H δηλώνουν τα μοτίβα κυστεΐνης της πρωτεΐνης gag. Τα βέλη RT1-RT7 δηλώνουν τα 7 μοτίβα της RT αντίστοιχα, ενώ σημειώνεται και το συντηρημένο μοτίβο DDE της INT. Η θέση που σημειώνεται με το τρίγωνο (▽), υποδηλώνει την περιοχή έλλειψης της RH. Με αστερίσκο (*) χαρακτηρίζονται τα κωδικόνια λήξης που εντοπίστηκαν εντός της κωδικής αλληλουχίας.



χαρακτηρίζουν τα γονίδια της αντίστροφης μεταγραφάσης (Xiong & Eickbush 1990). Στην Εικόνα 3.3-12 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα συντηρημένα αυτά μοτίβα, μετά από ομοπαράθεση των αμινοξικών αλληλουχιών της περιοχής RT του *Achilles* με άλλα ρετρομεταθετά στοιχεία της οικογένειας BEL-Pao.

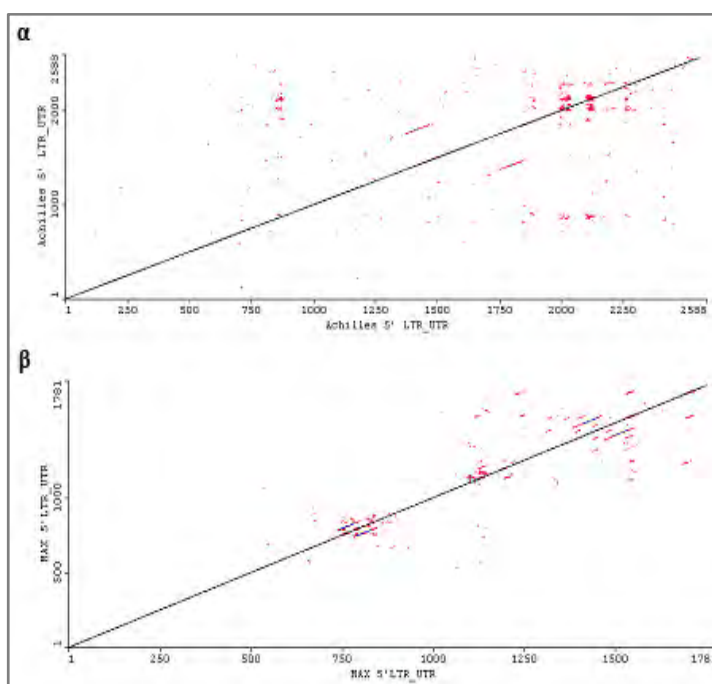
Καθοδικά της RT περιοχής, εντοπίστηκαν τυπικά μοτίβα που χαρακτηρίζουν τις ιντεγκράσες (INT) των ρετροϊών και των ρετρομεταθετών στοιχείων (Khan et al. 1991). Συγκεκριμένα, πρόκειται για το συντηρημένο μοτίβο δακτύλων ψευδαργύρου H-X₄-H-X₂₉-C-X₂-C που εντοπίστηκε στην αμινο-τελική περιοχή της INT και εμπλέκεται στην αναγνώριση των LTR αλληλουχιών, ενώ η κεντρική καταλυτική επικράτεια της πρωτεΐνης φαίνεται να αντιπροσωπεύεται από το μοτίβο DDE. Την περιοχή DDE συνθέτουν τα σταθερά κατάλοιπα ασπαρτικού (D) και γλουταμινικού (E), μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται 52 αμινοξέα. Η επιμηκυμένη καρβοξυτελική περιοχή της ιντεγκράσης που καταλήγει στο κωδικόνιο λήξης, αποτελεί ένα επίσης χαρακτηριστικό που συναντάται στα στοιχεία BEL (Marsano et al. 2004).

Τέλος, ανοδικά του κωδικονίου έναρξης της μεταγραφής ATG του ενιαίου ORF του *Achilles* εντοπίστηκε μια περιοχή σύνθετης δομής που

χαρακτηρίζεται από την παρουσία ομόρροπων και αντίρροπων επαναλήψεων (Εικ. 3.3-13). Η συγκεκριμένη περιοχή δυνητικά αντιπροσωπεύει την 5' UTR, η οποία εκτείνεται μεταξύ του 5' LTR και του πρώτου ORF του γονιδίου *gag*. Αντίστοιχες 5' UTR περιοχές εντοπίζονται σε ρετρομεταθετά στοιχεία τόσο της οικογένειας BEL, όσο και *gypsy* (Marsano et al. 2000, Frame et al. 2001).

Στην 5' UTR περιοχή αμέσως καθοδικά του 5' LTR, εντοπίζεται η θέση δέσμησης του εκκινήτη (Primer Binding Site, PBS) για δράση της RT. Στα ρετρομεταθετά στοιχεία στην περιοχή PBS προσδέδονται κατά κανόνα μόρια tRNA (Wicker et al. 2007). Κατά τη διερεύνηση της διαθέσιμης αλληλουχίας της περιοχής ανοδικά του ORF, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη 14 νουκλεοτιδίων (TCCTTCGAGCC) με ομολογία προς το 3' άκρο του tRNA της τυροσίνης (Tyr-tRNA) της *D. melanogaster*. Παράλληλα, αμέσως ανοδικά της αλληλουχίας αυτής, εντοπίστηκε το τρινουκλεοτίδιο TGG, το οποίο είναι συμπληρωματικό προς το 3' άκρο ACC που προστίθεται μετα-μεταγραφικά στο μόριο του tRNA. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι η συγκεκριμένη αλληλουχία αποτελεί δυνητικά την περιοχή PBS του *Achilles* που λειτουργεί ως θέση δέσμησης του tRNA της τυροσίνης ως εκκινήτη για την έναρξη της αντίστροφης αντιγραφής.

Εικόνα 3.3-13 Πίνακας συσχέτισης σημείων (Dot-plot) των περιοχών που εκτείνονται από το 5' LTR έως το τέλος της 5' UTR, ακριβώς πριν την έναρξη των ORF των ρετρομεταθετών στοιχείων **α)** *Achilles* και **β)** *MAX*, όπως προκύπτει μετά από αυτο-ομοπαράθεση μέσω του προγράμματος μοριακής ανάλυσης Omega 2.0. Τα σημεία που συγκροτούν γραμμή μαύρου χρώματος που διέρχεται από την αρχή των αξόνων υποδηλώνουν την πλήρη στοίχιση της αλληλουχίας της περιοχής, ενώ τα σημεία κόκκινου και μπλε χρώματος υποδηλώνουν την ύπαρξη επαναλαμβανόμενων μοτίβων στην αλληλουχία.



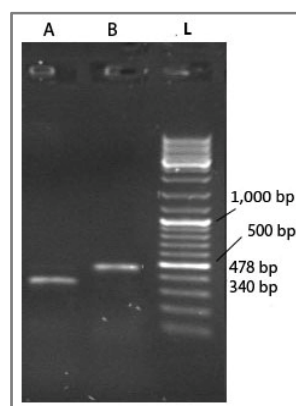
πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις PCR με μήτρα το φαγικό (φ443) και το γονιδιωματικό DNA (*B. oleae*) αντίστοιχα (Παράρτημα: Πίνακας 6.3-5). Ακολούθως τα προϊόντα ενίσχυσης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης. Η περιοχή που εντοπίζεται η έλλειψη της RH, παρεμβάλλεται των θέσεων υβριδοποίησης των εκκινητών. Η διαφορά επομένως του μεγέθους των προϊόντων ενίσχυσης ενδέχεται να υποδηλώνει την ύπαρξη της συγκεκριμένης αλληλουχίας.

Στην αντίδραση ενίσχυσης με μήτρα το φαγικό DNA του κλώνου φ443, το προϊόν είχε το αναμενόμενο μέγεθος μήκους 1,916 bp, σύμφωνα με την αλληλουχία του *Achilles* που καθορίστηκε από την αλληλούχιση του κλώνου φ443 (Εικ. 3.3-15). Το αποτέλεσμα αυτό επιβεβαίωσε την έλλειψη της υπό εξέταση περιοχής στο συγκεκριμένο αντίγραφο. Ωστόσο, κατά την αντίδραση που πραγματοποιήθηκε με μήτρα το γονιδιωματικό DNA, παρατηρήθηκαν πολλαπλά προϊόντα ενίσχυσης, ενώ η κύρια ζώνη ενίσχυσης ήταν μεγέθους περισσότερων από 2,500 bp. Η διαφορά μεγέθους μεταξύ των κύριων προϊόντων ενίσχυσης των δύο αντιδράσεων δυνητικά μπορεί να αντιστοιχεί στο τμήμα του γονιδίου που απουσίαζε από το απομονωμένο αντίγραφο, υποδηλώνοντας ότι μεταξύ των αντιγράφων του *Achilles* στο γονιδίωμα, υπάρχουν στοιχεία που φέρουν την πλήρη περιοχή της RNάσης H.

3.3.8 Έλεγχος ενεργότητας του *Achilles*

Η ενεργότητα ενός ρετρομεταθετού στοιχείου συνίσταται στην ικανότητά του να μετατίθεται μέσω ενδιάμεσων μορίων RNA. Για να ελεγχθεί λοιπόν η ύπαρξη δυνητικά ενεργών στοιχείων *Achilles* στο γονιδίωμα του *B. oleae*, ακολουθήθηκε η μέθοδος ανίχνευσης μεταγράφων μέσω PCR αντίστροφης μεταγραφής (RT-PCR). Στις 2 αντιδράσεις RT-PCR που πραγματοποιήθηκαν με μήτρα ολικό RNA ατόμων του *B. oleae*, χρησιμοποιήθηκαν 2 διακριτά ζεύγη εκκινητών (Παράρτημα: Πίνακας 6.3-2). Στην πρώτη (αντίδραση A) οι εκκινητές 1.9-1.3F και 1.9-1.3R,

ενώ στη δεύτερη (αντίδραση B) οι εκκινητές 1.3-0.9F και 1.3-0.9R, που περιγράφηκαν αντίστοιχα στην Ενότητα 3.3.4 των Αποτελεσμάτων (Εικ. 3.3-8). Ακολούθως από την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης διαπιστώθηκε ότι και στις δύο αντιδράσεις ενίσχυσης, τα προϊόντα είχαν το αναμενόμενο μέγεθος μήκους 340 bp και 478 bp αντίστοιχα (Εικ. 3.3-16), επιβεβαιώνοντας την ύπαρξη μεταγράφων του στοιχείου. Βάσει της αλληλουχίας του *Achilles*, τα δύο ζεύγη υβριδοποιούνταν εντός του ORF και συγκεκριμένα στις περιοχές που εντοπίζονται αμέσως ανοδικά της RT (2,143 – 2,482 bp, αντίδραση A) και ανοδικά της INT (3,582 – 4,059 bp, αντίδραση B) αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι υπάρχουν ενεργά στοιχεία *Achilles*.



Εικόνα 3.3-16 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων RT-PCR ενίσχυσης του ολικού RNA, προς διερεύνηση της ενεργότητας του *Achilles* στο γονιδίωμα. Για την αντίδραση A χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές 1.9-1.3F και 1.9-1.3R, ενώ στη B οι εκκινητές 1.3-0.9F και 1.3-0.9R [L: Μάρτυρας μοριακού βάρους (SM0331)].

3.3.9 Προσδιορισμός των αντιγράφων του ρετρομεταθετού *Achilles* στο γονιδίωμα

Εφόσον καθορίστηκε η δομή του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles* θεωρήθηκε χρήσιμο να προσδιοριστεί ο αριθμός των αντιγράφων του στο γονιδίωμα του εντόμου. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκε ποσοτική PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Όπως περιγράφηκε και στην Ενότητα 3.1.1 των

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

αποτελεσμάτων, η συγκέντρωση της αλληλουχίας στόχου σε ένα δείγμα ελέγχου στην περίπτωση του απόλυτου ποσοτικού προσδιορισμού, εκφράζεται ως απόλυτη τιμή του αριθμού αντιγράφων της και καθορίζεται βάσει της πρότυπης καμπύλης. Στη συγκεκριμένη ανάλυση, για τη κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα δείγματα, διαδοχικές αραιώσεις (160 pg, 8 pg, 400 fg, 20 fg ανά 20μl αντίδρασης) του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pBS-SK(+), στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί το τμήμα 1.9 kb του ενθέματος του φάγου φ443. Ως εκκινητές για την ενίσχυση τόσο των πρότυπων δειγμάτων όσο και του γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκαν οι Achill-F και Achill-R, που ενισχύουν την αλληλουχία των 338 bp του ρετρομεταθετού και στους οποίους στηρίχθηκε επίσης και η διαλογή των κλασμάτων της φαγικής βιβλιοθήκης. Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων δειγμάτων προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά και ακολούθως μετατράπηκαν σε αριθμό αντιγράφων του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (Whelan et al. 2003) βάσει του μοριακού τους βάρους σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{DNA(αντίγραφα)} = \frac{6.022 \times 10^{23} (\text{αντίγραφα/mol}) \times \text{ποσότητα DNA (gr)}}{\text{μέγεθος DNA(bp)} \times 660 (\text{gr/mol})}$$

όπου «μέγεθος DNA», το μέγεθος του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (4,861 bp). Στη συνέχεια οι παραπάνω αριθμοί αντιγράφων

εκφραζόμενοι λογαριθμικά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης σε συνάρτηση με τις τιμές Ct, που καταγράφηκαν με βάση την ανίχνευση του σήματος φθορισμού (Εικ. 3.3-17α,γ.). Για το δείγμα ελέγχου του γονιδιωματικού DNA (15 ng), οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, για να συνεκτιμηθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Παράλληλα συμπεριλήφθηκε και αρνητικό δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιώντας για μήτρα ddH₂O αντί DNA, ώστε να είναι εφικτή η παρακολούθηση της ευαισθησίας της αντίδρασης και της ύπαρξης τυχόν επιμολύνσεων. Την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολούθησε η ανάλυση των προϊόντων της ενίσχυσης μέσω της καμπύλης τήξης. Η παρουσία κορυφών στην ίδια θερμοκρασία τήξης, συνιστά την ενίσχυση απόλυτα ειδικών προϊόντων (Εικ. 3.3-17β) και την απουσία σχηματισμού διμερών των εκκινητών και/ή άλλων μη ειδικών μορίων.

Ο αριθμός των αντιγράφων (N) της αλληλουχίας στόχου στο δείγμα ελέγχου του γονιδιωματικού DNA υπολογίστηκε αυτόματα με βάση την εξίσωση της συνάρτησης της πρότυπης καμπύλης, σύμφωνα με την τιμή Ct που προσδιορίστηκε για την αρχική ποσότητα (15 ng) γονιδιωματικού DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα (Πίνακας 3.3-2). Ακολούθως, δεδομένου του μεγέθους του απλοειδούς γονιδιώματος του δάκου, όπως αυτό εκτιμήθηκε στην παρούσα μελέτη και θεωρήθηκε ίσο με 0.352 pg (3.22 × 10⁸bp),

Πίνακας 3.3-2 Δεδομένα ανάλυσης Real-time PCR κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων του στοιχείου *Achilles*.

	Συγκέντρωση DNA(ng) ^α	Εξίσωση πρότυπης καμπύλης	Αριθμός αντιγράφων ^β	Αριθμός αντιγράφων ανά απλοειδές γονιδίωμα ^γ
<i>B. oleae</i>	15	$y = -3.728 \times \log(x) + 41.03$	1,797,630 ± 2,893*	42

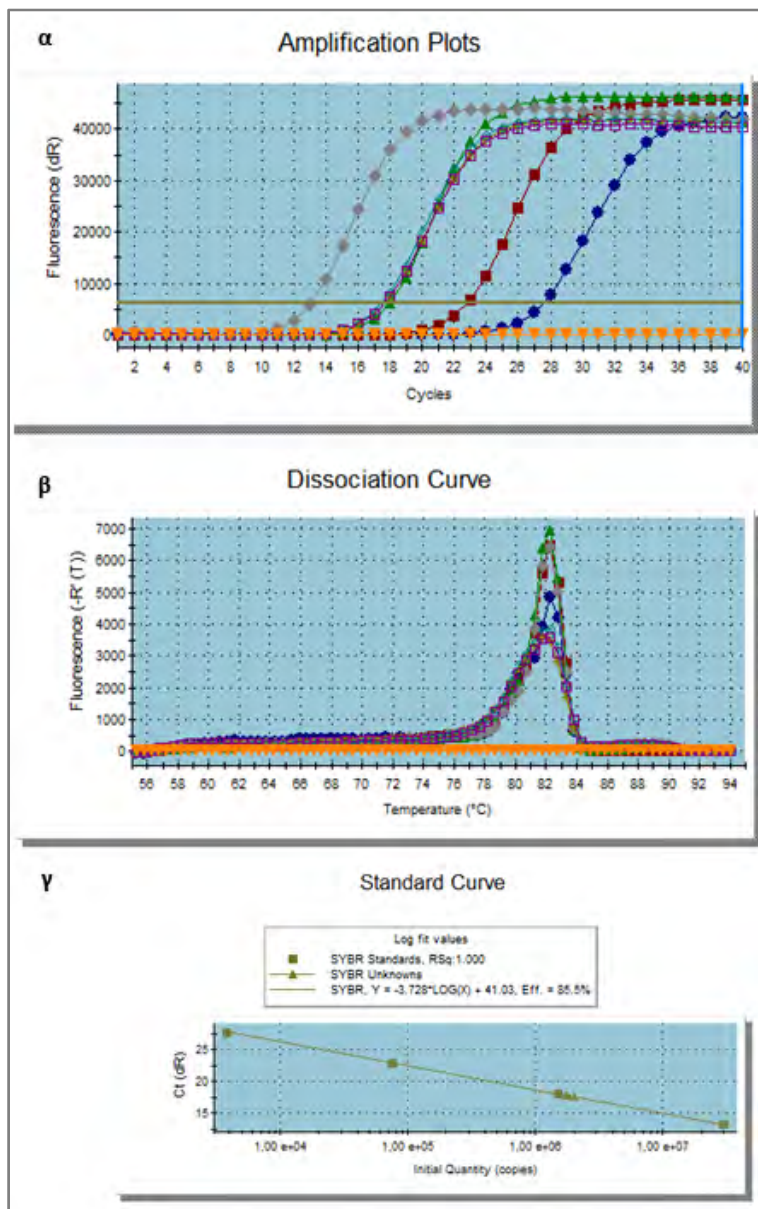
^α Αρχική συγκέντρωση μήτρας γονιδιωματικού DNA (ng) του *B. oleae* που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις των άγνωστων δειγμάτων.
^β Μέσος όρος του αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου Achill400 που καθορίστηκε για την αρχική συγκέντρωση της μήτρας γονιδιωματικού DNA, βάσει της πρότυπης καμπύλης.
^γ Μέγεθος απλοειδούς γονιδιώματος του *B. oleae*: 0.352 pg
* Τυπικό σφάλμα (SE, Standard Error) για σύνολο τριών επαναλήψεων (n=3).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

υπολογίστηκαν με αναγωγή τα αντίγραφα του ρετρομεταθετού στοιχείου που εντοπίζονται σε αυτό. Σύμφωνα με τον παραπάνω υπολογισμό,

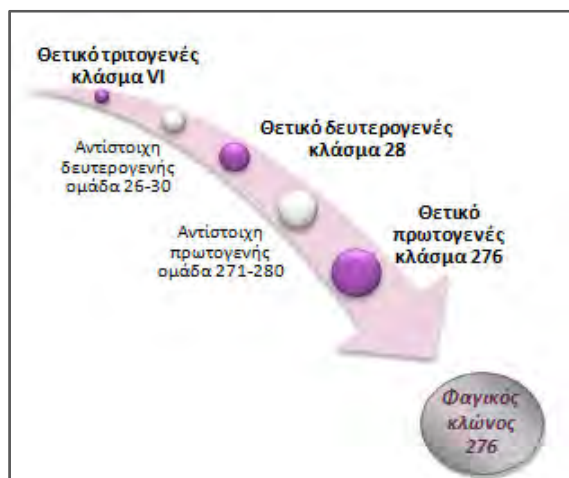
εκτιμήθηκε ότι εντοπίζονται 42 αντίγραφα του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles* ανά απλοειδές γονιδίωμα του δάκου.

Εικόνα 3.3-17 Σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων της Real-time PCR για τον καθορισμό των αντιγράφων του *Achilles* στο γονιδίωμα. **α)** Καμπύλες ενίσχυσης (amplification plots) της αλληλουχίας στόχου του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles*, που εκφράζουν την αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού (fluorescence) σε συνάρτηση με τους κύκλους της αντίδρασης (cycles). Οι τρεις εμφανόμενες καμπύλες αντιστοιχούν στα άγνωστα δείγματα γονιδιωματικού DNA, τα οποία ελέγχθηκαν εις τριπλούν. Οι υπόλοιπες καμπύλες αντιστοιχούν στις αραιώσεις των πρότυπων δειγμάτων του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου. Το δείγμα αρνητικού ελέγχου (NTC) αντιστοιχεί στην οριζόντια καμπύλη που δεν ξεπερνά το οριακό επίπεδο (threshold). Το επίπεδο threshold αντιπροσωπεύεται από την παράλληλη με τον άξονα χ γραμμή, ενώ τα σημεία τομής του με τις καμπύλες ενίσχυσης αντιστοιχούν στις τιμές Ct. **β)** Καμπύλες τήξης (dissociation curve) των προϊόντων ενίσχυσης. Η εμφάνιση μοναδικών κορυφών στην ίδια θερμοκρασία τήξης, συνιστά την ενίσχυση απόλυτα ειδικών προϊόντων. Η απουσία κορυφής στο δείγμα NTC υποδηλώνει την έλλειψη επιμολύνσεων της αντίδρασης. **γ)** Πρότυπη καμπύλη (standard curve) του αριθμού αντιγράφων των πρότυπων δειγμάτων εκφρασμένων λογαριθμικά σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές Ct. Τα τρίγωνα σημεία στη γραμμή τάσης, αντιπροσωπεύουν τα δείγματα ελέγχου του γονιδιωματικού DNA.



3.4 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΔΟΡΥΦΟΡΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ BOR300 ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Κατά την ανάλυση των φαγικών κλώνων που απομονώθηκαν από τη διαλογή των κλασμάτων της φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου με σκοπό τη διαλεύκανση της μοριακής οργάνωσης του ρετρομεταθετού στοιχείου *Achilles*, αποκαλύφθηκε η ύπαρξη μιας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας 300 bp, που ονομάστηκε BoR300. Η επανάληψη αυτή χαρακτηρίστηκε ως δορυφορική βάση της δομής και της οργάνωσής της και εμφάνισε υψηλή ειδικότητα (species-specific) στο δάκο. Επιπλέον ελέγχθηκε το πρότυπο κατανομής της στα χρωμοσώματα του εντόμου και υπολογίστηκε ο βαθμός συμμετοχής της στη δομή του γονιδιώματος.



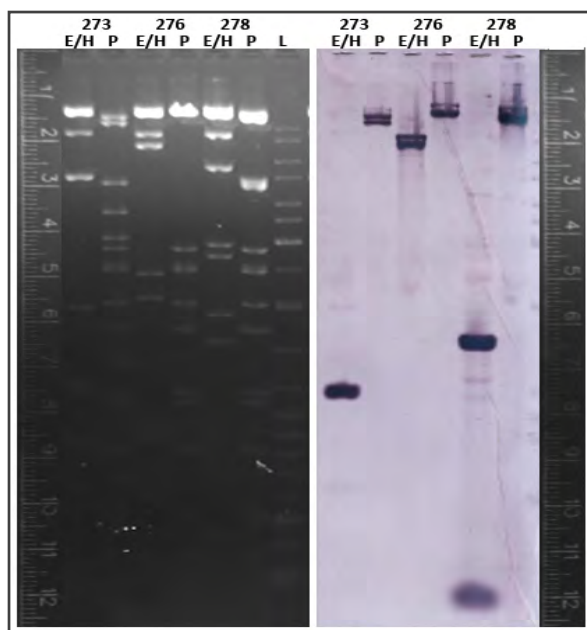
Εικόνα 3.4-1 Σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων διαλογής προεπιλεγμένων κλασμάτων μέσω PCR της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου που οδήγησαν στην απομόνωση του φαγικού κλώνου φ276. Επίσης από την ίδια πρωτογενή ομάδα (κλάσματα 271-280) προέκυψαν επιπλέον τα τελικά κλάσματα 273 και 278, που οδήγησαν μέσω διαλογής στην απομόνωση των φαγικών κλώνων φ273 και φ278.

3.4.1 Διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης

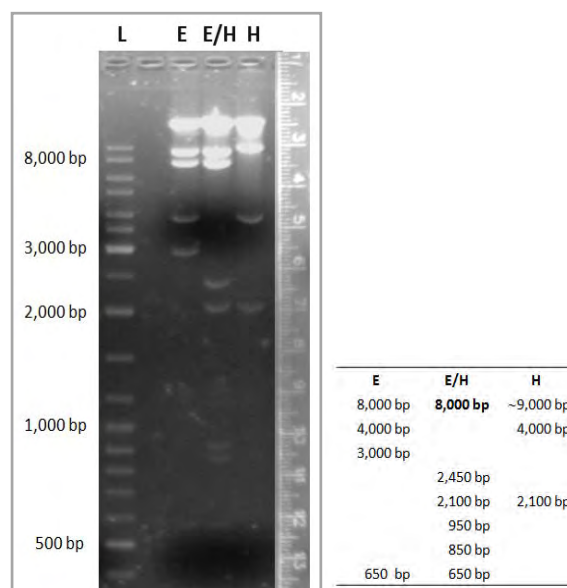
Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα, ο αρχικός ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε για τη διαλογή της φαγικής γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του δάκου, το τμήμα 1.2 kb του Υ-ειδικού κλώνου 5FF (1.2-5FF), περιείχε επιπλέον και αλληλουχίες που μεταγενέστερα αποδείχθηκε ότι δεν ανήκαν στο ρετρομεταθετό *Achilles* (βλέπε Αποτελέσματα §3.3.2 και Πίνακας 3.3.1). Κατά την αρχική χρήση αυτού του ανιχνευτή, απομονώθηκαν βακτηριοφάγοι που αναμενόταν να περιέχουν το ρετρομεταθετό στοιχείο. Η πορεία της πειραματικής διαδικασίας που ακολουθήθηκε, περιγράφεται αναλυτικά στην ενότητα 3.3.2 των Αποτελεσμάτων, με μόνη διαφορά τη χρήση των εκκινητών 1.2/5FF-F και 1.2/5FF-R (Παράρτημα: Πίνακας 6.3-1). Τα αποτελέσματα της διαδοχικής ενίσχυσης των κλασμάτων της βιβλιοθήκης και τελικά της διαλογής με ανιχνευτή το τμήμα 1.2-5FF παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.4-1.

3.4.2 Δομική ανάλυση και χαρτογράφηση του απομονωμένου φαγικού κλώνου φ276

Ακολουθώντας την ίδια διαδικασία όπως αυτή περιγράφηκε στην Ενότητα 3.3.3 των Αποτελεσμάτων, ο βακτηριοφάγος φ276 που προέκυψε κατά τη διαλογή της βιβλιοθήκης πολλαπλασιάστηκε και απομονώθηκε το φαγικό του DNA. Στη συνέχεια, από την ανάλυση κατά Southern που πραγματοποιήθηκε με χρήση του ανιχνευτή 1.2-5FF στα θραύσματα που προέκυψαν από την κατάτμηση με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *EcoRI* και *HindIII*, εντοπίστηκε μια ζώνη υβριδοποίησης του ανιχνευτή μεγέθους 8.0 kb (Εικ. 3.4-2 & 3).



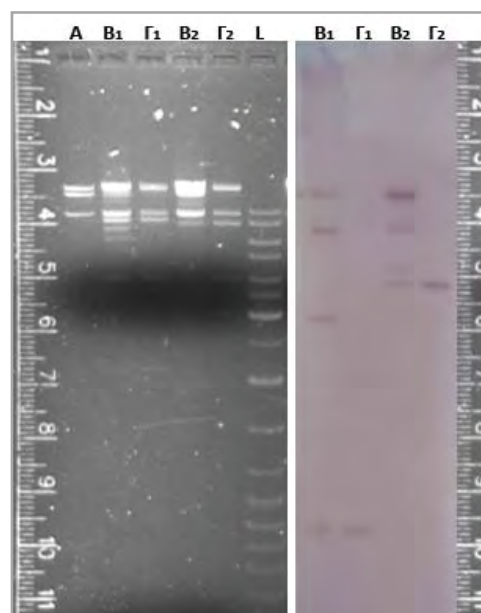
Εικόνα 3.4-2 Ανάλυση κατά Southern των προϊόντων ολικής κατάρτησης των βακτηριοφαγικών κλώνων 273, 276 και 278 με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *EcoRI*-*HindIII* (E/H) και *PstI* (P). Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 65°C με ανιχνευτή τον σημασμένο με βιοτίνη κλώνο 1.2-5FF. [L: Μάρτυρας μοριακού βάρους (SM0331)]



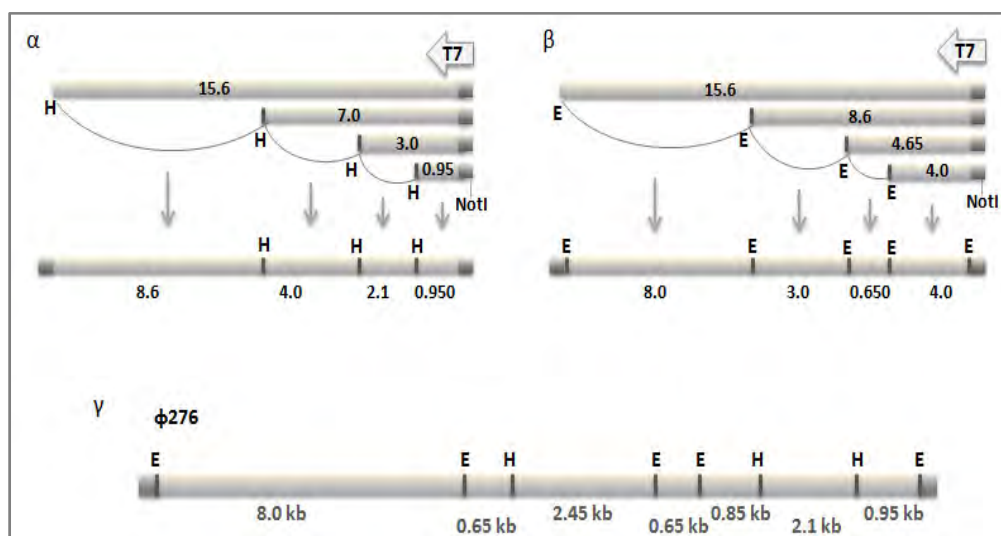
Εικόνα 3.4-3 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων κατάρτησης του βακτηριοφάγου φ276 με χρήση των ενδονουκλεασών περιορισμού *EcoRI* (E) και *HindIII* (H) μεμονωμένα, αλλά και το συνδυασμό τους (E/H). Στον πίνακα παρουσιάζονται τα μεγέθη των θραυσμάτων που προέκυψαν από τις τρεις αντιδράσεις κατάρτησης του φαγικού κλώνου. Με έντονη γραφή σημειώνεται το θετικό θραύσμα κατά υβριδοποίηση. [L: Μάρτυρας μοριακού βάρους (SM0331)]

Η διευθέτηση των θραυσμάτων του ενθέματος για τον κλώνο φ276 επιτεύχθηκε μετά από ανάλυση κατά Southern των προϊόντων μερικής κατάρτησης, με χρήση του τελο-ειδικού (end-specific) T7 RNA ανιχνευτή του φαγικού κλώνου φ276. Η πειραματική διαδικασία της χαρτογράφησης και της κατασκευής του τελο-ειδικού ανιχνευτή πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφηκε στην Ενότητα 3.3.4 των Αποτελεσμάτων (Εικ. 3.4-4).

Τελικά από την εφαρμογή της παραπάνω προσέγγισης, καθορίστηκαν οι θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού *EcoRI* και *HindIII* (Εικ. 3.4-4&5) και συνεπώς ο εντοπισμός των θραυσμάτων κατά μήκος του ενθέματος.



Εικόνα 3.4-4 Ανάλυση κατά Southern των προϊόντων ολικής κατάρτησης του βακτηριοφάγου φ276 με τις *NotI*, *HindIII* και *EcoRI* (διαδρομές: A, Γ1 και Γ2 αντίστοιχα) και των προϊόντων μερικής κατάρτησης με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *HindIII* και *EcoRI* (διαδρομές: B1 και B2 αντίστοιχα), με χρήση του τελοειδικού T7 RNA ανιχνευτή του φ276.



Εικόνα 3.4-5 α, β) Σχηματική απεικόνιση της επεξεργασίας των σημάτων υβριδοποίησης με τον τελειδικό ανιχνευτή T7, για τον καθορισμό των θέσεων αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού *Hind*III (H) και *Eco*RI (E) αντίστοιχα. γ) Σχηματικός χάρτης των περιοριστικών ενδονουκλεασών *Hind*III και *Eco*RI του φαγικού κλώνου φ276.

3.4.3 Ανάλυση πρωτοδιάταξης του κλώνου υβριδοποίησης

Το θραύσμα των 8.0 kb που εμφάνισε σήμα κατά την υβριδοποίηση, λόγω της ομολογίας του με τον ανιχνευτή 1.2-5FF, θα μπορούσε λόγω μεγέθους δυνητικά να περιλαμβάνει ακέραιο το ρετρομεταθετό στοιχείο *Achilles*. Για το λόγο αυτό κρίθηκε αναγκαία η αλληλούχησή του. Αρχικά το τμήμα κλωνοποιήθηκε σε φορέα pUC19 με άκρα *Eco*RI και ακολούθως πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις ανάλυσης της πρωτοδιάταξής του, με χρήση των εξωτερικών εκκινητών του φορέα M13F και M13R. Κάθε αντίδραση οδήγησε στον προσδιορισμό αλληλουχίας μήκους 800 bp. Κατά τη σύγκριση των παραπάνω αλληλουχιών με πρωτεϊνικές και νουκλεοτιδικές βάσεις δεδομένων μέσω των προγραμμάτων BLASTX και BLASTN αντίστοιχα, δεν διαπιστώθηκε κάποια ομοιότητα με τις κατατεθειμένες ακολουθίες.

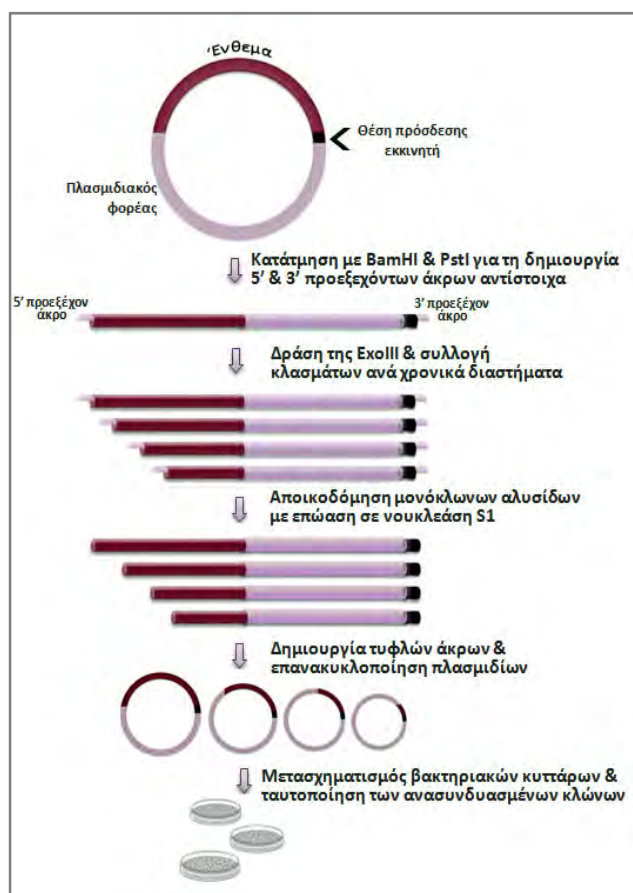
Για την πλήρη κάλυψη της αλληλουχίας του προς ανάλυση κλώνου, επιχειρήθηκε η κατάτμηση του σε επιμέρους θραύσματα, με σκοπό την υποκλωνοποίηση και περαιτέρω την αλληλούχισή τους. Ωστόσο κάτι τέτοιο δεν κατέστη εφικτό, καθώς για τις ενδονουκλεάσες περιορισμού που ελέγχθηκαν είτε δεν εντοπίστηκαν θέσεις

αναγνώρισης (*Apa*I, *Hinc*II, *Kpn*I, *Pst*I, *Pvu*II, *Sac*I, *Sal*I, *Sma*I, *Xba*I, *Afa*I, *Hpa*II, *Dpn*II, *Mn*I, *Hha*I), είτε προέκυψαν πολλαπλά μικρά θραύσματα ίδιου μεγέθους γεγονός που εμπόδιζε το διαχωρισμό και την υποκλωνοποίησή τους (*Alu*I, *Hae*III, *Taq*I).

Εξαιτίας των παραπάνω περιορισμών που υπόκειται ο χειρισμός της αλληλουχίας των 8.0 kb, επιλέχθηκε το πρωτόκολλο δημιουργίας διαδοχικών ελλείψεων του κλωνοποιημένου ενθέματος, μονής κατεύθυνσης και καθορισμένου μεγέθους, με χρήση της εξωνουκλεάσης III (Εικ. 3.4-6). Για την αρχική ολική κατάτμηση του κλώνου (10 μg) χρησιμοποιήθηκαν τα ένζυμα περιορισμού *Bam*HI και *Pst*I, που δημιουργούν αντίστοιχα 5' και 3' προεξέχοντα άκρα, ικανοποιώντας τις απαραίτητες συνθήκες για τη δράση της εξωνουκλεάσης και την προστασία της περιοχής υβριδισμού του εκκινητή αλληλούχησης.

Για να ελεγχθεί η αποτελεσματικότητα της μεθόδου, τα κλάσματα που συλλέχθηκαν ανά χρονικά διαστήματα 2.5 min, ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου και παρατηρήθηκε ότι το μέγεθος των πλασμιδιακών υποκλώνων ελαττώνεται σταδιακά κατά 525 bp σύμφωνα με το σταθερό ρυθμό κατάτμησης 210 bp/min σε θερμοκρασία 30°C (Εικ. 3.4-7).

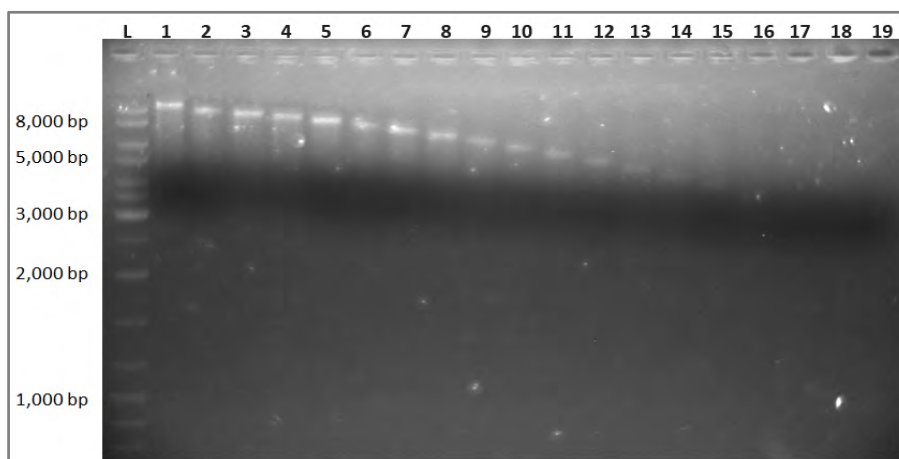
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ



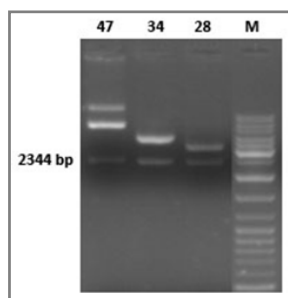
Εικόνα 3.4-6 Συνοπτική παρουσίαση της πειραματικής πορείας για τη δημιουργία διαδοχικών ελλείψεων του ενθέματος του κλώνου 8.0 kb, με χρήση του ενζύμου εξωνουκλεάση III (EcoIII).

Στη συνέχεια αναμείχθηκαν τα δείγματα 6, 7, 8 και 9, των οποίων η συνολική αλληλουχία ενθέματος και πλάσμιδίου εμφανίστηκε να έχει μήκος 7.55 kb, 6.9 kb, 6.35 kb και 5.8kb αντίστοιχα. Αφού ολοκληρώθηκε η πειραματική διαδικασία και επανακυκλοποιήθηκαν τα επιθυμητά πλάσμιδια του κλάσματος, ακολούθησε μετασχηματισμός βακτηριακών κυττάρων. Τελικά κατά την ταυτοποίηση των ανασυνδυασμένων κλώνων, επιβεβαιώθηκε η επιτυχής κλωνοποίηση τριών από τα τέσσερα δείγματα που αποτέλεσαν το κλάσμα ελέγχου (Εικ. 3.4-8).

Για τους παραπάνω υποκλώνους του αρχικού τμήματος των 8.0 kb, που αναφέρονται με τους κωδικούς 28, 34, και 47, ακολούθησε ανάλυση της πρωτοδιάταξής τους με χρήση των εξωτερικών εκκινητών του φορέα rUC19, M13F και M13R. Ωστόσο, επιτυχή αποτελέσματα αλληλούχισης λήφθηκαν μόνο για τους υποκλώνους 28 και 34. Οι αναζητήσεις ομοιοτήτων των αλληλουχιών τους μέσω των προγραμμάτων BLASTX και BLASTN αντίστοιχα, δεν απέφεραν κάποια στατιστικά σημαντική ομοιότητα με κατατεθειμένες αλληλουχίες στις βάσεις δεδομένων, συνιστώντας ότι πρόκειται για μια νέα αλληλουχία άγνωστης λειτουργίας.



Εικόνα 3.4-7 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των κλασμάτων που συλλέχθηκαν μετά τη δράση της εξωνουκλεάσης III ανά χρονικά διαστήματα των 2.5 min, με αποτέλεσμα το μέγεθος των πλάσμιδιακών υποκλώνων να ελαττώνεται σταδιακά κατά 525 bp. [L: Μάρτυρας μοριακού βάρους (SM0331)].

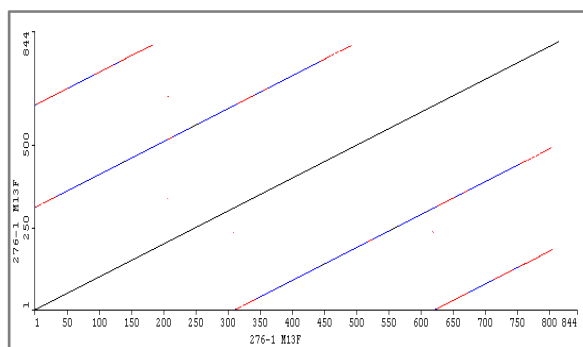


	pUC19	47	34	28
Μέγεθος PvuII θραυσμάτων	2,344 bp	2,344 bp	2,344 bp	2,344 bp
Μέγεθος ενθέματος	-	4,800 bp	3,650 bp	3,100 bp

Εικόνα 3.4-8 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αгарόζης 1% των προϊόντων κατάτμησης των υποκλώνων 28, 34, και 47 με χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού PvuII, για την επιβεβαίωση της επιτυχούς κλωνοποίησής τους. Στον πίνακα παρουσιάζονται τα μεγέθη των θραυσμάτων που προέκυψαν, καθώς και του μεγέθους του ενθέματος κάθε υποκλώνου. [M: Μάρτυρας μοριακού βάρους (SM0331)]

3.4.4 Απομόνωση και ανάλυση της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας BoR300

Συγκρίνοντας τις ακραίες αλληλουχίες τόσο του αρχικού κλώνου 8.0 kb όσο και των υποκλώνων 28 και 34 με dot-plot ανάλυση μέσω του προγράμματος μοριακής ανάλυσης Omega 2.0 (Oxford Molecular Ltd.), διαπιστώθηκε η παρουσία ενός μοτίβου ~300 bp που επαναλαμβανόταν



Εικόνα 3.4-9 Πίνακας συσχέτισης σημείων (Dot-plot) της 5' αλληλουχίας του κλωνοποιημένου ενθέματος των 8.0 kb του βακτηριοφάγου φ276 (276-1), μετά από επεξεργασία μέσω του προγράμματος μοριακής ανάλυσης Omega 2.0 (Oxford Molecular Ltd.). Ο εντοπισμός παράλληλων και ρυθμικών (ανά 300 bp περίπου) γραμμών υποδηλώνει την ύπαρξη επαναλαμβανόμενου εν σειρά μοτίβου κατά μήκος της αλληλουχίας.

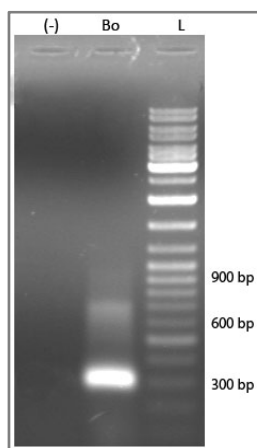
συνεχόμενα σε όλο το μήκος των κλώνων 28 και 34 αλλά και στα αλληλουχημένα άκρα του κλώνου των 8 kb. (Εικ. 3.4-9). Το γεγονός αυτό ενίσχυσε την εκτίμηση ότι καταλαμβάνει μεγάλη περιοχή του γονιδιώματος και κρίθηκε σημαντική η περαιτέρω διερεύνηση της.

Κατά την επεξεργασία της αλληλουχίας μέσω του προγράμματος Omega 2.0 εντοπίστηκαν θέσεις αναγνώρισης για ένζυμα περιορισμού που τέμνουν αλληλουχίες των 4 bp. Μεταξύ αυτών, η ενδονουκλεάση περιορισμού HaeIII εμφάνισε τη δυνατότητα κατάτμησης στην αρχή του συντηρημένου μοτίβου (Εικ. 3.4-10). Το θραύσμα μεγέθους 298 bp που προέκυψε, από την κατάτμηση του υποκλώνου 34 με το παραπάνω ένζυμο, απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε σε φορέα pBS-SK(+) με τυφλά άκρα EcoRV. Το μονομερές της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας ονομάστηκε BoR300.



Εικόνα 3.4-10 Αλληλουχία του κλώνου BoR300. Με βέλη σημειώνονται οι θέσεις υβριδισμού των εκκινητών BoR300-R (ανάστροφος) και BoR300-F (εμπρόσθιος) αντίστοιχα, καθώς επίσης και οι θέσεις αναγνώρισης των ενδονουκλεασών περιορισμού HaeIII και TaqI.

Για να διερευνηθεί εάν πρόκειται για εν σειρά επαναλήψεις, σχεδιάστηκαν εκκινητές που κατευθύνονται εξωτερικά του ενθέματος (Εικ. 3.4-10, Παράρτημα: Πίνακας 6.4-1) και ακολούθησε ενίσχυση γονιδιωματικού DNA. Τα προϊόντα της ενίσχυσης είχαν το αναμενόμενο μέγεθος του μοτίβου, ενώ σε μικρότερο βαθμό ενισχύθηκαν και αλληλουχίες πολλαπλάσιου μεγέθους (600 bp και 900 bp), προφανώς ως αποτέλεσμα ενίσχυσης πολλαπλάσιων μοτίβων.



Εικόνα 3.4-11

Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% των προϊόντων PCR ενίσχυσης της αλληλουχίας BoR300 γονιδιωματικού DNA του δάκου (Bo) με τους εκκινητές BoR-F/R [L: Μάρτυρας μοριακού βάρους (SM0331)].

Ο καθορισμός της πρωτοδιάταξης της αλληλουχίας BoR300 έδωσε τη δυνατότητα αναζήτησης ομοιοτήτων στις βάσεις δεδομένων μέσω των προγραμμάτων BLASTN και BLASTX, χωρίς ωστόσο να προσδιοριστεί κάποια στατιστικά σημαντική ομοιότητα με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες. Κατά την επεξεργασία της αλληλουχίας BoR300 μέσω του προγράμματος Omega 2.0 καθορίστηκε το ποσοστό των βάσεων αδενίνης και θυμίνης (A+T) ως 60.4%. Η υψηλή συγκέντρωση των δύο αυτών βάσεων αποτελεί ιδιαίτερο χαρακτηριστικό των δορυφορικών αλληλουχιών, που εμφανίζεται ως αποτέλεσμα της εξέλιξής τους (Randig et al. 2002). Επιπλέον, οι διαθέσιμες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες του μονομερούς συγκρίθηκαν μέσω του διαδικτυακού προγράμματος ClustalW αποκαλύπτοντας την ύπαρξη σημειακών μεταλλάξεων αλλά ταυτόχρονα τη διατήρηση υψηλής ομοιογένειας μεταξύ των επαναλήψεων (Εικ. 3.4-12.), η οποία κυμαίνεται μεταξύ 88% - 97%.

3.4.5 Καθορισμός των αντιγράφων της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300 στο γονιδίωμα του δάκου

Για τον καθορισμό των αντιγράφων της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας BoR300 πραγματοποιήθηκε ποσοτικός προσδιορισμός μέσω Real-time PCR, ακολουθώντας δύο διαφορετικές



Εικόνα 3.4-12 Συγκριτική ομοπαράθεση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του πλήρους επαναλαμβανόμενου μοτίβου σε τέσσερις κλώνους. Οι κωδικοί των επαναλήψεων και οι κλώνοι εντοπισμού τους ήταν οι ακόλουθοι:

- i) 276-1F_1, 276-1F_2, 276-1R_1 και 276-1R_2: ακραίες αλληλουχίες του κλώνου των 8.0 kb, ii) 34exo_1, 34exo_2: ακραία αλληλουχία του υποκλώνου 34, iii) 28exo_1: ακραία αλληλουχία του υποκλώνου 28, iv) BoR: αλληλουχία του κλώνου BoR300.

προσεγγίσεις. Στη πρώτη προσέγγιση, ο αριθμός αντιγράφων της αλληλουχίας στόχου κατασκευάστηκε βάσει της πρότυπης καμπύλης αναφοράς, εκφραζόμενος ως απόλυτη τιμή, όπως περιγράφηκε και στην Ενότητα 3.1.1 των Αποτελεσμάτων. Στη συγκεκριμένη ανάλυση, για την κατασκευή της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιήθηκαν ως πρότυπα δείγματα, διαδοχικές αραιώσεις (60 fg, 0.6 fg και 0.06 fg ανά 20 μl αντίδρασης) του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pUC19 στο οποίο

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

είχε κλωνοποιηθεί το τμήμα 8.0 kb του ενθέματος του φάγου φ276. Ως εκκινητές για την ενίσχυση τόσο των πρότυπων δειγμάτων όσο και του γονιδιωματικού DNA χρησιμοποιήθηκαν οι BoR300-F και BoR300-R, που ενισχύουν το μονομερές των 298 bp της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων δειγμάτων προσδιορίστηκαν φασματοφωτομετρικά και ακολούθως μετατράπηκαν σε αριθμό αντιγράφων του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (Whelan et al. 2003) βάσει του μοριακού τους βάρους σύμφωνα με τη σχέση:

$$\text{DNA(αντίγραφα)} = \frac{6.022 \times 10^{23} (\text{αντίγραφα/mol}) \times \text{ποσότητα DNA (gr)}}{\text{μέγεθος DNA(bp)} \times 660 (\text{gr/mol})}$$

όπου «μέγεθος DNA», το μέγεθος του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (10,686 bp).

Στη συνέχεια οι αριθμοί αυτοί εκφραζόμενοι λογαριθμικά χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή καμπύλης σε συνάρτηση με τις τιμές Ct, που καταγράφηκαν με βάση την ανίχνευση του σήματος φθορισμού (Εικ. 3.4-13α,γ). Το δείγμα ελέγχου του γονιδιωματικού DNA (10 pg), ελέγχθηκε εις τριπλούν σε ισάριθμες αντιδράσεις κατά τη διεξαγωγή του πειράματος, για να συνεκτιμηθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων. Επιπλέον συμπεριλήφθηκε και αρνητικό δείγμα ελέγχου, χρησιμοποιώντας για μήτρα ddH₂O αντί DNA, ώστε να είναι εφικτή η παρακολούθηση της ευαισθησίας της αντίδρασης και της ύπαρξης τυχόν

επιμολύνσεων. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης ακολούθησε η ανάλυση των προϊόντων της ενίσχυσης μέσω της καμπύλης τήξης. Η παρουσία κορυφών στην ίδια θερμοκρασία τήξης, υποδηλώνει την ενίσχυση απόλυτα ειδικών προϊόντων (Εικ. 3.4-13β) και την απουσία σχηματισμού διμερών των εκκινητών και/ή άλλων μη ειδικών μορίων.

Ο αριθμός των αντιγράφων (N) της αλληλουχίας στόχου BoR300 για το δείγμα ελέγχου του γονιδιωματικού DNA υπολογίστηκε αυτόματα με βάση την εξίσωση της συνάρτησης της πρότυπης καμπύλης που προέκυψε, σύμφωνα με την τιμή Ct που προσδιορίστηκε για την αρχική ποσότητα (10 pg) του γονιδιωματικού DNA που χρησιμοποιήθηκε ως μήτρα (Πίνακας 3.4-1). Σύμφωνα με τον αριθμό αντιγράφων που υπολογίστηκε κατά την ενίσχυση της αλληλουχίας BoR300 σε 10 pg της μήτρας του γονιδιωματικού DNA, προσδιορίστηκαν με αναγωγή τα αντίγραφα της αλληλουχίας BoR300 που εντοπίζονται ανά απλοειδές γονιδίωμα (0.352 pg). Βάσει του παραπάνω υπολογισμού, εκτιμήθηκε ότι εντοπίζονται 0.266×10^4 αντίγραφα της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας BoR300 ανά απλοειδές γονιδίωμα του δάκου. Επιπλέον, δεδομένου του μεγέθους του μονομερούς της αλληλουχίας (300 bp / μονομερές) και του αριθμού των αντιγράφων της, υπολογίστηκε το συνολικό

Πίνακας 3.4-1 Δεδομένα ανάλυσης Real-time PCR κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων του επαναλαμβανόμενου στοιχείου BoR300.

	Συγκέντρωση DNA (pg) ^α	Εξίσωση πρότυπης καμπύλης	Αριθμός αντιγράφων ^β	Αριθμός αντιγράφων ανά απλοειδές γονιδίωμα ^γ
BoR300	10	$y = -3.52 \times \log(x) + 35.197$	75,610 ± 2,893*	2,661

^α Αρχική συγκέντρωση μήτρας γονιδιωματικού DNA (pg) του *B. olerae* που χρησιμοποιήθηκε στις αντιδράσεις των άγνωστων δειγμάτων.

^β Μέσος όρος του αριθμού των αντιγράφων της αλληλουχίας-στόχου BoR300 που καθορίστηκε για την αρχική συγκέντρωση της μήτρας γονιδιωματικού DNA (α), βάσει της πρότυπης καμπύλης.

^γ Μέγεθος απλοειδούς γονιδιώματος του *B. olerae*: 0.352 pg

* Τυπικό σφάλμα (SE, Standard Error) για σύνολο τριών επαναλήψεων (n=3).

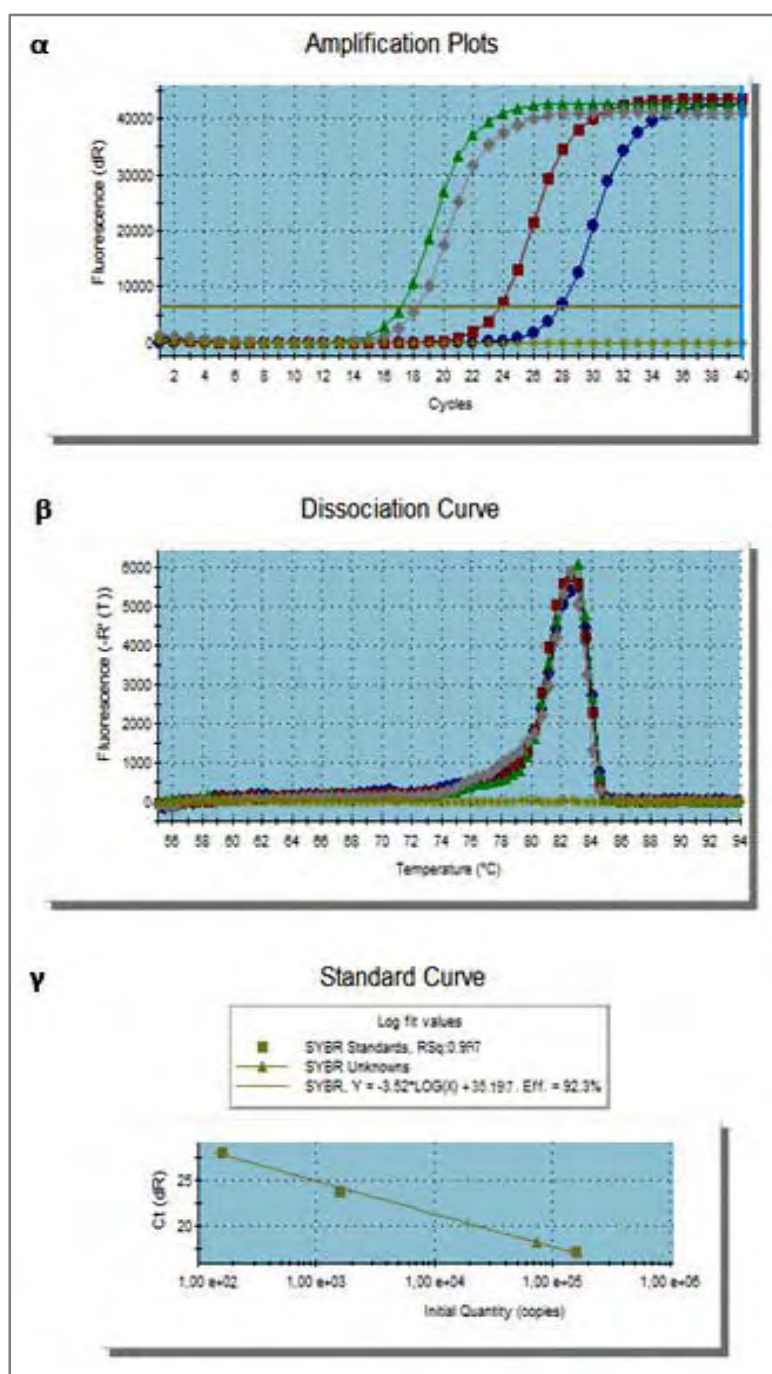
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

μέγεθος των επαναλήψεων στο γονιδίωμα, το οποίο καθορίστηκε ως 0.798 Mb και αντιπροσωπεύει κατά προσέγγιση το 0.25% του γονιδιώματος.

Στη δεύτερη προσέγγιση, ο αριθμός αντιγράφων υπολογίστηκε με βάση τη διαφορά των τιμών Ct (Δ Ct) που προσδιορίστηκαν κατά την ενίσχυση της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας-

στόχου BoR300 και ενός γονιδίου αναφοράς που εντοπίζεται ως μοναδικό αντίγραφο στο γονιδίωμα, χρησιμοποιώντας ως μήτρα τις ίδιες συγκεντρώσεις γονιδιωματικού DNA (Providenti et al. 2006). Ως γονίδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το εξόνιο 2 της ακετυλοχολυνεστεράσης (*ace*) του *B. olerae*, το οποίο εντοπίζεται ως μοναδικό αντίγραφο στο γονιδίωμα (Vontas et al. 2002). Διαδοχικές

Εικόνα 3.4-13 Σχηματική απεικόνιση αποτελεσμάτων της Real-time PCR για τον καθορισμό των αντιγράφων του BoR300 στο γονιδίωμα. **α)** Καμπύλες ενίσχυσης (amplification plot) της αλληλουχίας στόχου της δορυφορικής BoR300, που εκφράζουν την αύξηση του εκπεμπόμενου φθορισμού (fluorescence) σε συνάρτηση με τους κύκλους της αντίδρασης (cycles). Οι τρεις εφαπτόμενες καμπύλες (γκρι) αντιστοιχούν στα άγνωστα δείγματα γονιδιωματικού DNA, τα οποία ελέγχθηκαν εις τριπλούν. Οι υπόλοιπες καμπύλες αντιστοιχούν στις αραιώσεις των πρότυπων δειγμάτων του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου (πράσινο: 60 fg, κόκκινο: 0.6 fg, μπλε: 0.06 fg). Το δείγμα αρνητικού ελέγχου (NTC) αντιστοιχεί στην οριζόντια καμπύλη που δεν ξεπερνά το οριακό επίπεδο (threshold). Το επίπεδο threshold αντιπροσωπεύεται από την παράλληλη με τον άξονα χ γραμμή, ενώ τα σημεία τομής του με τις καμπύλες ενίσχυσης αντιστοιχούν στις τιμές Ct. **β)** Καμπύλες τήξης (dissociation curve) των προϊόντων ενίσχυσης. Η εμφάνιση μοναδικών κορυφών στην ίδια θερμοκρασία τήξης, συνιστά την ενίσχυση απόλυτα ειδικών προϊόντων. Η απουσία κορυφής στο δείγμα NTC υποδηλώνει την έλλειψη επιμολύνσεων της αντίδρασης. **γ)** Πρότυπη καμπύλη (standard curve) του αριθμού αντιγράφων των πρότυπων δειγμάτων εκφρασμένων λογαριθμικά σε συνάρτηση με τις αντίστοιχες τιμές Ct. Τα τρίγωνα σημεία στη γραμμή τάσης, αντιπροσωπεύουν τα δείγματα ελέγχου του γονιδιωματικού DNA.



ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

δεκαδικές αραιώσεις του γονιδιωματικού DNA (1 ng, 100pg, 10 pg) αποτέλεσαν τη μήτρα των αντιδράσεων Real-time PCR και ενισχύθηκαν με τους εκκινητές BoAce2F και BoAce2R καθώς και τους BoR300-F και BoR300-R με την ίδια σχεδόν απόδοση (efficiency, E), που αποτελεί προϋπόθεση για την εφαρμογή της μεθόδου (Παράρτημα: Πίνακες 5.1-1, 5.4-1). Επιπλέον το μέγεθος των προϊόντων ενίσχυσης ήταν παρεμφερές για τα δύο ζεύγη εκκινητών (315 bp και 298 bp αντίστοιχα), όπως επίσης και η θερμοκρασία τήξης (Tm) τους, η οποία δε διέφερε περισσότερους από 4° C υποδηλώνοντας την παρόμοια κινητική των δύο αντιδράσεων.

Σύμφωνα με τις τιμές Ct που προσδιορίστηκαν κατά την ενίσχυση των αλληλουχιών στόχου (BoR300) και αναφοράς (*ace*) για τις δεδομένες αραιώσεις του γονιδιωματικού DNA, κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες καμπύλες (Εικ.3.4-14). Βάσει των εξισώσεων των καμπυλών που παρουσίασαν τη μορφή $y=-ax+\beta$, υπολογίστηκαν οι αποδόσεις (E) των αντιδράσεων και η τιμή ΔCt , η οποία αποτελεί τη διαφορά των μέσων τιμών Ct που καταγράφηκαν κατά την ενίσχυση του γονιδίου μοναδικού αντιγράφου και της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας στο γονιδιωματικό DNA του *B. olerae*.

Οι αποδόσεις (E) των αντιδράσεων κατά την ενίσχυση των αλληλουχιών BoR300 και *ace* ήταν αντίστοιχα 93.4 % και 94.7 % βάσει της σχέσης: $E=10^{\frac{1}{κλίση}-1}$. Επιπλέον, η τιμή ΔCt υπολογίστηκε ίση με 12.93 από τη διαφορά των παραμέτρων β στις

εξισώσεις των δύο καμπυλών (Πίνακας 3.4-2). Τελικά ο αριθμός των αντιγράφων της αλληλουχίας υπολογίστηκε σύμφωνα με τη σχέση: $F^{\Delta Ct}$, όπου F είναι ο παράγοντας ενίσχυσης (amplification factor) ο οποίος παίρνει την τιμή 2 όταν η απόδοση της αντίδρασης PCR είναι 100%, δηλώνοντας το διπλασιασμό των προϊόντων ανά κύκλο. Εφόσον η μέση απόδοση των αντιδράσεων στην παρούσα προσέγγιση ήταν 94.05%, ο παράγοντας F πήρε την τιμή 1.881. Συνεπώς ο αριθμός αντιγράφων της επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας BoR300 ανά απλοειδές γονιδίωμα του δάκου υπολογίστηκε ίσος με 0.353×10^4 . Λαμβάνοντας υπόψη το μέγεθος του μονομερούς της αλληλουχίας (300 bp / μονομερές) υπολογίστηκε ότι το συνολικό μέγεθος των

Πίνακας 3.4-2 Δεδομένα συγκριτικής ανάλυσης των καμπυλών ενίσχυσης της Real-time PCR, για τον υπολογισμό των αντιγράφων του BoR300 κατά τον ποσοτικό προσδιορισμό των αντιγράφων του επαναλαμβανόμενου στοιχείου BoR300.

	Κλίση ^α	Απόδοση (E) ^β	ΔCt ^γ	$F^{\Delta Ct}$ ^δ
BoR300	34.33	93.4 %	12.93	0.353×10^4
<i>ace</i>	21.4	94.7 %		

^α Η κλίση της εξίσωσης της καμπύλης (Εικ. 3-14).

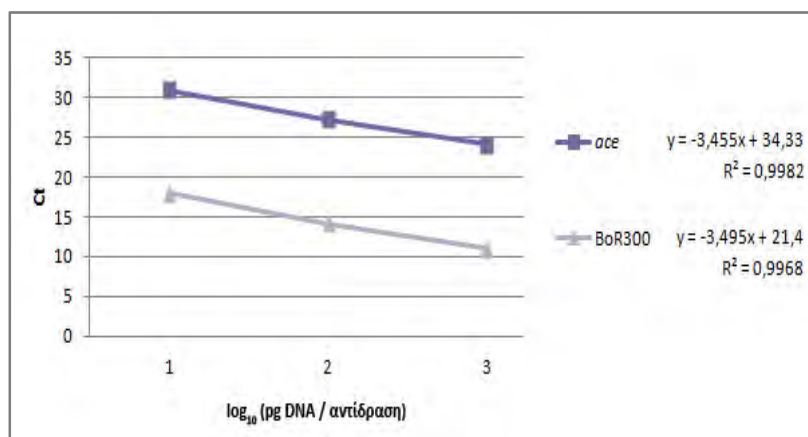
^β Η απόδοση της αντίδρασης υπολογίζεται από τη σχέση:

$$E=10^{\frac{1}{κλίση}-1}$$

^γ Η διαφορά της κλίσης των δύο εξισώσεων των αλληλουχιών BoR300 και *ace*.

^δ Σύμφωνα τη μέση απόδοση των αντιδράσεων (94.05%) ο παράγοντας ενίσχυσης F ισούται με 1.881.

Εικόνα 3.4-14 Γραφική παράσταση των τιμών Ct που προσδιορίστηκαν κατά την ενίσχυση των αλληλουχιών στόχου BoR300 (πολλαπλών αντιγράφων) και αναφοράς *ace* (μοναδικού αντιγράφου), για τις δεδομένες αραιώσεις του γονιδιωματικού DNA (10 pg, 100 pg, 1 ng) εκφρασμένες λογαριθμικά (τιμές 1, 2 και 3 αντίστοιχα).

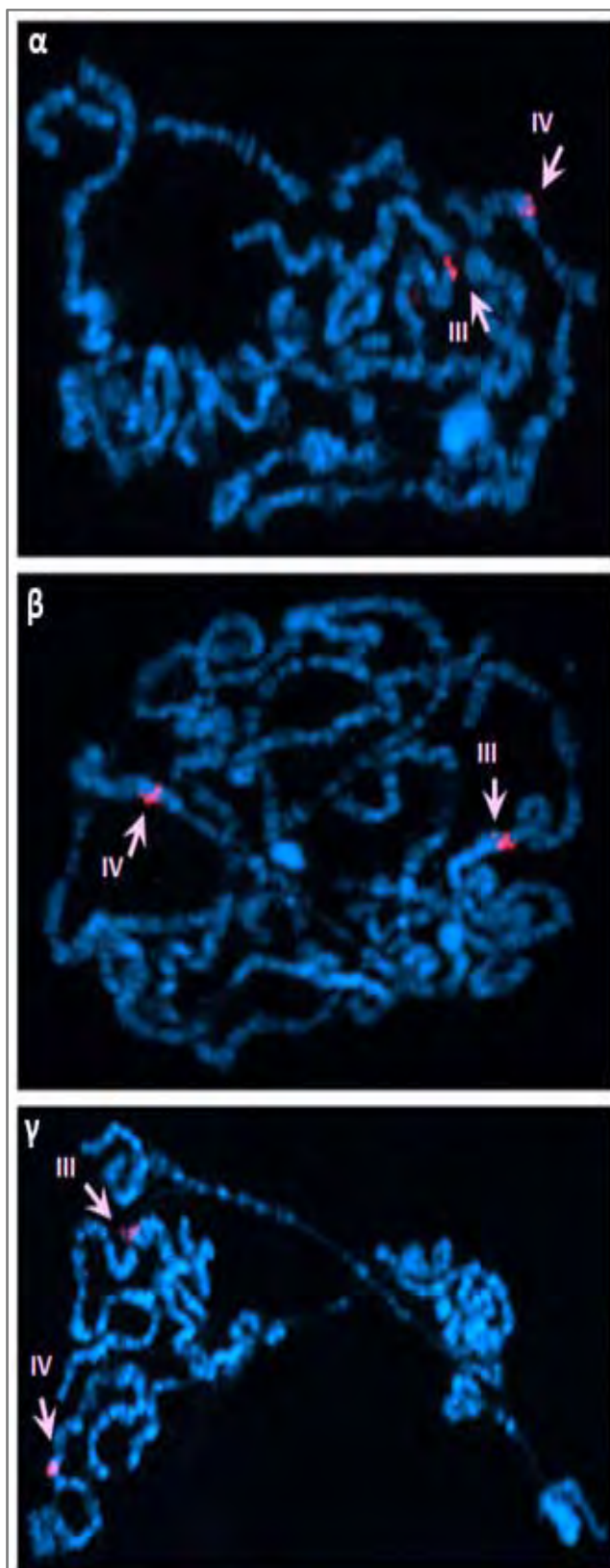


επαναλήψεων στο γονιδίωμα σύμφωνα με τη δεύτερη προσέγγιση αντιστοιχεί σε 1.062 Mb και αντιπροσωπεύει κατά προσέγγιση το 0.32% του γονιδιώματος.

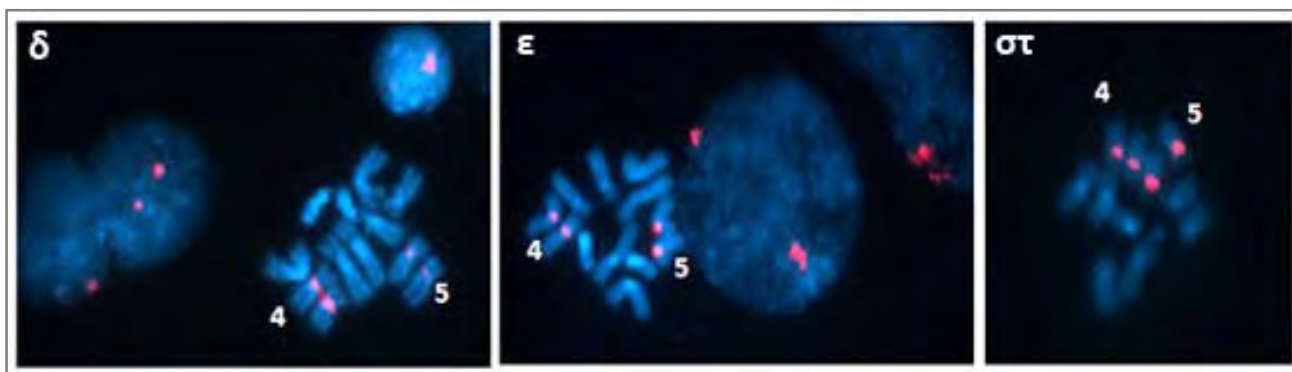
Συγκρίνοντας τις τελικές εκτιμήσεις των δύο προσεγγίσεων που ακολουθήθηκαν για τον καθορισμό της συμμετοχής της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300 στη δομή του γονιδιώματος, διαπιστώθηκε ότι ήταν παραπλήσιες. Συγκεκριμένα τα αντίγραφα που προσδιορίστηκαν από κάθε προσέγγιση αντιπροσωπεύουν κατά προσέγγιση το 0.25% και 0.32% του γονιδιώματος αντίστοιχα. Η παρατηρούμενη διαφορά μπορεί να αποδοθεί στη γενικότερη φύση των επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών και της δυσκολίας χειρισμού τους, η οποία δυσχεραίνει τον καθ' όλα ακριβή προσδιορισμό των αντιγράφων τους στο γονιδίωμα ενός οργανισμού. Στην πρώτη προσέγγιση η γενικότερη δομή της κλωνοποιημένης αλληλουχίας των 8.0 kb, οι αραιώσεις της οποίας αποτέλεσαν τα πρότυπα δείγματα για την κατασκευή της καμπύλης, είναι πιθανό να συνετέλεσε στον αναποτελεσματικό υβριδισμό των εκκινητών και συνεπώς στην μικρότερου βαθμού ενίσχυση των προϊόντων, με αποτέλεσμα τελικά την υποεκτίμηση των μετρούμενων αντιγράφων.

3.4.6 Φυσική χαρτογράφηση της αλληλουχίας BoR300 με FISH

Η κατανομή της δορυφορικής αλληλουχίας στο γονιδίωμα του δάκου ελέγχθηκε καθορίζοντας την ακριβή χρωμοσωμική της θέση. Η χαρτογράφησή της πραγματοποιήθηκε μέσω του φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού (FISH) τόσο σε παρασκευάσματα πολυταινικών, όσο και μιτωτικών χρωμοσωμάτων του εντόμου. Η πειραματική διαδικασία διεξήχθη στο Εργαστήριο Γενετικής, του Τομέα Γενετικής, Ανάπτυξης και Μοριακής Βιολογίας, του Τμήματος Βιολογίας του Α.Π.Θ., υπό την επίβλεψη και καθοδήγηση της Δρ. Μαυραγάνη – Τσιπίδου και της Δρ. Δροσοπούλου. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το σημασμένο με βιοτίνη προϊόν ενίσχυσης με τους



εκκινητές M13F και M13R του πλασμιδίου pBS-SK (+), στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί η δορυφορική αλληλουχία BoR300. Η ανίχνευση του σήματος



Εικόνα 3.4-15 Αποτελέσματα φθορίζοντος *in situ* υβριδισμού της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300 σε πολυταινικά και μιτωτικά χρωμοσώματα του εντόμου *B. oleae*. **α-γ**). Σήματα υβριδισμού στις κεντρομερικές περιοχές των πολυταινικών χρωμοσωμάτων III και IV. Με βέλη υποδεικνύονται οι θέσεις χαρτογράφησης της αλληλουχίας. **δ-στ**). Σήματα υβριδισμού σε άθικτους μεταφασικούς πυρήνες και στα κεντρομερή των μιτωτικών χρωμοσωμάτων 4 και 5. Η χρώση των χρωμοσωμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρωστική DAPI.

έγινε ανοσοχημικά με χρήση φθορίζοντων αντισωμάτων ειδικών για τη βιοτίνη (βλέπε Υλικά και Μέθοδοι 2.8.4). Το πρότυπο υβριδισμού του κλώνου στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου αποκάλυψε την ύπαρξη δύο σημάτων, που εντοπίστηκαν στις ετεροχρωματινικές μάζες που συνιστούν τις κεντρομερικές περιοχές των αυτοσωμάτων III και IV (Εικ. 3.4-15).

Η εκτεταμένη περιοχή υβριδισμού καθώς και η αυξημένη ένταση του σήματος που παρατηρήθηκαν, λόγω του μεγάλου αριθμού επαναλήψεων της αλληλουχίας στο γονιδίωμα, ενίσχυσαν την πιθανότητα αποτελεσματικού εντοπισμού της σε μιτωτικά χρωμοσώματα του εντόμου προς επιβεβαίωση του κεντρομερικού εντοπισμού της. Κατά τον έλεγχο κατανομής του ίδιου ανιχνευτή BoR300 στα μιτωτικά χρωμοσώματα, ήταν εφικτή η ανίχνευση του σήματος στις κεντρομερικές περιοχές των χρωμοσωμάτων 4 και 5, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα του υβριδισμού στα πολυταινικά χρωμοσώματα.

3.4.7 Ειδο-ειδικότητα της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300

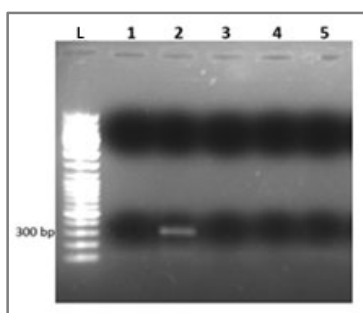
Με σκοπό τη διερεύνηση της ειδικότητας της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300, ελέγχθηκε η

ύπαρξή της στα γονιδιώματα τριών εντόμων της οικογένειας των Διπτέρων: *Ceratitis capitata*, *Drosophila melanogaster* και *Anopheles gambiae*. Παράλληλα ελέγχθηκαν και τρία είδη του γένους *Bactrocera*: *B. correcta*, *B. cucurbitae* και *B. dorsalis*. Ως θετικό δείγμα ελέγχου χρησιμοποιήθηκε το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο με την αλληλουχία BoR300. Ποσότητα του γονιδιωματικού DNA (2.5 μg) κάθε εντόμου υπέστη ολική κατάτμηση με την ενδονουκλεάση περιορισμού HaeIII, η οποία χρησιμοποιήθηκε επίσης κατά την απομόνωση και κλωνοποίηση του BoR300. Τα προϊόντα της αντίδρασης ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε μεμβράνη ώστε να αναλυθούν κατά Southern. Η υβριδοποίηση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 65°C, ενώ ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε η αλληλουχία BoR300 η οποία σημάνθηκε με βιοτίνη με τη μέθοδο των τυχαίων εκκινητών, αφού πρώτα απομονώθηκε από πήκτωμα αγαρόζης μετά από κατάτμηση του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στο οποίο είχε κλωνοποιηθεί με τις ενδονουκλεάσες περιορισμού *HindIII* και *EcoRI*. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατά Southern (Εικ. 3.4-16) κατέδειξαν ότι ο ανιχνευτής BoR300 υβριδοποιήθηκε μόνο με το DNA του *B. oleae* και του θετικού δείγματος ελέγχου. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ειδο-ειδικότητα της δορυφορικής αλληλουχίας.

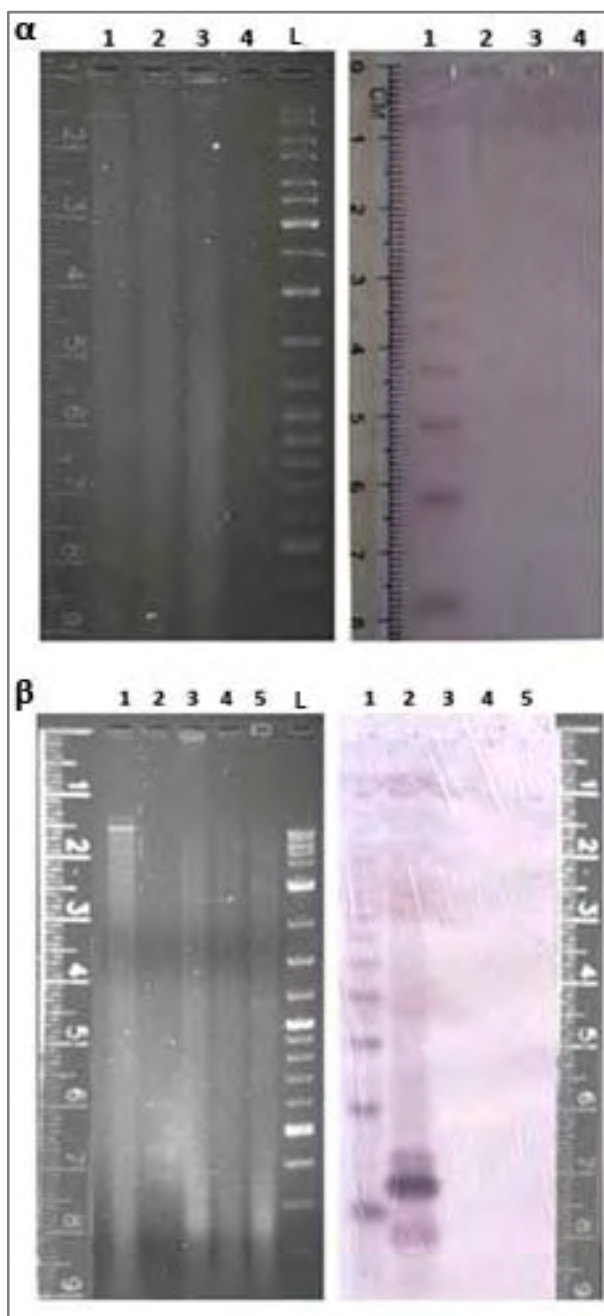
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Το πρότυπο των ζωνών υβριδοποίησης του ανιχνευτή BoR300 με τα θραύσματα του γονιδιωματικού DNA του *B. oleae*, ήταν χαρακτηριστικό του μοτίβου των διαδοχικών επαναλήψεων και έχει τη μορφή «σκάλας» (ladder pattern). Η μεγαλύτερη ένταση του σήματος της υβριδοποίησης των μονομερών του BoR300, υποδηλώνει ότι αποτελεί την κύρια αλληλουχία επανάληψης. Ωστόσο η ύπαρξη πολλαπλασίων του μονομερούς του BoR300 (διμερών, τριμερών κτλ) ήταν αναμενόμενη, δεδομένης της συσσώρευσης σημειακών μεταλλάξεων σε δορυφορικές αλληλουχίες που οδηγούν τελικά στην απώλεια των θέσεων αναγνώρισης ενζύμων περιορισμού.

Αντίστοιχα ήταν τα αποτελέσματα και κατά την ηλεκτροφόρηση των προϊόντων ενίσχυσης της δορυφορικής αλληλουχίας με τους εκκινητές BoR300F και BoR300R, χρησιμοποιώντας για κάθε αντίδραση αντίστοιχα ως μήτρα γονιδιωματικό DNA των τεσσάρων ειδών του γένους *Bactrocera*: *B. oleae*, *B. correcta*, *B. cucurbitae* και *B. dorsalis*. Το αναμενόμενο προϊόν ενισχύθηκε αποκλειστικά στο γονιδίωμα του δάκου, επιβεβαιώνοντας την ειδικότητα της αλληλουχίας (Εικ. 3.4-17)



Εικόνα 3.4-17 Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% προϊόντων ενίσχυσης της κεντρομερικής αλληλουχίας BoR300 σε γονιδιωματικό DNA τεσσάρων ειδών της οικογένειας *Bactrocera*. 1) Αρνητικό δείγμα ελέγχου, 2) *B. oleae*, 3) *B. correcta*, 4) *B. cucurbitae* και 5) *B. dorsalis* [L: Μάρτυρας μοριακού βάρους SM0331]



Εικόνα 3.4-16 Έλεγχος της κατανομής της δορυφορικής αλληλουχίας BoR300, με ανάλυση κατά Southern. Ελέγχθηκαν **α)** 4 είδη της τάξης των Διπτέρων (1: *B. oleae*, 2: *C. capitata*, 3: *D. melanogaster*, 4: *An. gambiae*) **β)** σε 4 είδη της οικογένειας *Bactrocera* (1: *B. oleae*, 3: *B. correcta*, 4: *B. cucurbitae* και 5: *B. dorsalis*) συμπεριλαμβανομένου του πλασμιδίου BoR300 (διαδρομή 2). Η κατάτμηση τόσο του γονιδιωματικού όσο και του πλασμιδιακού DNA πραγματοποιήθηκε με χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού *HaeIII*, ενώ ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε η σημασμένη με βιοτίνη αλληλουχία BoR300. [L: Μάρτυρας μοριακού βάρους SM0331]

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος της ελιάς, *B. oleae*, είναι το πιο επιβλαβές έντομο των ελαιοκαλλιεργειών. Μέχρι στιγμής, η κύρια μέθοδος ελέγχου του παρασίτου βασίζεται στη χρήση χημικών εντομοκτόνων καθιστώντας επιτακτική την ανάγκη για εύρεση νέων, αποτελεσματικών και φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων καταπολέμησής του. Ωστόσο η ανάπτυξη εναλλακτικών προσεγγίσεων διαχείρισης του εντόμου δυσχεραίνεται από την περιορισμένη διαθεσιμότητα βασικών μοριακών και γενετικών δεδομένων, όπως αναπτύχθηκε στην Εισαγωγή. Συνεπώς, η κατανόηση της γονιδιωματικής οργάνωσης του δάκου, πέρα από τη σημασία της στη βασική έρευνα του εντόμου, θα συνεισφέρει ουσιαστικά και στις μεθόδους γενετικής διαχείρισής του.

4.1 ΜΕΓΕΘΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Ο υπολογισμός του μεγέθους του γονιδιώματος ενός οργανισμού παρέχει μια πρώτη εκτίμηση της πολυπλοκότητάς του. Παρά την αναγκαιότητα τέτοιων δεδομένων, αντίστοιχες πληροφορίες δεν είναι διαθέσιμες στο δάκο. Η πειραματική διαδικασία που ακολουθήθηκε για τον προσδιορισμό του μεγέθους του γονιδιώματος του δάκου, βασίστηκε στην απόλυτη ποσοτικοποίηση ενός γονιδίου που εντοπίζεται ως μοναδικό αντίγραφο στο γονιδίωμα με PCR πραγματικού χρόνου (Real-time PCR). Η μεθοδολογία αυτή έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε διάφορους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων και των εντόμων *D. melanogaster* και *M. domestica*, εξασφαλίζοντας γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα (Wilhelm et al. 2003, Gao & Scott 2006). Η ευκολία και η αξιοπιστία της μεθόδου αποτέλεσαν και τη βάση επιλογής της για την εκτίμηση του γονιδιώματος του *B. oleae*. Από τη διαδικασία αυτή το μέγεθος του απλοειδούς γονιδιώματος του δάκου προσδιορίστηκε ίσο με 322 Mb (CI range: 310-334 Mb). Η τελική τιμή της ανάλυσης βασίστηκε στη στατιστική εκτίμηση των αποτελεσμάτων πέντε διαφορετικών ανεξάρτητων πειραμάτων. Η ορθότητα της πειραματικής

διαδικασίας επιβεβαιώθηκε εφαρμόζοντας την ίδια μεθοδολογία για τον προσδιορισμό του μεγέθους του γονιδιώματος της *D. melanogaster*, δεδομένου ότι αυτό είναι ήδη γνωστό. Πράγματι, η τιμή που προσδιορίστηκε ήταν 194 Mb (CI range: 183-205 Mb), η οποία δεν αποκκλίνει σημαντικά από αυτή που αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ισούται κατά προσέγγιση με 180 Mb (Adams et al. 2000).

Τα μεγέθη των γονιδιωμάτων άλλων εντόμων στη Βάση Δεδομένων “NCBI Genome Project” εμφανίζουν μια ευρεία κατανομή τιμών. Ο δάκος εντοπίζεται στο κάτω όριο του παρατηρούμενου εύρους διακύμανσης των Διπτέρων. Συγκεκριμένα το γονιδίωμα του δάκου εμφανίζεται συγκριτικά μεγαλύτερο από της *D. melanogaster* και στα ίδια περίπου επίπεδα με της *M. domestica* (295 ± 10 Mb), ενώ αξιοσημείωτη είναι η διαφορά του με την *C. capitata*. Τα δύο αυτά είδη της οικογένειας Terphritidae εμφανίζουν διακριτή διαφορά μεγέθους σε επίπεδο γονιδιώματος, εφόσον το μέγεθος του γονιδιώματος της *C. capitata* έχει καθοριστεί κατά προσέγγιση ίσο με 591 Mb (Tsoumani & Mathiopoulos 2011). Η μεγάλη απόκλιση μεταξύ των μεγεθών των γονιδιωμάτων τους υποδηλώνει κατ' επέκταση τη διαφοροποίηση της οργάνωσης και της δομής των γονιδιωμάτων των δύο ειδών. Η διαλεύκανση και κατανόηση των παραγόντων στους οποίους μπορεί να αποδίδεται η διαφοροποίηση αυτή, αναμένεται να διαλευκανθεί μέσω συγκριτικών αναλύσεων, που θα αποκαλύψουν στοιχεία που διαμορφώνουν τη δομή και την εξέλιξη των γονιδιωμάτων τους. Προς την κατεύθυνση αυτή ήδη έχουν διερευνηθεί για παράδειγμα η διαφορετική δομή των ενδογονιδιακών περιοχών και των ιντρονίων μέσα από διαειδικές αναλύσεις με χρήση μικροδορυφόρων και EPIC δεικτών (Augustinos et al. 2008, Stratikopoulos et al. 2009, παρούσα μελέτη), ενώ έχουν ταυτοποιηθεί και ειδο-ειδικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και στους δύο οργανισμούς (Stratikopoulos et al. 2002, παρούσα μελέτη).

Γενικά έχει αποδειχθεί ότι όσο μεγαλύτερο είναι ένα γονιδίωμα, τόσο μεγαλύτερο είναι το ποσοστό των ετεροχρωματινικών του περιοχών,

ενώ δεν υπάρχει συσχετισμός μεταξύ μεγέθους και συνολικού αριθμού γονιδίων (Petron 2001). Η εξέλιξη του μεγέθους του γονιδιώματος υφίσταται τη συνδυασμένη αλληλεπίδραση διαφόρων δυνάμεων που οδηγούν τελικά είτε στη διεύρυνση είτε στη συμπύκνωσή του. Μεταξύ αυτών των δυνάμεων περιλαμβάνονται μηχανισμοί μεταλλαγής που ασκούν πίεση υπέρ της αναδιοργάνωσης, όπως η μετάθεση, τυχαίες ελλείψεις και ενθέσεις (indels) αλλά και διπλασιασμοί. Στην περίπτωση που οι αλλαγές αυτές επηρεάζουν το φαινότυπο, υπόκεινται στη δράση της φυσικής επιλογής, ενώ αν επιφέρουν αμελητέες συνέπειες ελέγχονται από φαινόμενα στενωπού (για ανασκόπηση Hartl 2000, Petron 2001; 2002). Συγκριτικές μελέτες σε είδη εντόμων εξελικτικά συγγενικών ή που ανήκουν σε διαφορετικά γένη αποκάλυψαν τη θετική συσχέτιση του μεγέθους του γονιδιώματος με το μέσο μέγεθος των ιντρονίων, των εξονίων και των ενδογονιδιακών περιοχών (Moriyama et al. 1998, Zdobnov et al. 2002, Schlotterer & Harr 2000). Παρόμοια θετική συσχέτιση έχει αναφερθεί και για τις αλλαγές στο μέγεθος του γονιδιώματος που προκύπτουν από μεταβολές στον αριθμό των αντιγράφων των μεταθετών στοιχείων και άλλων επαναλαμβανόμενων αλληλουχιών (Petron 2001, Kidwell 2002, Boulesteix et al. 2006). Σύμφωνα λοιπόν με τη διακύμανση του αριθμού των επαναλήψεων και του προτύπου διασποράς τους σε περιοχές ετεροχρωματινικής σύστασης, ερμηνεύονται και οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στα μεγέθη των γονιδιωμάτων τόσο σε διαειδικό όσο και ενδοειδικό επίπεδο (Bosco et al. 2007).

4.2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΕΤΙΚΕΤΩΝ ΕΚΦΡΑΖΟΜΕΝΩΝ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ

Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη προσπάθεια σε επίπεδο αλληλούχησης μεταγραφόμενων αλληλουχιών του *B. oleae*. Στο πλαίσιο αυτό πραγματοποιήθηκε η απομόνωση και ο μερικός χαρακτηρισμός μιας συλλογής EST

αλληλουχιών, ενώ παράλληλα διερευνήθηκε και η χρησιμότητά τους σε μια σειρά εφαρμογών. Για το σκοπό αυτό, 256 τυχαίοι κλώνοι cDNA βιβλιοθήκης του δάκου απομονώθηκαν μετά από *in vivo* μαζική εκτομή των ενθεμάτων από τον φορέα λΖΑΡ, υπό τη μορφή φαγεμιδίων και καθορίστηκε η αλληλουχία του 5' άκρου των ενθεμάτων τους. Τα χρωματογραφήματα που ανακτήθηκαν από τις αντιδράσεις αλληλούχησης, ελέγχθηκαν μεμονωμένα για το ενδεχόμενο ύπαρξης λαθών κατά τη σύνθεση της αλληλουχίας που θα οδηγούσαν στη δημιουργία μετατοπίσεων πλαισίου. Παράλληλα, η κάθε αλληλουχία επεξεργάστηκε ιδιαίτερα, τόσο για τον εντοπισμό «λαθών» ανάγνωσης τα οποία στη συνέχεια διορθώθηκαν, όσο και για την αναγνώριση ανοιχτών αναγνωστικών πλαισίων που δυνητικά αντιπροσωπεύουν γονίδια με κωδικοποιητική ικανότητα. Ο εξατομικευμένος χειρισμός, σε αντίθεση με την αυτόματη επεξεργασία και συναρμολόγηση που ακολουθείται στα προγράμματα απομόνωσης ESTs μαζικής κλίμακας, εξασφαλίζει υψηλότερα επίπεδα ορθότητας ανάλυσης και ποιότητας των αλληλουχιών. Κατά την *in silico* ανάλυση κάθε αλληλουχίας διερευνήθηκαν τα τρία πιθανά πλαίσια εμπρόσθιας κατεύθυνσης. Η επιλογή αυτή βασίστηκε στη δυνατότητα που παρέχει η διαδικασία κατασκευής της βιβλιοθήκης σε φορείς λΖΑΡ για προσανατολισμένη κλωνοποίηση των μορίων cDNA. Η προσέγγιση αυτή απέφερε συνολικά 195 διαφορετικά δυνητικά μετάγραφα, τα οποία αντιπροσωπεύουν αντίστοιχο αριθμό γονιδίων, όπως προκύπτει εξ ορισμού των ESTs. Κατά την επακόλουθη αναζήτηση ομολογιών των προβλεπόμενων μεταγραφόμενων αλληλουχιών με ήδη γνωστές κατατεθειμένες αμινοξικές ακολουθίες της *D. melanogaster*, επιβεβαιώθηκε και ταυτοποιήθηκε το 93%. Για το υπόλοιπο 7% δεν ήταν εφικτός ο προσδιορισμός κάποιας ομολογίας, παρά την ύπαρξη ORF. Σε αντίστοιχη μελέτη απομόνωσης ESTs στην *C. capitata*, δεν διαπιστώθηκε επίσης κάποια ομολογία για το 9 % των μεταγράφων (Gomulski et al. 2008). Η απουσία ομολογίας υποδηλώνει την ύπαρξη υψηλά

διαφοροποιημένων γονιδίων μεταξύ των δύο ειδών (*B. oleae* και *D. melanogaster*) ή εναλλακτικά ότι πρόκειται για μετάγραφα γονιδίων που είτε ήταν παρόντα στον αρχικό κοινό τους πρόγονο αλλά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης απωλέσθηκαν από το γονιδίωμα της *D. melanogaster*, είτε έχουν δημιουργηθεί στο *B. oleae* μετά το διαχωρισμό τους.

Οι κλώνοι που απομονώθηκαν αλλά για τους οποίους δεν καθορίστηκε κάποιο ORF, αλλά ούτε έδωσαν αποτελέσματα ομολογίας, πιθανόν να αντιπροσωπεύουν μη κωδικές αλληλουχίες και δεν επεξεργάστηκαν περαιτέρω. Η παρουσία αυτού του τύπου των αλληλουχιών στη cDNA βιβλιοθήκη μπορεί να οφείλεται σε ποικιλία παραγόντων. Ανάμεσα σε αυτούς συγκαταλέγονται μετατοπίσεις του αναγνωστικού πλαισίου (frameshift errors), αλλά και καθεαυτή η διαδικασία κατασκευής της. Συγκεκριμένα, η χρήση ολιγονουκλεοτιδίων δεοξυθυμιδίνης (ολιγο(dT)) ως εκκινήτες για την αντίστροφη μεταγραφή μπορεί να οδηγήσει στην απομόνωση μη ακέραιων μεταγράφων, εξαιτίας της υβριδοποίησής τους σε πολυ-A εσωτερικές περιοχές, με αποτέλεσμα την απομόνωση τελικά 3' μη μεταφραζόμενων περιοχών (UTRs) (Nam et al. 2002). Εναλλακτικά, δεν αποκλείεται να αποτελούν RNA μετάγραφα που δεν κωδικοποιούν πρωτεϊνικά προϊόντα (untranslated RNAs, utRNAs) και απομονώθηκαν λόγω των κοινών τους χαρακτηριστικών με τις mRNA αλληλουχίες, καθώς φέρουν ουρές πολυαδενυλίωσης, αλλά ωστόσο απουσιάζουν τυπικά ORFs (Brosius 2005). Μια άλλη εκδοχή επίσης συνιστά η υψηλή συγκέντρωση μιας γονιδιωματικής περιοχής σε βάσεις A και T, που ενδεχομένως να οδηγούσε στην απομόνωση αλληλουχιών που δεν προέρχονται από το mRNA. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να ερμηνεύσει και την απομόνωση αλληλουχιών μιτοχονδριακής προέλευσης, οι οποίες επίσης εξαιρέθηκαν από την επεξεργασία. Ιδιαίτερα για την περίπτωση των κλώνων που απομονώθηκαν με ομολογία προς την πολυπρωτεΐνη του ιού sacbrood, δεν αποκλείεται να πρόκειται για αποτέλεσμα επιμόλυνσης της βιβλιοθήκης από κάποιον μη χαρακτηρισμένο sacbrood RNA ιό που προσβάλλει το δάκο, όπως

αντίστοιχα έχει αναφερθεί και σε ανάλογη μελέτη συλλογής ESTs στην *C. capitata* (Gomulski et al. 2008). Ο ιός sacbrood (SBV), που κατατάσσεται στους RNA ιούς, χαρακτηρίζεται από την ικανότητά του να προσβάλλει τις προνύμφες των μελισσών, με συνέπεια τον θάνατό τους. Οι προνύμφες που έχουν μολυνθεί από τον SBV αδυνατούν να σχηματίσουν βομβύκια, ενώ ταυτόχρονα παρατηρείται αλλαγή στον χρωματισμό τους, καθώς από λευκές αποκτούν τελικά μια υποκίτρινη χροιά (Ghosh et al. 1999). Ο τύπος του νουκλεϊκού οξέος του ιού (RNA ιός) μπορεί να δικαιολογήσει τον εντοπισμό του γενετικού του υλικού, καθώς είναι πιθανό να απομονώθηκε μαζί με το mRNA του δάκου κατά τη δημιουργία της cDNA βιβλιοθήκης.

Η περαιτέρω ανάλυση των ESTs του *B. oleae* βασίστηκε στη διαθεσιμότητα ορθόλογων γονιδίων της *D. melanogaster* και την εκτενή επισήμανσή τους με όρους ιεράρχησης της Βάσης Δεδομένων της Γονιδιακής Οντολογίας. Η προσέγγιση βασίστηκε στο γεγονός ότι η γνώση των λειτουργικών ιδιοτήτων ενός γονιδίου σε έναν καλά χαρακτηρισμένο οργανισμό μπορεί να λειτουργήσει πληροφοριακά για τις ιδιότητες του ορθόλογου γονιδίου του σε κάποιον άλλο οργανισμό.

Η ημιαυτόνομη διαδικασία που ακολουθήθηκε επέτρεψε τον προσδιορισμό των λειτουργικών ιδιοτήτων 159 γονιδίων που αντιπροσωπεύουν τα αντίστοιχα ESTs και των προϊόντων έκφρασής τους. Συνεπώς, από τις συνολικά 185 αλληλουχίες που εξετάστηκαν βάσει των αποτελεσμάτων ομολογίας τους από την αναζήτηση στη Βάση Δεδομένων BLASTX, 87% επισημειώθηκαν επιτυχώς σε τουλάχιστον έναν βιολογικό όρο GO ανάλογα με τη μοριακή τους λειτουργία, τη βιολογική διαδικασία που επιτελούν αλλά και τον κυτταρικό εντοπισμό τους. Το υπόλοιπο ποσοστό (13%) των αλληλουχιών απορρίφθηκαν αυτόματα και δεν συνυπολογίστηκαν στην ανάλυση ταξινόμησης, εξαιτίας της απουσίας δεδομένων επισημείωσης GO των ομόλογων γονιδίων της *D. melanogaster*. Η απουσία αυτή συνδέεται με το γεγονός ότι αν και έχει ολοκληρωθεί η αλληλούχηση του γονιδιώματος και η ταυτοποίηση των γονιδίων της,

ότι δεν έχει αποσαφηνιστεί η ακριβής λειτουργία όλων αυτών των γονιδίων.

Παρά τον μικρό αριθμό των αλληλουχιών που χρησιμοποιήθηκαν στη συγκεκριμένη ανάλυση, η ταξινόμηση τους στις κατηγορίες της Γονιδιακής Οντολογίας που επιλέχθηκαν εμφάνισε ευρεία κατανομή. Μάλιστα ως ένα βαθμό ακολουθεί την αντίστοιχη της *D. melanogaster*, όπως αυτή προτείνεται στην πρωτογενή ανάλυση που παρουσιάζει το EMBL-EBI. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδηλώνουν τη φυλογενετική εγγύτητα (proximity) μεταξύ των δύο οργανισμών όχι μόνο όσον αφορά την συντήρηση των γονιδίων τους σε επίπεδο αλληλουχίας, αλλά και την κατανομή των λειτουργικών τους απαιτήσεων. Μελλοντικά η συσσώρευση αντίστοιχων γονιδιακών δεδομένων και σε άλλους συγγενικούς οργανισμούς που ανήκουν στην οικογένεια Terphritidae αναμένεται να αποκαλύψει νέους συσχετισμούς κατανομής, ιδιαίτερα όσον αφορά τις ορφανές αλληλουχίες για τις οποίες δεν εντοπίστηκαν ορθόλογα γονίδια στη *D. melanogaster*. Επιπλέον, η συγκριτική ανάλυσή τους θα συνεισφέρει στη διαλεύκανση καίριων ερωτημάτων που εγείρονται σχετικά με τη βιολογία και τη συμπεριφορά του εντόμου. Προς την κατεύθυνση αυτή προφανώς απαιτείται η διαθεσιμότητα επιπρόσθετων μεταφραζόμενων αλληλουχιών του *B. oleae*, που θα εξασφαλίστούν από την περαιτέρω απομόνωση και ταυτοποίηση νέων cDNA κλώνων σε μεγάλη κλίμακα. Εάν μάλιστα οι μελλοντικές αυτές ολιστικές προσεγγίσεις βασίζονται στη χρήση βιβλιοθηκών διαφορετικής προέλευσης, όπως για παράδειγμα από το σύνολο εκφραζόμενων πληροφοριών διαφορετικών ιστών ή και αναπτυξιακών σταδίων, θα αποδώσουν πληρέστερη εικόνα για το τρανσκριπτομα του εντόμου, αλλά και το προφίλ της διαφορικής έκφρασής του.

Όπως συζητήθηκε και παραπάνω, λόγω της πειραματικής διαδικασίας κατασκευής της βιβλιοθήκης, ενδέχεται να απομονώθηκαν και κλώνοι που δεν αντιπροσωπεύουν πραγματικά εκφραζόμενες περιοχές του γονιδιώματος του οργανισμού. Συνεπώς αποτέλεσε ουσιαστική ανάγκη ο έλεγχος της δυνατότητας έκφρασης

απομονωμένων κλώνων μέσω RT-PCR. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν με τυχαία δειγματοληψία 5 κλώνοι, που ωστόσο ανήκουν σε διακριτές κατηγορίες βάσει της ύπαρξης ORF και ταυτόχρονα του καθορισμού ή μη BLASTX ομολογίας. Οι κλώνοι που ελέγχθηκαν αντιστοιχούσαν σε ποσοστό 2.5% των συνολικά απομονωμένων ESTs. Σε αντίστοιχες προσεγγίσεις ελέγχου έκφρασης, αναφέρεται ότι τα δείγματα ελέγχου συνιστούν το 1% του συνόλου (Roma et al. 2007). Επιπλέον στην διαδικασία της αντίστροφης μεταγραφής συμπεριλήφθηκαν και 2 κλώνοι (87, 92) οι οποίοι εξαιρέθηκαν από την GO ανάλυση, καθώς δεν ταυτοποιήθηκαν ως ESTs λόγω της απουσίας ORF αλλά και ομολογίας με άλλα γονίδια των Βάσεων Δεδομένων.

Η δυνατότητα έκφρασης των 7 κλώνων ελέγχθηκε μέσω RT-PCR και διαπιστώθηκε η ενίσχυση προϊόντων αναμενόμενου μεγέθους, επιβεβαιώνοντας ότι πρόκειται για αλληλουχίες με ικανότητα έκφρασης. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι τα 3 ταυτοποιημένα ESTs (BoEST_86, BoEST_95, BoEST_175), λειτούργησαν παράλληλα και ως δείγματα εσωτερικού ελέγχου για την παρακολούθηση πιθανής επιμόλυνσης με DNA αλληλουχίες. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των συγκεκριμένων αλληλουχιών, είχαν σχεδιαστεί εκατέρωθεν ιντρονικών περιοχών στα πλαίσια της ανάπτυξης EPIC δεικτών (βλέπε Αποτελέσματα § 3.2.8). Συνεπώς σε περίπτωση επιμόλυνσης η ζώνη ενίσχυσης θα ήταν προσαυξημένη κατά το μέγεθος του αντίστοιχου ιντρονίου. Όσον αφορά τα προϊόντα ενίσχυσης των 2 κλώνων (για τους οποίους δεν εντοπίστηκε κάποιο ορθόλογο γονίδιο και παράλληλα απουσίαζε χαρακτηριστικό ORF), αποτελούν ισχυρές ενδείξεις ότι πρόκειται τελικά για πραγματικές μεταγραφόμενες αλληλουχίες (5'- ή 3'-UTRs) παρά το γεγονός ότι μπορεί να μην κωδικοποιούν κάποιο πρωτεϊνικό προϊόν. Ιδιαίτερα αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι κατά τη σύγκριση της αρνητικής αλυσίδας του κλώνου 87 με τις καταχωρήσεις τις νουκλεοτιδικής Βάσης Δεδομένων BLASTN, εμφάνισε υψηλή ομοιότητα ($E=3e^{-25}$) με την 5'-UTR περιοχή του γονιδίου *onoB* του *B. oleae*, που κωδικοποιεί έναν μεταγραφικό

παράγοντα δακτύλων ψευδαργύρου. Το δεδομένο αυτό πιθανόν να δηλώνει ότι ο κλώνος 87 αποτελεί ένα αντινοσηματικό (anti-sense) μόριο RNA. Αυτού του τύπου οι αλληλουχίες εδράζονται στο εσωτερικό ιντρονίων, γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και θεωρείται πιθανό ότι επιτελούν κάποιο ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο της γονιδιακής έκφρασης ή λειτουργίας (Szymanski et al. 2003). Ενδελεχής ανάλυση των κλώνων αυτού του τύπου που απομονώθηκαν αναμένεται να αποσαφηνίσει την ακριβή φύση τους και το βιολογικό τους ρόλο.

Εφαρμογές των EST-δεικτών σε κυτταρογενετικές προσεγγίσεις

Η χρησιμότητα των ESTs σε μελέτες φυσικής χαρτογράφησης έχει μνημονευτεί πολλάκις σε μεγάλο εύρος οργανισμών και ιδιαίτερα στα έντομα (Heckel et al. 2003). Η ύπαρξη πολυταινικών χρωμοσωμάτων στο δάκο και διαθεσιμότητα των άριστα χαρακτηρισμένων χρωμοσωμικών χαρτών τους (για ανασκόπηση Mavragani-Tsipidou 2002), επέτρεψαν τον ακριβή προσδιορισμό των θέσεων εντοπισμού 35 EST-δεικτών στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου μέσω του *in situ* υβριδισμού. Οι δείκτες αυτοί υβριδίστηκαν σε διάσπαρτες θέσεις, οι οποίες κατανέμονται σε 8 από τους συνολικά 10 πολυταινικούς βραχίονες. Τα σήματα υβριδισμού των δεικτών εντοπίστηκαν σε μοναδικές χρωμοσωμικές θέσεις, εκτός από μια περίπτωση. Ο δείκτης BoEST_110 υβριδίστηκε σε δύο διακριτές θέσεις του ίδιου βραχίονα (68, 70-71 IVL), πιθανότατα ως αποτέλεσμα διπλασιασμού και ακολούθως μετατόπισης του αρχικού γενετικού τόπου. Το ενδεχόμενο κάποιο από τα δύο σήματα υβριδισμού να είναι μην είναι πραγματικό και να οφείλεται σε μη ειδική σύνδεση του ανιχνευτή αποκλείστηκε, καθώς η ένταση του σήματος δεν παρουσίασε διαφοροποίηση. Έως τώρα στη βιβλιογραφία είχε αναφερθεί η χαρτογράφηση μόνο 10 ετερόλογων δεικτών (Mavragani-Tsipidou 2002) και 13 μικροδορυφορικών δεικτών του *B. oleae* (Augustinos et al. 2008). Τα παραπάνω αποτελέσματα χαρτογράφησης συνεισφέρουν στον εμπλουτισμό των κυτταρογενετικών χαρτών, καθώς

πλέον τα σημεία αναφοράς στο γονιδίωμα έχουν κάτι παραπάνω από διπλασιαστεί. Επίσης, ορισμένα από τα αποτελέσματα υβριδισμού παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον δεδομένης της φύσης των αλληλουχιών τους. Συγκεκριμένα ο δείκτης BoEST_100, ο οποίος συμπεριλαμβάνεται στις ορφανές αλληλουχίες για τις οποίες δεν ήταν εφικτός ο καθορισμός κάποιας ομολογίας, εμφάνισε ισχυρό σήμα υβριδισμού στην περιοχή 39 IR. Ο κυτταρογενετικός εντοπισμός του, η ύπαρξη ORF, αλλά και η ενίσχυση του μεταγράφου του κατά την αντίστροφη μεταγραφή, συνηγορούν στο γεγονός ότι πρόκειται για ένα γενετικό τόπο διακριτής λειτουργίας που απουσιάζει από το γονιδίωμα της *D. melanogaster*. Επιπλέον, οι κλώνοι 87 και 92, για τους οποίους όπως αναφέρθηκε και παραπάνω δεν καθορίστηκε κάποιο ORF αλλά ούτε και ομολογία με άλλα γονίδια των Βάσεων Δεδομένων, χαρτογραφήθηκαν με επιτυχία στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό επίσης με την ενίσχυση των προϊόντων μεταγραφής τους, επιβεβαιώνει την υπόθεση ότι πρόκειται για *bona fide* μετάγραφα του γονιδιώματος.

Η σύγκριση των χρωμοσωμικών θέσεων υβριδισμού των μοριακών δεικτών όπως αυτές υποδεικνύονται από μελέτες χαρτογράφησης αποτελεί κλειδί για τον καθορισμό χρωμοσωμικών ομολογιών μεταξύ συγγενικών ειδών. Η διερεύνηση της συνταινιακότητας, δηλαδή η σύγκριση της διευθέτησης ορθόλογων δεικτών στα χρωμοσώματα διαφορετικών ειδών, συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση της εξέλιξης των χρωμοσωμάτων. Προς την κατεύθυνση αυτή σημαντική πηγή πληροφοριών αποτελεί ο προσδιορισμός διακριτών δομικών ανακατατάξεων, οι οποίες συνιστούν τις κύριες αιτίες διαφοροποίησης των χρωμοσωμάτων συγγενικών ειδών κατά την εξελικτική τους απόκλιση από τον κοινό τους πρόγονο. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται αναστροφές (ενδο-χρωμοσωμικές), μετατοπίσεις (δια-χρωμοσωμικές) και μεταβολές όπως διπλασιασμοί και ελλείμματα. Συγκριτικές μελέτες μεταξύ των Διπτέρων *D. melanogaster* και *C. capitata* (Gariou-Papalexίου et

al. 2002), αλλά και μεταξύ των ειδών *C. capitata*, *B. oleae* και *B. tryoni* της οικογένειας Terphritidae (για ανασκόπηση Mavragani-Tsiripidou 2002) κατέδειξαν εκτενή ομολογία μεταξύ των χρωμοσωμικών τους στοιχείων, σύμφωνα με τη διατήρηση των ομάδων σύνδεσης που παρατηρήθηκε. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον θα παρουσίαζε η διερεύνηση της συνταινιακότητας με βάση τα δεδομένα χαρτογράφησης των ESTs της παρούσας μελέτης μεταξύ των συγγενικών ειδών *C. capitata* και *B. oleae*, τα οποία εμφανίζουν τον ίδιο αριθμό μεταφασικών και πολυταινικών χρωμοσωμάτων ($2n=12$). Κάτι τέτοιο όμως δεν ήταν εφικτό, λόγω της μη διαθεσιμότητας αντίστοιχων πληροφοριών χαρτογράφησης για τις ομόλογες αλληλουχίες της *C. capitata*. Ωστόσο στην περίπτωση της *D. melanogaster*, οι καταχωρήσεις των ορθόλογων γονιδίων των ESTs του *B. oleae* στη FlyBase (Drysdale 2008) συνοδεύονται από πληροφορίες που αφορούν τις χρωμοσωμικές τους θέσεις. Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε να διερευνηθεί η συνταινιακότητα των χρωμοσωμάτων των δύο οργανισμών, για τους οποίους δεν είχε περιγραφεί στη βιβλιογραφία ομολογία των χρωμοσωμικών τους στοιχείων. Ο καρυότυπος του μεταφασικού διπλοειδούς πυρήνα της *D. melanogaster* αποτελείται από $2n=8$ μεταφασικά χρωμοσώματα. Στους πολυταινικούς της πυρήνες εντοπίζονται 5 πολυταινικοί βραχίονες, εκ των οποίων ένας αντιστοιχεί στο X χρωμόσωμα που πολυταινίζεται, σε αντίθεση με το X του *B. oleae*. Για τις ανάγκες της ανάλυσης αυτής, η ομολογία μεταξύ των χρωμοσωμάτων των δύο ειδών καθορίστηκε επαγωγικά, σύμφωνα με τις ομολογίες καθενός με τα αντίστοιχα χρωμοσώματα της *C. capitata*. Ο χάρτης συνταινιακότητας που προέκυψε από συνολικά 39 χαρτογραφημένους δείκτες γονιδίων επιβεβαίωσε την προτεινόμενη χρωμοσωμική ομολογία για τα 2/3 των συγκρίσεων. Οι υπόλοιποι δείκτες διαπιστώθηκε ότι εδράζονται σε μη ομόλογα χρωμοσωμικά στοιχεία. Αντίστοιχες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί και στην *C. capitata*, για τα γονίδια *hsp70* και *Adh* (Gariou-Papalexou et al. 2002). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ύπαρξη δομικών χρωμοσωμικών ανακατατάξεων, που

ακολούθησαν τον εξελικτικό διαχωρισμό των ειδών. Άλλωστε στη *D. melanogaster* οι περικεντρικές αναστροφές αναφέρονται ως η πιο κοινή μεταβολή κατά την εξέλιξη των χρωμοσωμάτων της (Krimbas & Powell 1992). Επιπλέον παρά τον μικρό αριθμό των δεικτών που ελέγχθηκαν κατά την παρούσα συγκριτική ανάλυση ήταν εφικτός ο προσδιορισμός ορισμένων συνταινιακών περιοχών. Εφόσον η σειρά διευθέτησης των γονιδίων είναι συντηρημένη κατά μήκος των περιοχών αυτών, αυξάνονται οι πιθανότητες να μπορεί κανείς να ανιχνεύσει ορθόλογα γονίδια στο εσωτερικό τους (Bolshakov et al. 2002, Pringle et al. 2007). Μελλοντικά η χαρτογράφηση ευρύτερου αριθμού δεικτών θα επιτρέψει εκτενέστερες συγκριτικές αναλύσεις αναφορικά με τη συνταινιακότητα, δίνοντας επομένως νέες προοπτικές στη διαλεύκανση της εξελικτικής ιστορίας των χρωμοσωμάτων των Διπτέρων.

Καθορισμός προτύπου χρήσης κωδικονίων του δάκου

Κατά την ανάλυση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των γονιδίων δίνεται η δυνατότητα καθορισμού της συχνότητας με την οποία εμφανίζονται τα κωδικόνια σε μια κωδική αλληλουχία. Ως γνωστόν, η συχνότητα με την οποία απαντώνται τα συνώνυμα κωδικόνια διαφέρει ανάμεσα στα γονίδια ενός γονιδιώματος αλλά και μεταξύ διαφορετικών οργανισμών. Η μη εξισορροπημένη χρήση των συνώνυμων κωδικονίων δεν είναι διόλου τυχαία και έχει διαπιστωθεί σε όλα τα ζωικά βασίλεια (Ikemura 1985). Ουσιαστικά είναι αποτέλεσμα της τάσης για χρήση συγκεκριμένων-βέλτιστων κωδικονίων (Codon usage bias). Η τάση αυτή υφίσταται λόγω της επίδρασης εξελικτικών δυνάμεων επιλογής ή μεταλλαγών, χωρίς ωστόσο η μια να αποκλείει την άλλη, ενώ οι μηχανισμοί μέσω των οποίων επιτυγχάνεται παραμένουν αδιευκρίνιστοι (Duret 2002, Hershberg & Petrov 2009).

Η διαφοροποίηση των συχνοτήτων χρήσης των συνώνυμων κωδικονίων συσχετίζεται με τα επίπεδα έκφρασης των γονιδίων και την αφθονία των tRNAs,

εξαιτίας του επιλεκτικού περιορισμού υπέρ της μεγιστοποίησης της μεταγραφικής ταχύτητας και ακρίβειας (Akashi 1994). Συνεπώς γονίδια με υψηλό ρυθμό έκφρασης παρουσιάζουν την τάση υπέρ των κωδικονίων για τα οποία εντοπίζονται άφθονα ισοαποδεκτικά tRNAs. Άλλα επίπεδα δράσης της μεταγραφικής επιλεκτικής πίεσης είναι και το μήκος των γονιδίων, με τα μικρότερα γονίδια να παρουσιάζουν ισχυρότερη τάση για συγκεκριμένα κωδικόνια (Duret & Mouchiroud 1999).

Η αφθονία συγκεκριμένων tRNAs αντικατοπτρίζεται από τη συχνότητα των αντίστοιχων κωδικονίων, υπό την έννοια ότι το tRNA που αναγνωρίζει ένα σπάνιο κωδικόνιο μεταγράφεται σε μικρές ποσότητες (Ikemura 1985). Συνεπώς γονίδια που περιέχουν σπάνια κωδικόνια ενός οργανισμού, ενδέχεται να εκφράζονται αναποτελεσματικά, εφόσον μπορούν να προκαλέσουν πρόωρο τερματισμό της συντιθέμενης πρωτεϊνικής ακολουθίας ή λανθασμένη ενσωμάτωση αμινοξικών καταλοίπων.

Κατά τη διάρκεια της παρούσας μελέτης το πρότυπο χρήσης κωδικονίων του γονιδιώματος του *B. oleae* που ανακτήθηκε από τη βάση δεδομένων Codon Usage Database, περιελάμβανε μόλις 25 καταχωρήσεις της GenBank που αφορούσαν κωδικές αλληλουχίες του *B. oleae*, εκ των οποίων μόνο οι 12 αντιπροσώπευαν μοναδικές αλληλουχίες. Οι υπόλοιπες αντιστοιχούσαν σε διαφορετικά ηλεκτροφορετικά αλληλόμορφα (Goulielmos et al. 2003) ή εναλλακτικά μεταγράφα τους. Η διαθεσιμότητα των αλληλουχιών των 195 ESTs παρείχε τη δυνατότητα καθορισμού ενός νέου εμπλουτισμένου προτύπου επιλογής των κωδικονίων. Το νέο πρότυπο βασίστηκε στις συχνότητες χρήσης 40,359 κωδικονίων των προβλεπόμενων αμινοξικών αλληλουχιών των ESTs, ενώ συμπεριλήφθηκαν και 5,403 κωδικόνια των ήδη κατατεθειμένων αλληλουχιών του *B. oleae*.

Από το πρότυπο που προέκυψε καθορίζονται τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα κωδικόνια στο *B. oleae* για κάθε αμινοξύ. Αντιθέτως οι μικρότερες συχνότητες που χαρακτηρίζουν ορισμένες τριπλέτες δεν υποδηλώνουν αναγκαστικά ότι πρόκειται για σπάνια κωδικόνια, αν και η χαμηλή συχνότητα είναι

χαρακτηριστικό των σπάνιων κωδικονίων (Chen & Texada 2006). Στη *D. melanogaster* έχουν χαρακτηριστεί οκτώ σπάνια κωδικόνια για τα ακόλουθα αμινοξέα: i) αργινίνη (AGA, CGA και CGG), ii) ισολευκίνη (AUA), iii) λευκίνη (UUA), iv) γλυκίνη (GGG), v) σερίνη (AGU), vi) κυστεΐνη (UGU) (Zhang et al. 1991). Αντίστοιχα χαμηλές συχνότητες παρατηρήθηκαν και στο δάκο για τα κωδικόνια GGG (Gly) και CGG (Arg), υποδηλώνοντας ότι πρόκειται για εξελικτικά συντηρημένα σπάνια κωδικόνια που εντοπίζονται και στο γονιδίωμα του *B. oleae*. Αναφορικά ωστόσο με την τάση για χρήση γουανίνης ή κυτοσίνης στη Τρίτη θέση των κωδικονίων της *D. melanogaster* (Shields et al. 1988), δεν διαπιστώθηκε κάτι ανάλογο στην περίπτωση του δάκου.

Επιπλέον το πρότυπο χρήσης των κωδικονίων που καθορίστηκε, συγκρίθηκε περαιτέρω με τα αντίστοιχα πρότυπα 11 αντιπροσωπευτικών οργανισμών που ανήκαν είτε σε αρθρόποδα είτε σε σπονδυλωτά για να διερευνηθεί αν το πρότυπο αυτό είναι συντηρημένο και σε άλλα είδη. Οι γενετικές αποστάσεις που προέκυψαν από τις συχνότητες χρήσης κάθε κωδικονίου για κάθε αντίστοιχο αμινοξύ δεν ήταν αρκετά πληροφοριακές όσον αφορά τις εξελικτικές αποστάσεις μεταξύ των αρθρόποδων ειδών, σύμφωνα με τις εδραιωμένες φυλογενετικές σχέσεις. Ωστόσο παρατηρήθηκε η εξελικτική σχέση του *B. oleae* με τα συγγενικά του είδη *M. domestica* και *C. capitata*, υποδηλώνοντας τη νουκλεοτιδική εγγύτητα των γονιδίων των τριών οργανισμών. Η διαφοροποίηση του προτύπου χρήσης διαπιστώθηκε πως ήταν εντονότερη, όσο μεγάλωνε η εξελικτική απόσταση του *B. oleae* από τους υπόλοιπους εξεταζόμενους οργανισμούς. Οι παρατηρούμενες αυτές διαφορές θα μπορούσαν να ερμηνευτούν ως ένδειξη των διαφορών της γονιδιακής σύστασης μεταξύ αρθρόποδων και σπονδυλωτών, που έχουν επέλθει μετά το διαχωρισμό των εξελικτικών τους κλάδων, αλλά και της διαφοροποιημένης γονιδιακής τους έκφρασης. Η γνώση του προτύπου χρήσης των συνώνυμων κωδικονίων εντός ή μεταξύ γονιδίων και γονιδιωμάτων αντίστοιχα, δύναται να παρέχει

χρήσιμες πληροφορίες για την εξέλιξη των ειδών και την αναδόμηση μοριακών φυλογενετικών σχέσεων (Knight et al. 2001) αλλά και να συνεισφέρει στη μεγιστοποίηση *in vivo* γενετικών χειρισμών και την αποτελεσματικότητα μοριακών τεχνικών. Για παράδειγμα μια τέτοια εφαρμογή θα μπορούσε να είναι η βελτίωση του σχεδιασμού ολιγονουκλεοτιδικών μορίων (εκκινητών ή ανιχνευτών) σε μη χαρακτηρισμένους οργανισμούς βάσει ετερόλογων αλληλουχιών. Στην περίπτωση του δάκου είναι προφανής η συνεισφορά σε αυτό το επίπεδο, καθώς οι γενετικές του πληροφορίες είναι περιορισμένες. Επιπλέον, ο χαρακτηρισμός του προτύπου χρήσης των κωδικονίων ενός οργανισμού, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον εντοπισμό γονιδίων που ενδέχεται να έχουν προκύψει από οριζόντια μεταφορά καθώς αναμένεται να παρουσιάζονται σπάνιες αποκλίσεις στην κατανομή των συνώνυμων κωδικονίων.

Φυλογενετικές συγκρίσεις μέσω

EPIC-PCR δεικτών

Οι EST αλληλουχίες χρησιμοποιήθηκαν επίσης για το σχεδιασμό EPIC εκκινητών με σκοπό τη σύγκριση ιντρονικών περιοχών σε συγγενικά είδη διπτέρων εντόμων. Κατά τον αρχικό έλεγχο λειτουργικότητας των 20 εκκινητών που σχεδιάστηκαν, τρία ζεύγη δεν έδωσαν προϊόν ενίσχυσης στο γονιδίωμα του *B. oleae*. Το γεγονός αυτό πιθανόν να οφείλεται σε τεχνικούς παράγοντες όπως η δυσκολία σύνθεσης του προϊόντος σύμφωνα με τις καθορισμένες συνθήκες της αντίδρασης (χρόνος επιμήκυνσης) εάν επρόκειτο να ενισχυθεί περιοχή μεγαλύτερου μεγέθους από το αναμενόμενο. Η εκδοχή αυτή υποδηλώνει δηλαδή την ύπαρξη μεγαλύτερων ιντρονίων στο *B. oleae* και ενισχύεται από τη γενικότερη διαφοροποίηση της οργάνωσης των γονιδιωμάτων των δύο οργανισμών. Άλλωστε το μέγεθος του γονιδιώματος του *B. oleae* είναι σχεδόν διπλάσιο αυτού της *D. melanogaster* και έχει ήδη αποδειχθεί ότι στο γενετικό τόπο της ακετυλοχολινεστεράσης τα ιντρόνια του *B. oleae* είναι μεγαλύτερα (Κακάνη 2009). Εναλλακτικά θα

μπορούσε να οφείλεται στη διαφορετική οργάνωση των εξεταζόμενων γονιδίων συγκριτικά με τα ομόλογά τους της *D. melanogaster*, σε σχέση με τη σειρά εξονίων-ιντρονίων. Αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές εστιάζουν στη προσέγγιση αυτή (Palumbi & Baker 1994, Villablanca et al. 1998, Rogozin et al. 2002) αποδεικνύοντας τη χρηστικότητα των ιντρονικών αλληλουχιών στην απεικόνιση εξελικτικών σχέσεων και στη διαλεύκανση φαινομένων τρέχουσας ειδογένεσης.

Η αποτελεσματικότητα της δια-ειδικής εφαρμογής έγκειται στη συντηρημένη περιοχή σχεδιασμού των εκκινητών, η οποία αναμένεται να έχει συσσωρεύσει μικρό ποσοστό μεταλλάξεων κατά την εξέλιξη των ειδών. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η επιτυχής υβριδοποίηση των ετερόλογων εκκινητών στις ομόλογες γονιδιωματικές αλληλουχίες των προς ανάλυση οργανισμών και η τελικά η δια-ειδική ενίσχυσή τους. Η παραπάνω υπόθεση επιβεβαιώθηκε από την πλειονότητα των αποτελεσμάτων της δια-ειδικής εφαρμογής των EPIC δεικτών του *B. oleae* στα 11 είδη της οικογένειας Tephritidae. Για τις περιπτώσεις που δεν παρατηρήθηκε προϊόν δια-ειδικής ενίσχυσης σε κάποιο από τα εξεταζόμενα είδη, πιθανόν να ευθύνεται η μη αποτελεσματική υβριδοποίηση των εκκινητών ή η αδυναμία σύνθεσης του αναμενόμενου προϊόντος με βάση τις συνθήκες της αντίδρασης που εφαρμόστηκαν, όπως σχολιάστηκε παραπάνω, λόγω της παρουσίας εν δυνάμει μεγαλύτερων ιντρονικών περιοχών σε αυτά εάν επρόκειτο να ενισχυθεί περιοχή μεγαλύτερου μεγέθους από το αναμενόμενο.

Όσον αφορά τα υπόλοιπα 17 ζεύγη εκκινητών, αποδείχθηκαν υψηλά συντηρημένα και λειτουργικά κατά την δια-ειδική ενίσχυσή τους στην οικογένεια Tephritidae. Επιπλέον εκτός από τη συντήρηση των εκατέρωθεν εξονικών αλληλουχιών, το γεγονός ότι ενισχύθηκαν οι ίδιες ιντρονικές περιοχές των ομόλογων γονιδίων υποδεικνύει ότι οι θέσεις των ιντρονίων μεταξύ των ειδών αυτών είναι συντηρημένες. Οι πολυμορφισμοί μήκους που διαπιστώθηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις είναι απόρροια της δημιουργίας ενθέσεων ή ελλείψεων (indel) κατά μήκος των αλληλουχιών.

Η ευκολία με την οποία οι EPIC δείκτες σχεδιάστηκαν με βάση τις μεταγραφόμενες πληροφορίες και ακολούθως ενισχύθηκαν στο γονιδιωματικό DNA, σε συνδυασμό με τα υψηλά ποσοστά λειτουργικότητας, υποδηλώνει την προοπτική της συγκεκριμένης προσέγγισης σε φυλογενετικές συγκρίσεις. Ωστόσο η εφαρμογή της σε απομακρυσμένα εξελικτικά είδη (διαφορετικών taxa) ίσως να είναι περιορισμένη, λόγω της διαφοροποίησης των εξονίων κατά την εξέλιξη. Ως αποτέλεσμα, η μειωμένη συντήρηση των θέσεων συμπληρωματικότητας θα οδηγήσει στην αδυναμία υβριδοποίησης των ετερόλογων EPIC εκκινήτων (Zhang & Hewitt 2003).

Προγενέστερες και εδραιωμένες μοριακές φυλογενετικές αναλύσεις στο *B. oleae* βασίζονταν κυρίως σε μιτοχονδριακές αλληλουχίες (Han & Ro 2009, Han et al. 1994; 1997; 2000). Τα αποτελέσματα της παρούσας προσέγγισης είναι σε συμφωνία τόσο με τις αναλύσεις αυτές όσο και με την απόδοση της δια-ειδικής ενίσχυσης μικροδορυφορικών δεικτών που παρατηρήθηκε από τους Augustinos et al. (2008).

Τα αποτελέσματα των ομοπαράθεσεων των EPIC αλληλουχιών από τα διάφορα Terphritidae που αναλύθηκαν επιβεβαίωσαν τη στενή φυλογενετική σύνδεση ανάμεσα στα γένη *Bactrocera* και *Ceratitis*, με τα γένη *Anastrepha* και *Rhagoletis* να ακολουθούν ως πιο εξελικτικά απομακρυσμένα. Επιπλέον τα εξεταζόμενα είδη ομαδοποιήθηκαν στα αντίστοιχα γένη τους, υποστηρίζοντας τη μονοφυλετική προέλευση του κάθε κλάδου με υψηλές τιμές bootstrap κατά την επαναδειγματοληπτική αξιολόγηση των δένδρων. Αξιόλογο ενδιαφέρον όσον αφορά την τοπολογία αλλά και την απόδοση της ενίσχυσης που παρουσιάζει το είδος *B. cucurbitae*, το οποίο εμφανίζεται σε όλες τις περιπτώσεις να διαχωρίζεται σαφώς από τα υπόλοιπα είδη του κλάδου των *Bactrocera*, σημειώνοντας την εξελικτική του απόσταση από αυτά. Η σημασία των EPIC δεικτών έγκειται στο γεγονός ότι είναι διάσπαρτοι στο γονιδίωμα και ως πυρηνικοί δείκτες δεν ακολουθούν ανεξάρτητη εξελικτική πορεία, όπως συμβαίνει με εκείνους μιτοχονδριακής

προέλευσης. Στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι σκοπός της ανάλυσης των EPIC δεικτών στην παρούσα μελέτη ήταν ο έλεγχος της χρήσης και της αποτελεσματικότητας των συγκεκριμένων δεικτών σε ενδεχόμενες φυλογενετικές προσεγγίσεις. Η συγκεκριμένη προσπάθεια δεν στοιχειοθετεί μια πληθυσμιακή φυλογενετική ανάλυση, δεδομένου ότι ενδεικτικά εξετάστηκε ένα άτομο ανά είδος. Ωστόσο από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η χρήση αυτών των δεικτών μπορεί να συμβάλει στην διαλεύκανση φυλογενετικών σχέσεων ιδιαίτερα σε περιπτώσεις συμπλεγμάτων ειδών (complex species) τα οποία είναι πολύ κοινά στην οικογένεια Terphritidae και την κατανόηση της ραγδαίας ειδογένεσης.

4.3 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΟΥ ΡΕΤΡΟΜΕΤΑΘΕΤΟΥ ΣΤΟΙΧΕΙΟΥ ACHILLES

Τα μεταθετά στοιχεία που έχουν χαρακτηριστεί στην τάξη των δίπτερων εντόμων έχει διαπιστωθεί ότι καταλαμβάνουν ένα σημαντικό ποσοστό των γονιδιωμάτων τους. Αν και δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο ρόλος τους, εμπλέκονται σε ποικίλες διαδικασίες όπως η υβριδική δυσγένεση, η οριζόντια μεταφορά, το εναλλακτικό μάτισμα γονιδίων, η χρωμοσωμική αναδιάταξη, η τροποποιημένη γονιδιακή έκφραση, η δημιουργία ετεροχρωματίνης, ακόμα και στη δομή μιας νέας μορφής τελομερών (Kidwell et al. 2005). Επιπρόσθετα, ορισμένα από αυτά εντοπίζονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές χρωμοσωμάτων και ιδιαίτερα στο Y χρωμόσωμα, που έχει προταθεί είτε ως η πηγή των ρετρομεταθετών στοιχείων, είτε ως η περιοχή συσσώρευσής τους (Rohr et al. 2002).

Σε προγενέστερες της παρούσας μελέτες που αφορούσαν τη διερεύνηση της οργάνωσης του Y χρωμοσώματος του δάκου και ιδιαίτερα το χαρακτηρισμό Y ειδικών ή εμπλουτισμένων αλληλουχιών, απομονώθηκε ένα τμήμα DNA μεγέθους 1.2 kb (1.2-5FF) το οποίο εμφανίστηκε να συσσωρεύεται ιδιαίτερα στα αρσενικά άτομα. Ο καθορισμός της αλληλουχίας του έδειξε ομολογία με τμήμα του LTR ρετρομεταθετού στοιχείου MAX

της *D. melanogaster* με προτίμηση στο Υ χρωμόσωμα (Marsano et al. 2004). Το απομονωμένο αυτό τμήμα, θεωρήθηκε ότι ανήκει στο δυνητικό ρετρομεταθετό στοιχείο που ονομάστηκε *Achilles*.

Η ιδιαίτερη σημασία που παρουσιάζουν τα μεταθετά στοιχεία λόγω της επίδρασής τους στην οργάνωση και εξέλιξη των γονιδιωμάτων, αλλά και της δυνατότητας να λειτουργήσουν ως σημαντικά εργαλεία στην εφαρμοσμένη έρευνα μέσω της χρήσης τους ως φορείς γενετικού μετασχηματισμού, καθιστά σημαντική την ανάλυσή τους. Επιπλέον, δεδομένου ότι αφενός δεν έχουν περιγραφεί καθόλου μεταθετά στοιχεία στο δάκο και αφετέρου του ιδιαίτερου ενδιαφέροντος που παρουσιάζει η κατανομή του *Achilles* κατά προτίμηση στο Υ χρωμόσωμα, θεωρήθηκε αναγκαία η προσπάθεια απομόνωσης της πλήρους αλληλουχίας του ρετρομεταθετού *Achilles* και ο ακόλουθος χαρακτηρισμός της δομής του.

Στα πλαίσια της απομόνωσης ενός ακέραιου στοιχείου *Achilles* πραγματοποιήθηκε αρχικά απευθείας διαλογή της γονιδιωματικής λ βιβλιοθήκης του δάκου με χρήση του τμήματος 1.2-5FF ως ανιχνευτή, χωρίς τα αναμενόμενα αποτελέσματα ως προς την παρουσία του ρετρομεταθετού στους κλώνους που απομονώθηκαν. Εναλλακτικά πραγματοποιήθηκε διαλογή προεπιλεγμένων μέσω PCR κλασμάτων γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, με νέους εκκινητές που ενίσχυαν ένα εσωτερικό τμήμα του αρχικού ανιχνευτή 1.2-5FF. Από τη διαδικασία αυτή επιλέχθηκε τελικά ένας φαγικός κλώνος προς ανάλυση και επεξεργασία του ενθέματός του.

Από την *in silico* επεξεργασία των αλληλουχιών που ανακτήθηκαν μετά από διαφορετικές μοριακές προσεγγίσεις απομόνωσης του *Achilles*, διαπιστώθηκε ότι το στοιχείο *Achilles* που απομονώθηκε από το συγκεκριμένο φάγο, αποτελεί ένα μη ακέραιο αντίγραφο της οικογένειας των LTR ρετρομεταθετών στοιχείων BEL-Pao. Η μη ακεραιότητα του συγκεκριμένου αντιγράφου οφείλεται στην απουσία της 3' UTR περιοχής καθοδικά του ORF της πολυπρωτεΐνης gag-pol, αλλά και του 3' LTR. Το γεγονός αυτό είναι πιθανό

να σχετίζεται με τη δημιουργία της βιβλιοθήκης, χωρίς ωστόσο να αποκλείεται και η ύπαρξη μη ακέραιων αντιγράφων στο γονιδίωμα. Συγκεκριμένα, τα τμήματα του γονιδιωματικού DNA που χρησιμοποιήθηκαν κατά την κατασκευή της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης ήταν προϊόντα κατάτμησης με την ενδονουκλεάση περιορισμού EcoRI, τα οποία κλωνοποιήθηκαν στις αντίστοιχες θέσεις του λ φάγου. Η συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης εντοπίζεται επίσης και στην περιοχή καθοδικά του μοτίβου της ιντεγκράσης, ενισχύοντας την άποψη ότι η δομή του στοιχείου που απομονώθηκε έχει διακοπεί κατά τη διαδικασία κατασκευής της βιβλιοθήκης και συνεπώς είναι πιθανό να εντοπίζονται ακέραια στοιχεία εντός του γονιδιώματος.

Από την ανάλυση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας προσδιορίστηκε το αναγνωστικό πλαίσιο που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη gag-pol των ρετρομεταθετών BEL-Pao και παράλληλα εντοπίστηκαν τα τυπικά μοτίβα που χαρακτηρίζουν τα αντίστοιχα γονίδια. Η σειρά διευθέτησης των γονιδίων αυτών στην περιοχή pol ήταν σε αντιστοιχία με την παρατηρούμενη τοπολογία που απαντάται στα στοιχεία της συγκεκριμένης οικογένειας.

Κατά την επεξεργασία της προβλεπόμενης αμινοξικής αλληλουχίας, διαπιστώθηκε ότι εμφανίζονται πρόωρα κωδικόνια λήξης που διακόπτουν το αναγνωστικό πλαίσιο της πολυπρωτεΐνης και επιπλέον έλλειψη της καταλυτικής περιοχής της RH. Αυτά τα κωδικόνια λήξης δεν αντιστοιχούν σε πραγματικά σήματα τερματισμού της πρωτεϊνικής σύνθεσης στην αρχική αλληλουχία, αλλά φαίνεται να έχουν προκύψει από σημειακές μεταλλάξεις μονού νουκλεοτιδίου. Το συμπέρασμα αυτό συνάγεται από τη σύγκριση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας του *Achilles* με το ρετρομεταθετό στοιχείο MAX, από την οποία διαπιστώνεται η ύπαρξη μιας μετάπτωσης από T σε C (θέση: 3436 nt) και δύο μεταστροφών από T σε G (θέση: 3997 nt) και A (θέση: 4186 nt) αντίστοιχα. Παρόμοιες περιπτώσεις ύπαρξης σημειακών μεταλλάξεων εντός της κωδικής αλληλουχίας ή και έλλειψης γονιδιακών

περιοχών έχουν παρατηρηθεί σε πολλές περιπτώσεις μη λειτουργικών αντιγράφων ρετρομεταθετών στοιχείων (Felder et al. 1994, Frame et al. 2001, Abe et al. 2001). Ενδεικτικά παραδείγματα αποτελούν τα ρετρομεταθετά στοιχεία *Pao* και *Tas*. Για τα πρώτα, στα αρχικά αντίγραφα που απομονώθηκαν δεν εντοπίστηκαν οι περιοχές που κωδικοποιούν την RH καθώς και την INT (Xiong et al. 1993), ενώ στα στοιχεία *Tas* το γονίδιο της RT είχε συσσωρεύσει σημειακές μεταλλάξεις που το είχαν καταστήσει μη λειτουργικό (Felder et al. 1994). Αν η συσσώρευση αυτών των μεταλλάξεων είναι τυχαία, είναι δύσκολο να θεωρηθεί κάτι αντίστοιχο για την περίπτωση της έλλειψης μιας ολόκληρης περιοχής που κωδικοποιεί ένα πρωτεϊνικό προϊόν, όπως η RH. Εντούτοις δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές που να ερμηνεύουν τις αιτίες ή τους μηχανισμούς που οδηγούν στην έλλειψη ενός και μόνο ολόκληρου γονιδίου. Δεν αποκλείεται ωστόσο η απώλεια του γονιδίου αυτού να αντιπροσωπεύει τον τρόπο με τον οποίο τα κύτταρα του *B. olerae* ρυθμίζουν την μετάθεση του ρετρομεταθετού, ώστε να εξασφαλίζεται η μη ανεξέλεγκτη αντιγραφή τους, αλλά και η διατήρηση της δυναμικής ισορροπίας μεταξύ της ενεργότητας και της συχνότητας εξάλειψής τους.

Τα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία βασίζονται σε μια λεπτομερή ακολουθία γεγονότων στην οποία εμπλέκονται τα γονίδια RT και RH, καθώς και τα άκρα LTR, ώστε να εξασφαλιστεί η σύνθεση του δίκλωνου DNA τους μετά από αντίστροφη μεταγραφή της μήτρας RNA από την RNA πολυμεράση II του ξενιστή. Η ενεργότητα της RH είναι υπεύθυνη για την αποικοδόμηση της μήτρας RNA και την απελευθέρωση της πολυουρινικής ουράς PPT, η οποία είναι ιδιαίτερα ανθεκτική στη δράση του συγκεκριμένου ενζύμου και λειτουργεί ως εκκινητής για τη σύνθεση της θετικής αλυσίδας DNA του LTR ρετρομεταθετού. Βάσει της λειτουργίας της αυτής, η RH καθορίζει τα άκρα των LTR και επηρεάζει ουσιαστικά την ικανότητα σύνθεσης δίκλωνων ενδιάμεσων μορίων DNA, κατά τη διάρκεια αντιγραφής των στοιχείων αυτών.

Συνεπώς είναι επιβεβλημένο τα LTR ρετρομεταθετά να φέρουν το γονίδιο που κωδικοποιεί την RH.

Παρόλα αυτά, στην περίπτωση των μη λειτουργικών αντιγράφων του *Achilles*, οι πρωτεϊνικές λειτουργίες που έχουν απολεσθεί εξαιτίας των ελλείψεων ή των σημειακών μεταλλάξεων που εντοπίστηκαν στα αντίστοιχα γονίδια που τις κωδικοποιούν, ενδέχεται να παρέχονται *in trans* από κάποιο άλλο ακέραιο και πλήρες αντίγραφο του μεταθετού. Εναλλακτικά τα απαιτούμενα πρωτεϊνικά προϊόντα μπορεί να προκύπτουν από τη μετάφραση γονιδίων που δεν ανήκουν στο *Achilles*, αλλά σε διαφορετικά ρετρομεταθετά στοιχεία του γονιδιώματος. Στην περίπτωση της έλλειψης της RH και οι δύο υποθέσεις είναι πιθανές, καθώς είναι δύσκολη η επαφή με τις κυτταρικά κωδικοποιούμενες πρωτεΐνες. Συγκεκριμένα οι RH του ξενιστή εντοπίζονται περιοριστικά στον πυρήνα και τα οργανίδια των κυττάρων του, ενώ αντίθετα το μεγαλύτερο ποσοστό του κύκλου ζωής των LTR ρετρομεταθετών στοιχείων διαδραματίζεται στο κυτταρόπλασμα ή στο εσωτερικό ιικού τύπου σωματίων.

Η αδυναμία απομόνωσης ενός ακέραιου αντιγράφου αρχικά, αλλά και ακολούθως της 3' περιοχής του που θα περιελάμβανε το 3' LTR παρά τις εναλλακτικές προσεγγίσεις που εφαρμόστηκαν, κατέστησε δύσκολο τον εντοπισμό και κατ' επέκταση τον καθορισμό του 5' LTR στη διαθέσιμη αλληλουχία της περιοχής ανοδικά του ORF. Ωστόσο ο εντοπισμός της συμπληρωματικής αλληλουχίας του 3' άκρου του tRNA της τυροσίνης, που λειτουργεί ως θέση δέσμησης του εκκινητή (PBS) για τη σύνθεση της αρνητικής αλυσίδας του DNA κατά την αντιγραφή του ρετρομεταθετού, σηματοδότησε την προσπάθεια καθορισμού του δυνητικού 5' LTR. Σύμφωνα με το κοινό χαρακτηριστικό των ρετρομεταθετών στοιχείων της οικογένειας BEL και όχι μόνο, ότι τα άκρα LTR οριοθετούνται από την ύπαρξη του ανάστροφου δινουκλεοτιδικών επαναλήψεων 5' TG/CA 3' και η περιοχή PBS εντοπίζεται σχεδόν αμέσως καθοδικά του LTR (Felder et al. 1994), ήταν τελικά εφικτός ο δυνητικός προσδιορισμός της περιοχής του 5' LTR,

το μήκος του οποίου προσδιορίστηκε ίσο με 677 bp. Το μήκος της αλληλουχίας του LTR του *Achilles* είναι σχεδόν διπλάσιο συγκριτικά με εκείνο του MAX (321 bp). Εντούτοις η παρατηρούμενη τιμή μεγέθους εμπίπτει στα όρια που έχουν προσδιοριστεί για άλλα στοιχεία, δεδομένης της ποικιλομορφίας που απαντάται. Ενδεικτικά, τα LTR των στοιχείων Pao, *Kamikaze*, BEL, *ninja* και *moose* έχουν μήκος 620-840, 170, 361, 316 και 265 bp αντίστοιχα (Abe et al. 2001). Κατά την ανάλυση της περιοχής αυτής ωστόσο δεν εντοπίστηκε η αλληλουχία AATAAA που αποτελεί το κοινό σήμα πολυαδενυλίωσης και είναι χαρακτηριστικό του άκρου της αλληλουχίας R των LTR. Παρόλα αυτά εντοπίστηκε η αλληλουχία ATTAAG (285-290 bp) που θα μπορούσε εναλλακτικά να λειτουργήσει ως σήμα πολυαδενυλίωσης (Benachenhou et al. 2009) ή να δηλώσει την ύπαρξη σημειακής μετάλλαξης στην πρώτη θέση T της αρχικής αλληλουχίας. Και τα δύο ενδεχόμενα αναμένεται να αποσαφηνιστούν εφόσον μελλοντικά απομονωθούν επιπλέον ακέραια αντίγραφα του στοιχείου και ακολουθήσει συγκριτική ανάλυση των αλληλουχιών LTR. Εάν όντως υφίστανται εναλλακτικά σήματα πολυαδενυλίωσης, τότε ενδέχεται να σχετίζονται περιοριστικά με την επεξεργασία και η επιλογή τους να συνιστά μηχανισμό ρύθμισης του ρετρομεταθετού.

Μελλοντικά η απομόνωση ενός ακέραιου αντιγράφου του στοιχείου *Achilles* θα επιτρέψει τον ακριβή καθορισμό της αλληλουχίας των LTR, δίνοντας τη δυνατότητα επιπλέον διερεύνησης του στοιχείου από εξελικτική σκοπιά. Συγκεκριμένα, βάσει της απόκλισης των αλληλουχιών των LTR σε συνώνυμες θέσεις δίνεται η δυνατότητα προσδιορισμού του χρόνου ένθεσης του στοιχείου στο γονιδίωμα του ξενιστή (Dangel et al. 1995). Δεδομένου ότι κατά την ένθεση οι αλληλουχίες των LTR είναι πανομοιότυπες, ο καθορισμός του ποσοστού της διαφοροποίησής τους σε συνάρτηση με το ρυθμό μεταλλαξιγένεσης, δύναται να προσδιορίσει το χρονικό διάστημα που έχει παρέλθει από την ενσωμάτωση του στοιχείου, προτείνοντας και πιθανές πηγές προέλευσής του.

Όσον αφορά την περιοχή μεταξύ του δυνητικού 5' LTR και του ORF της πολυπρωτεΐνης gag-pol, εμφανίζεται να ακολουθεί τη δομή που παρουσιάζεται κοινή ανάμεσα στις αντίστοιχες περιοχές των στοιχείων BEL-Pao. Συγκεκριμένα οι 5' UTR περιοχές εμφανίζονται πλούσιες σε επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, οι οποίες συχνά λειτουργούν ως ισχυρές ρυθμιστικές αλληλουχίες, όπως για παράδειγμα ενισχυτές (enhancers) της γονιδιακής έκφρασης ή ακόμα και μονωτές (insulators) (Marsano et al. 2004).

Το επόμενο στάδιο κατά την ανάλυση του *Achilles* ήταν ο έλεγχος της ενεργότητάς του. Απαραίτητη προϋπόθεση που καθιστά τα LTR ρετρομεταθετά στοιχεία ικανά προς μετάθεση, αποτελεί η μεταγραφή και ακολούθως η μετάφραση της γενετικής πληροφορίας που κωδικοποιούν. Τα RNA μετάγραφα των ρετρομεταθετών στοιχείων λειτουργούν αφενός ως mRNA που κωδικοποιούν τις απαραίτητες για την μετάθεση πρωτεΐνες και αφετέρου ως ενδιάμεσα μόρια που συνιστούν τη μήτρα για την επακόλουθη δράση της αντίστροφης μεταγραφάσης. Συνεπώς αναμένεται ότι η ύπαρξη μεταγράφων των ακέραιων στοιχείων υποδηλώνει την ενεργότητά τους. Η μεταγραφική ικανότητα των μεταθετών στοιχείων είναι δυνατόν να προσδιοριστεί είτε με την αναζήτηση ομολογίας σε Βάση Δεδομένων EST και επομένως με αλληλουχίες που εκφράζονται, είτε μέσω ελέγχου με PCR αντίστροφης μεταγραφής (Tu 2005).

Στην περίπτωση του *Achilles*, ακολουθήθηκε η δεύτερη πορεία, δεδομένης της περιορισμένης διαθεσιμότητας αλληλουχιών EST. Τα προϊόντα ενίσχυσης που παρατηρήθηκαν μέσω αντίστροφης μεταγραφής στο ολικό cDNA ατόμων του δάκου συνηγορούν στην ύπαρξη τουλάχιστον ενός ενεργού στοιχείου στο γονιδίωμα, το οποίο δυνητικά μπορεί να οδηγήσει σε νέες ενθέσεις, εφόσον βρεθεί σε ευνοϊκό περιβάλλον γεγονότων ρετρομετάθεσης. Η ικανότητα μετάθεσης μπορεί επίσης να ελεγχθεί μελλοντικά εξετάζοντας την ποικιλομορφία των μοτίβων κατανομής του στοιχείου ανάμεσα στα γονιδιώματα διαφορετικών στελεχών του *B. oleae*. Οποιαδήποτε

διαφοροποίηση θα υποδηλώνει ενεργότητα του στοιχείου. Μάλιστα αν αυτή η διαφορά εντοπίζεται μόνο στα αρσενικά άτομα, θα υποδηλώνει τον Y-ειδικό εντοπισμό των ενεργών στοιχείων, υποστηρίζοντας την άποψη ότι το Y χρωμόσωμα μπορεί να αποτελεί πηγή άντλησης ρετρομεταθετών και όχι μόνο δεξαμενή συσσώρευσης ανενεργών καταλοίπων. Στην *C. capitata* έχει αναφερθεί η παρουσία ενός μόνο LTR ρετρομεταθετού στοιχείου της οικογένειας *gypsy* με ικανότητα μετάθεσης, του *γογο* (Zhou & Haymer 1998). Για το συγκεκριμένο στοιχείο, τα ακέραια ενεργά αντίγραφα εντοπίζονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές των αυτοσωμάτων, ενώ αρχικά είχε εντοπιστεί ένα μη ακέραιο αντίγραφο στο Y χρωμόσωμα. Αντίθετα στην περίπτωση του LTR ρετρομεταθετού στοιχείου *mtanga* της οικογένειας *copia* του *A. gambiae* εντοπίστηκαν ενεργά αντίγραφα στο Y χρωμόσωμα, ενώ αντίγραφα που έφεραν ελλείψεις ή μεταλλάξεις και είχαν αυτοσωμικό εντοπισμό δεν παρουσίασαν ικανότητα μεταγραφής και επομένως ούτε μετάθεσης (Rohr et al. 2002). Η παρουσία ενεργών LTR ρετρομεταθετών στοιχείων είναι κοινό χαρακτηριστικό στα έντομα, έχοντας εντοπιστεί κατά προσέγγιση 60 τέτοιες οικογένειες (Eickbush & Malik 2002). Αντίθετα στον άνθρωπο (πρώτιστα) για παράδειγμα υφίστανται μόνο κατάλοιπά τους, με τελευταία ένδειξη μετάθεσης να χρονολογείται 40 εκατομμύρια χρόνια πριν. Η μοναδική ενεργή οικογένεια ανήκει στα μη LTR στοιχεία LINES, από την επεξεργασία των οποίων προέκυψε και η επίσης δυνητικά ενεργή οικογένεια Alu (SINE) (Eickbush 2002). Διαφαίνεται λοιπόν ότι η εξελικτική ιστορία ενός οργανισμού και οι δυνάμεις που εξασφαλίζουν την πλαστικότητα του γονιδιώματός του, στοιχειοθετούν τους κύριους λόγους για τους οποίους παρατηρείται διαφοροποίηση της ενεργότητας των μεταθετών στοιχείων (Oliver & Greene 2010).

Εκτός από την ενεργότητα, σε μηχανισμούς ρύθμισης υπόκεινται και ο αριθμός των μεταθετών στοιχείων. Στη *Drosophila*, εξαιτίας κυρίως των εκτεταμένων φαινομένων ανασυνδυασμού, το ποσοστό των μεταθετών στοιχείων στις

ευχρωματινικές περιοχές του γονιδιώματος δεν ξεπερνά το 2%, σε αντίθεση με τον άνθρωπο που το αντίστοιχο ποσοστό αγγίζει το 45% (Eickbush 2002). Είναι συνεπώς σημαντικό κάθε ανάλυση που αφορά μεταθετά στοιχεία να συνοδεύεται και από πληροφορίες σχετικά με τη συνεισφορά τους στην γονιδιακή οργάνωση. Με γνώμονα την ανάγκη αυτή έγινε προσπάθεια να προσδιοριστούν τα αντίγραφα του *Achilles* στο γονιδίωμα του *B. oleae* και κατ' επέκταση η εκτίμηση της συμμετοχής του στη δομή του γονιδιώματος. Ο αριθμός των αντιγράφων βρέθηκε να ισούται κατά προσέγγιση με 42 αντίγραφα ανά απλοειδές γονιδίωμα των αρσενικών ατόμων του *B. oleae*, τιμή που εμπίπτει στα συνήθη όρια εμφάνισης των ρετρομεταθετών στοιχείων BEL-Pao (Frame et al. 2001). Το νούμερο αυτό προφανώς αντιστοιχεί τόσο σε ανενεργά αντίγραφα που έχουν χάσει την ικανότητα μετάθεσής τους, όπως αυτό που απομονώθηκε στην παρούσα μελέτη, όσο και σε ενεργά αντίγραφα, εφόσον αυτά υπάρχουν.

Η μελλοντική αναζήτηση νέων ακέραιων αντιγράφων του στοιχείου θα μπορούσε να αποφέρει και κλώνους από γειτονικές περιοχές του *Achilles*, μερικές εκ των οποίων ενδέχεται να αντιπροσωπεύουν μοναδικές αλληλουχίες του Y χρωμοσώματος, δεδομένου ότι το συγκεκριμένο ρετρομεταθετό εμφανίζει προτίμηση στο Y χρωμόσωμα. Οι μοναδικές αυτές περιοχές, εξαιτίας της προέλευσής τους θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ως Y ειδικοί ανιχνευτές και επιπρόσθετα να παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη δομή και την οργάνωση του συγκεκριμένου χρωμοσώματος.

Τέλος, η γνώση της συμπεριφοράς των μεταθετών στοιχείων και οι αλληλεπιδράσεις τους με το γονιδίωμα του ξενιστή τους, μπορεί να βοηθήσει στη βελτίωση των φορέων μετασχηματισμού που βασίζονται στη χρήση μεταθετών στοιχείων, ώστε να εξασφαλίζεται η μείωση της πιθανότητας απενεργοποίησής τους από ενδογενή στοιχεία, αλλά και η επαγωγή της μετάθεσης (cross-mobilization) από άλλα στοιχεία. Εξάλλου ένα θεμελιώδες ζήτημα προς διερεύνηση αποτελεί η ανάγκη ανάπτυξης συστημάτων *in vitro*

ρετρομετάθεσης που θα επιτρέψουν αφενός την ανάλυση των μοριακών μηχανισμών που διέπουν τη μετακίνηση των μεταθετών στοιχείων και αφετέρου την ταυτοποίηση των απαραίτητων αλληλουχιών και παραγόντων που εμπλέκονται προς την κατεύθυνση αυτή. Η κατανόηση των μηχανισμών αυτών θα διευκολύνει δυνητικά τη χρήση τους ως εργαλεία για τη μεταφορά ή τη σίγηση γονιδίων, οδηγώντας στην ανάπτυξη νέων εναλλακτικών στρατηγικών ελέγχου.

Παράλληλα, ενδογενή στοιχεία όπως το *Achilles* μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη μοριακών δεικτών με εφαρμογή τόσο στη γενετική χαρτογράφηση όσο και σε πληθυσμιακές μελέτες. Συγκριτικές μελέτες όσον αφορά τη δομή και την κατανομή των μεταθετών στοιχείων μεταξύ διαφορετικών στελεχών δάκου αλλά και συγγενικών του ειδών θα συνεισφέρουν σημαντικά στην κατανόηση της εξέλιξης και της ένθεσης των στοιχείων αυτών, αλλά και της επίδρασής τους στη δημιουργία τυχαίων μεταλλάξεων και συνεπώς στην οργάνωση του γονιδιώματος του εντόμου.

4.4 ΚΕΝΤΡΟΜΕΡΙΚΗ ΔΟΡΥΦΟΡΙΚΗ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ BOR300

Οι δορυφορικές αλληλουχίες οργανώνονται συνήθως ως διαδοχικά μονομερή της τάξης των δεκάδων ή χιλιάδων αντιγράφων, τα οποία εντοπίζονται σε ετεροχρωματινικές περιοχές. Παρά την αφθονία τους, δεν κωδικοποιούν πρωτεϊνικά προϊόντα και γι' αυτό χαρακτηρίζονται ως άχρηστα ή εγωιστικά γενετικά στοιχεία (Charlesworth et al. 1994). Σε αντίθεση με την παραπάνω άποψη, οι χρωμοσωμικές περιοχές εντοπισμού τους είναι γνωστό ότι διαδραματίζουν σημαντικό, αλλά παρ' όλα αυτά μη πλήρως αποσαφηνισμένο ρόλο, στη δομή, τη σταθερότητα και το διαχωρισμό των χρωμοσωμάτων (Plohl et al. 2007).

Στην τελευταία ενότητα των αποτελεσμάτων περιγράφηκε η απομόνωση και ο χαρακτηρισμός της δορυφορικής αλληλουχίας BOR300 του γονιδιώματος του δάκου. Η αλληλουχία

απομονώθηκε κατά την επεξεργασία βακτηριοφαγικών κλώνων μετά από PCR διαλογή κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης, κατά τη διαδικασία αναζήτησης του ακέραιου αντιγράφου του μεταθετού στοιχείου *Achilles*.

Η αλληλουχία BoR300 αποτελείται από εν σειρά διαδοχικές επαναλαμβανόμενες μονάδες μήκους 298 bp. Τα μονομερή της αλληλουχίας αυτής εμφάνισαν σχετικά υψηλή συγκέντρωση των βάσεων A και T (60.4 %), ενώ η μεταξύ τους ομοπαράθεση δεν κατέδειξε σημαντικές αποκλίσεις στην πρωτοταγή τους δομή.

Η απόκλιση της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας ανάμεσα στα μονομερή της ίδιας οικογένειας δορυφορικού DNA ενδοειδικά στα έντομα είναι σχετικά χαμηλή και συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 1-13% (King & Cummings 1997). Η παρατηρούμενη απόκλιση μεταξύ των απομονωμένων αλληλουχιών BOR300 (2-12%) εμπίπτει στο παραπάνω όριο που χαρακτηρίζει το δορυφορικό DNA. Παράλληλα, ο επιλεκτικός εμπλουτισμός σε βάσεις A και T, έχει προταθεί ως συνέπεια της εξέλιξης του δορυφορικού DNA (Ugarkovic et al. 1996). Συνεπώς το σχετικά υψηλό ποσοστό που παρατηρήθηκε για το άθροισμα των δύο βάσεων στο μονομερές του BoR300, υποδηλώνει ότι πρόκειται για μια δορυφορική οικογένεια που δεν έχει εμφανιστεί πρόσφατα στο γονιδίωμα του εντόμου. Η μειωμένη ποικιλομορφία υποδεικνύει την ύπαρξη κάποιας μορφής πίεσης η οποία δεν επιτρέπει την απόκλιση της αλληλουχίας της επαναλαμβανόμενης μονάδας. Το φαινόμενο αυτό έχει περιγραφεί ως εναρμονισμένη εξέλιξη των μονομερών μιας επαναλαμβανόμενης ομάδας (Dover 1982), γεγονός που οδηγεί στην ομογενοποίηση της επαναλαμβανόμενης ομάδας ως αποτέλεσμα ενός μηχανισμού μοριακής καθοδήγησης. Στα έντομα, ειδικότερα στη *Drosophila*, το δορυφορικό DNA ανάλογα με το μήκος της επαναλαμβανόμενης μονάδας χαρακτηρίζεται ως απλό (5-10 bp) ή σύνθετο (180-400 bp). Η πλειοψηφία των δορυφορικών DNA που έχουν περιγραφεί στον συγκεκριμένο οργανισμό τα τελευταία 20 χρόνια ανήκουν στη δεύτερη κατηγορία (Kuhn et al. 2007). Το μονομερές της αλληλουχίας BoR300 συνεπώς

μπορεί να χαρακτηριστεί ως σύνθετο βάσει μεγέθους, αλλά ταυτόχρονα και μοναδικό. Η μοναδικότητά του έγκειται στο ότι δεν εντοπίστηκαν υπο-επαναλήψεις (subrepeats) που να στοιχειοθετούν ότι η προέλευσή του συνδέεται με τον πολλαπλασιασμό μικρότερων απλών μοτίβων.

Η κατάταξη της συγκεκριμένης αλληλουχίας στην κατηγορία του δορυφορικού DNA επήλθε μετά από τον προσδιορισμό των αντιγράφων της στο γονιδίωμα του δάκου. Για το σκοπό αυτό, ακολουθήθηκαν δύο διαφορετικές προσεγγίσεις που βασίστηκαν στην ποσοτικοποίηση μέσω Real-time PCR και περιγράφονται αναλυτικά στα Αποτελέσματα. Παρά το διαφορετικό τρόπο μέτρησης, οι τιμές των δύο προσεγγίσεων καθόρισαν ένα μέσο αριθμό αντιγράφων περί τις 3000 ανά απλοειδές γονιδίωμα, κάτι που αντιστοιχεί στο ~ 0.3% του γονιδιώματος του δάκου. Παρόμοιο ποσοστό έχει υπολογιστεί για τη δορυφορική αλληλουχία 44 bp του συγγενικού του είδους *C. capitata*, η οποία συνιστά το 0.24% του γονιδιώματός της (Stratikorou et al. 2002).

Οι δορυφορικές αλληλουχίες επί το πλείστον είναι ειδικές ως προς το είδος από το οποίο απομονώνονται, αν και ενδέχεται να παρουσιάζουν ομολογία ανάμεσα σε συγγενικά είδη. Κατά την αναζήτηση ομολογίας του BoR300 σε νουκλεοτιδική βάση δεδομένων δεν παρουσιάστηκε ομοιότητα με ήδη χαρακτηρισμένες δορυφορικές οικογένειες άλλων οργανισμών. Το γεγονός αυτό δυνητικά αποτέλεσε την πρώτη ένδειξη ειδικότητας. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε τόσο με υβριδοποίηση κατά Southern όσο και με ανάλυση PCR: και στις δύο αυτές περιπτώσεις η αλληλουχία BoR300 εμφανίστηκε αποκλειστικά στο είδος *B. oleae*. Η υψηλή ειδικότητα που παρατηρήθηκε για την αλληλουχία BoR300 την καθιστά έναν ανιχνευτή είδους, που θα μπορούσε να φανεί ιδιαίτερα χρήσιμο διαγνωστικό εργαλείο στην αναγνώριση του εντόμου από άτομα συγγενικών του ειδών. Ιδιαίτερα όταν πρόκειται για τον χαρακτηρισμό ατόμων που διαχειμάζουν στο έδαφος κατά το αναπτυξιακό στάδιο της προνύμφης ή της νύμφης.

Για τη διερεύνηση του κυτταρογενετικού εντοπισμού της αλληλουχίας πραγματοποιήθηκε φθορίζων *in situ* υβριδισμός σε παρασκευάσματα τόσο πολυταινικών όσο και μεταφασικών χρωμοσωμάτων του εντόμου. Η μικροσκοπική παρατήρηση κατέδειξε ως θέσεις υβριδισμού τις κεντρομερικές περιοχές δύο αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων. Συγκεκριμένα, η κεντρομερική τοπολογία του BoR300 επιβεβαιώθηκε για τα πολυταινικά χρωμοσώματα III και IV, αλλά και τα μιτωτικά χρωμοσώματα 4 και 5, μετά από σύγκριση με τους διαθέσιμους χρωμοσωμικούς φωτογραφικούς χάρτες του εντόμου (Manragani-Tsiridou 2002). Τα αποτελέσματα των πειραμάτων αυτών κατέστησαν επιπλέον δυνατή την αντιστοίχιση των πολυταινικών χρωμοσωμάτων III και IV, με τα μιτωτικά χρωμοσώματα 4 και 5. Ωστόσο δεν ήταν εφικτός ο σαφής καθορισμός τής μεταξύ τους αντιστοιχίας, στηριζόμενος σε μια ενδεχόμενη διαφοροποίηση της έντασης του σήματος υβριδισμού. Αξίζει να σημειωθεί, ότι μέχρι σήμερα δεν έχει αναφερθεί συσχέτισμός μεταξύ των πολυταινικών και των μιτωτικών χρωμοσωμάτων του *B. oleae*, εξαιτίας της απουσίας υβριδισμού κάποιου κοινού δείκτη και στους δύο τύπους χρωμοσωμάτων. Τα συγκεκριμένα δεδομένα αποτελούν την πρώτη αναφορά συσχέτισης για δύο από τα πέντε αυτοσώματα, μεταξύ των δύο τύπων χρωμοσωμάτων.

Αν και γενικά μια οικογένεια δορυφορικού DNA εντοπίζεται σε όλα τα χρωμοσώματα, υπάρχουν αρκετά παραδείγματα που παρουσιάζεται ειδικότητα ως προς κάποιο ή κάποια χρωμοσώματα. Χαρακτηριστικότερη είναι η περίπτωση της *D. melanogaster* στην οποία η κεντρομερική περιοχή κάθε χρωμοσώματος συσσωρεύει διαφορετικές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Bonaccorsi & Lohe 1991). Αξιοσημείωτη είναι επίσης και η δορυφορική αλληλουχία 44 bp της *C. capitata*, η οποία εντοπίζεται στις περικεντρομερικές περιοχές τεσσάρων από τα συνολικά πέντε αυτοσωμικά χρωμοσώματα, καθώς και στο X χρωμόσωμα (Stratikorou et al. 2002). Ο λόγος που ορισμένες δορυφορικές οικογένειες συσσωρεύονται στις

κεντρομερικές περιοχές συγκεκριμένων μόνο χρωμοσωμάτων και όχι στο σύνολό τους αποτελεί ένα θεμελιώδες ερώτημα. Η απάντηση σε αυτό θα αποσαφηνιστεί εφόσον μελλοντικά θα είναι διαθέσιμα περισσότερα δεδομένα σχετικά με αυτού του είδους τις αλληλουχίες και τις λειτουργίες που επιτελούν. Ενδεχομένως η τάση αυτή να σχετίζεται με την εξέλιξη της αλληλουχίας τους. Εφόσον η ποικιλομορφία μεταξύ των αλληλουχιών εξαρτάται από την αναλογία του ρυθμού δημιουργίας μεταλλάξεων και τελικά της ομογενοποίησης-εγκαθίδρυσής τους, πιθανόν οι μηχανισμοί αναδιοργάνωσης στους οποίους υπόκεινται να οδηγούν σε άνιση κατανομή των μεταλλάξεων μεταξύ των χρωμοσωμάτων και συνεπώς στη δημιουργία οικογενειών ειδικών προς κάποιο χρωμόσωμα (Dover 1986). Εν κατακλείδι, είναι προφανές ότι η ετερογένεια των δορυφορικών αλληλουχιών και τα πρότυπα οργάνωσής τους απαιτούν λεπτομερείς μελέτες ώστε τελικά να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τον λειτουργικό τους ρόλο στην οργάνωση των κεντρομερών αλλά και τις διαδικασίες εξέλιξής τους.

Καταληκτικά,

στην παρούσα διατριβή επιχειρήθηκε μια αρχική σκιαγράφηση της αρχιτεκτονικής του γονιδιώματος του δάκου. Μέσα από μια πρώιμη γονιδιωματική προσέγγιση, πραγματοποιήθηκε η πρώτη μαζικού χαρακτήρα απομόνωση και ταυτοποίηση EST δεικτών και διερευνήθηκε η αξιοποίησή τους σε κυτταρογενετικές και γενετικές εφαρμογές. Επιπλέον απομονώθηκαν και αναλύθηκαν αλληλουχίες επαναλαμβανόμενης φύσης, μέσα από τις οποίες χαρακτηρίστηκε το πρώτο ενδογενές LTR ρετρομεταθετό στοιχείο στο δάκο, αλλά και μια ειδο-ειδική δορυφορική αλληλουχία που εντοπίζεται στις κεντρομερικές περιοχές δύο αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων.

Η κατανόηση και διερεύνηση διαφορετικής φύσης αλληλουχιών που συγκροτούν το γονιδίωμα του δάκου, αλλά και τα ποσοστά που συμμετέχουν στη συνολική δομή του, συνδράμουν σημαντικά

στην απόκτηση μιας πρώτης ιδέας της οργάνωσής του, όσον αφορά το γονιδιακό του περιεχόμενο αλλά και επαναλαμβανόμενα στοιχεία, όπως τα μεταθετά και οι δορυφορικές αλληλουχίες, μιας πρώτης ένδειξης δηλαδή της ρευστότητας και της εξέλιξής του. Ιδιαίτερα όσον αφορά τις επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες, πρέπει να σημειωθεί ότι ακόμα και σε οργανισμούς που έχουν πλήρως αλληλουχηθεί παραμένουν αδιευκρίνιστες και αχαρακτήριστες σε μεγάλο βαθμό λόγω κυρίως του ετεροχρωματικού τους εντοπισμού. Ωστόσο λόγω της ικανότητάς τους να συμμετέχουν στην πλαστικότητα των γονιδιωμάτων και την αναδιοργάνωσή τους, αναμένεται μελλοντικά να συγκεντρώσουν το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας, καθώς η διαφοροποίηση των ειδών και των χαρακτηριστικών τους, ιδιαίτερα για τα συγγενικά είδη, φαίνεται να αποτελεί μια λεπτή γραμμή μεταξύ των συντηρημένων πληροφοριών των γονιδίων και των μη συντηρημένων αλληλουχιών που μπορούν να επηρεάσουν τη γονιδιακή έκφραση. Το ξεχωριστό επαναλαμβανόμενο περιεχόμενο του γονιδιώματος του δάκου συγκριτικά με άλλους συγγενικούς του οργανισμούς, ακόμα και του ίδιου γένους, δημιουργεί διαφορετικό υπόβαθρο για τη δράση της φυσικής επιλογής και ενδέχεται να αποτελεί την απάντηση σε πολλά ερωτήματα που εγείρονται σχετικά με την αναπαραγωγή και την ειδογένεση, αλλά και τη φαινολογία και τη βιολογία του είδους. Το ότι, για παράδειγμα, όλος ο κύκλος ζωής του δάκου είναι συνυφασμένος με ένα και μοναδικό οικοσύστημα, αυτό της ελιάς, σε αντίθεση με άλλα πολυφάγα και κοσμοπολίτικα είδη της οικογένειας Terphritidae, μπορεί να συνεπάγεται περιορισμένες ανάγκες γονιδιωματικής πλαστικότητας γεγονός που πιθανόν αντικατοπτρίζεται στο μικρότερο μέγεθος του γονιδιώματός του.

Σε κάθε περίπτωση πάντως, ο δάκος αποτελεί τον σημαντικότερο εχθρό της ελιάς και κατά συνέπεια κατεξοχήν στόχο εντομολογικού ελέγχου. Η διεξοδικότερη και μαζικότερη διερεύνηση όλων των παραπάνω αναμένεται να αποσαφηνίσει θεμελιώδη ερωτήματα της βιολογίας του και να οδηγήσει στη δημιουργία κατάλληλων και

βελτιωμένων μεθοδολογιών για τον αποτελεσματικό, γενετικό και περιβαλλοντικά φιλικό χειρισμό του εντόμου.

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abe H, Ohbayashi F, Sugasaki T, Kanehara M, Terada T et al (2001) Two novel Pao-like retrotransposons (Kamikaze and Yamato) from the silkworm species *Bombyx mori* and *B. mandarina*: common structural features of Pao-like elements. *Mol Genet Genomics* 265(2): 375-385.
- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH et al (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651-1656.
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD et al (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Agrawal A, Eastman QM, Schatz DG (1998) Transposition mediated by RAG1 and RAG2 and its implications for the evolution of the immune system. *Nature* 394: 744-751.
- Akashi H (1994) Synonymous codon usage in *Drosophila melanogaster*: natural selection and translational accuracy. *Genetics* 136: 927-935.
- Alphay L (2007) Engineering insects for the Sterile Insect Technique. In: Area-wide control of insect pests: from research to field implementation (Vreysen, M, Robinson, A and Hendrichs, J, eds.). Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 51-60.
- Alphay L (2002) Re-engineering the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1243-1247.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403-410.
- Anleitner J & Haymer D (1992) Y enriched and Y-specific DNA sequences from the genome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Chromosoma* 101: 271-278.
- Apostolaki A, Livadaras I, Saridaki A, Chrysargyris A, Savakis C et al (2011) Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with *Wolbachia*: towards a symbiont-based population control strategy. *J Appl Entomol* 135: 546-553.
- Arambourg Y & Pralavorio R (1974) Les chalcidiens ectophages (Hym. Chalcidoidea) parasites de *Dacus oleae* Gmel. (Dipt. Trypetidae). *Ann Inst Phytopathol Benaki (N.S.)* 11: 30-46.
- Ashburner M (1992) Mapping insect genomes, pp. 51-75 in *Insect Molecular Science*, edited by J.M. Crampton & P. Eggleston. Academic Press, London.
- Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Zacharopoulou A, Mathiopoulou KD (2002) Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol Ecol Notes* 2: 278-280.
- Augustinos AA, Mamuris Z, Stratikopoulos E, D'Amelio S, Zacharopoulou A et al (2005) Microsatellite analysis of olive fly populations in the mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* 125: 231-241.
- Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Drosopoulou E, Kakani EG, Mavragani-Tsipidou P et al (2008) Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics* 9: 618.
- Bedo DG (1980) C, Q and H-banding in the analysis of Y chromosome rearrangements in *Lucilia cuprina* (Wiedeman) (Diptera: Calliphoridae). *Chromosoma* 77: 299-308.
- Benachenhou F, Jern P, Oja M, Sperber G, Blikstad V et al (2009) Evolutionary Conservation of Orthoretroviral Long Terminal Repeats (LTRs) and *ab initio* Detection of Single LTRs in Genomic Data. *PLoS ONE* 4(4): e5179.
- Benos P, Tavernarakis N, Brogna S, Thireos G, Savakis C (2000) Acquisition of a potential marker for insect transformation: isolation of a novel alcohol dehydrogenase gene from *Bactrocera oleae* by functional complementation in yeast. *Mol Gen Genet* 263: 90-95.
- Biemont C & Vieira C (2005) What transposable elements tell us about genome organization and evolution. The case of *Drosophila*. *Cytogenet Genome Res* 110: 25-34.

- Biemont C & Vieira C (2006) Genetics: Junk DNA as an evolutionary force. *Nature* 443: 521-524.
- Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523.
- Bolivar F, Rodriguez RL, Betlach MC, Boyer HW (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. I. Ampicillin-resistant derivatives of plasmid pMB9. *Gene* 2: 75-93.
- Boller EF, Russ K, Vallo V, Bush GL (1976) Incompatible races of European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera:Tephrididae): their origin and potential use in biological control. *Entomol Exp Appl* 20: 237-247.
- Bolshakov VN, Topalis P, Blass C, Kokoza E, della Torre A et al (2002) A comparative genomic analysis of two distant diptera, the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genome Res* 12: 57-66.
- Bonaccorsi S & Lohe A (1991) Fine mapping of satellite DNA sequences along the Y chromosome of *Drosophila melanogaster*: relationships between satellite sequences and fertility factors. *Genetics* 129: 177-189.
- Bosco G, Campbell P, Leiva-Neto JT, Markow TA (2007) Analysis of *Drosophila* species genome size and satellite DNA content reveals significant differences among strains as well as between species. *Genetics* 177: 1277-1290.
- Boulesteix M, Weiss M, Biémont C (2006) Differences in genome size between closely related species: the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol Biol Evol* 23: 162-167.
- Bourtzis K & Robinson AS (2006) Insect pest control using *Wolbachia* and/or radiation. In: *Insect symbiosis 2*. Ed. by Bourtzis K, Miller T, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 225-246.
- Bourtzis K, Braig HR, Karr T (2003) Cytoplasmic incompatibility. In: *Insect symbiosis*. Ed. by Bourtzis K, Miller T, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 217-246.
- Brosius J (2005) Waste not, want not—transcript excess in multicellular eukaryotes. *Trends Genet* 21: 287-288.
- Bucheton A (1995) The relationship between the flamenco gene and gypsy in tame a retrovirus. *Trends Genet*. 11: 349-353.
- Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B et al (2009) AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25: 288-289.
- Carvalho AB, Lazzaro BP, Clark AG (2000) Y chromosomal fertility factors kl-2 and kl-3 of *Drosophila melanogaster* encode dynein heavy chain polypeptides. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13239-44.
- Carvalho AB (2002) Origin and evolution of the *Drosophila* Y chromosome. *Curr Opin Genet Dev* 12: 664-68.
- Casey D (1992) Primer on molecular Genetics. Doe Human Genome 1991-92 Program Report.
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220.
- Charlesworth B (1996) The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr Biol* 6: 149-62.
- Charlesworth B & Charlesworth D (2000) The degeneration of Y chromosomes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 1563-72.
- Chen D & Texada DE (2006) Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli*. *Gene Ther Mol Biol* 10: 1-12.
- Chomczynski P (1992) Solubilization of formamide protects RNA from degradation. *Nucleic Acids Res* 20: 3791-3792.
- Church GM & Gilbert W (1984) Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci* 81: 1991-95.
- Clark MS & Wall WJ (1996) Chromosome form and function. In: *Chromosomes: the Complex Code*. Ed. Chapman and Hall, London, pp 61-65.

- Clarke L & Carbon J (1976) A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91-106.
- Coghlan A, Eichler EE, Oliver SG, Paterson AH, Stein L (2005) Chromosome evolution in eukaryotes: a multi-kingdom perspective. *Trends Genet* 21: 673-682.
- Cooper JL & Henikoff S (2004) Adaptive evolution of the histone fold domain in centromeric histones. *Mol Biol Evol* 21: 1712-1718.
- Cordaux R & Batzer MA (2009) The impact of retrotransposons on human genome evolution. *Nat Rev Genet* 10: 691-703.
- Daane KM & Johnson MW (2010) Olive fruit fly: Managing an ancient pest in modern times. *Annu Rev Entomol* 55: 151-69.
- Dangel AW, Baker BJ, Mendoza AR, Yu CY (1995) Complement component C4 gene intron 9 as a phylogenetic marker for primates: long terminal repeats of the endogenous retrovirus ERV-K(C4) are a molecular clock of evolution. *Immunogenetics* 42: 41-52.
- della Torre A, Favia G, Mariotti G, Coluzzi M, Mathiopoulos KD (1996) Physical map of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Genetics* 143: 1307-1311.
- Deng Y, Dong Y, Thodima V, Clem RJ, Passarelli LA (2006) Analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *BMC Genomics* 7: 264.
- Denholm I & Rowland MW (1992) Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: theory and practice. *Annu Rev Entomol* 37: 91-112.
- Dimitri P (1997) Constitutive heterochromatin and transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 100: 85-93.
- Dimitri P, Corradini N, Rossi F, Mei E, Zhimulev IF et al (2005) Transposable elements as artisans of the heterochromatic genome in *Drosophila melanogaster*. *Cytogenet Genome Res* 110: 165-72.
- Dover G (1982) Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-117.
- Dover GA (1986) Molecular drive in multigene families: How biological novelties arise, spread and are assimilated. *Trends Genet* 2: 159-165.
- Dover GA (2002) Molecular drive. *Trends Genet* 18: 587-589.
- Dower WJ, Miller JF, Ragsdale CW (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16: 6127-45.
- Drosopoulou E, Scouras ZG (1995) The beta-tubulin gene family evolution in the *Drosophila montium* subgroup of the melanogaster species group. *J Mol Evol* 41(3): 293-8
- Drosopoulou E, Chrysopoulou A, Nikita V, Mavragani-Tsipidou P (2009) The heat shock 70 genes of the olive pest *Bactrocera oleae*: genomic organization molecular characterization of a transcription unit its proximal promoter region. *Genome* 52: 210-214.
- Duret L & Mouchiroud D (1999) Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4482-4487.
- Duret L (2002) Evolution of synonymous codon usage in metazoans. *Curr Opin Genetics Dev* 12: 640-649.
- Economopoulos AP (1972) Sexual competitiveness of gamma-ray sterilized males of *Dacus oleae*. Mating frequency of artificially reared and wild females. *Environ Entomol* 1: 490-497.
- Economopoulos AP & Tzanakakis ME (1967) Egg yolk and olive juice as supplements to the yeast hydrolysate-sucrose diet for adults of *Dacus oleae*. *Life Sci* 6: 2409-2416.
- Economopoulos AP, Haniotakis GE, Mathioudis J, Missis N, Kinigakis P (1978) Long-distance flight of wild and artificially-reared *Dacus*

- oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae). Z Angew Ent 87: 101-108.
- Economopoulos AP (2002) The olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) (Diptera: Tephritidae): its importance and control; previous SIT research and pilot testing. International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria.
- Eickbush TH & Malik HS (2002) Origins and evolution of retrotransposons. In: Craig NL, Craigie R, Gellert M, Lambowitz AM ed; Mobile DNA II. Washington: ASM Press. p. 1111-1144.
- ΕΛΣΤΑΤ, Ελληνική Στατιστική Αρχή
- ΕΤΕ, Εθνική Τράπεζα Ελλάδος (2011) Κλαδικές Μελέτες: Ελαιόλαδο.
- Fedoroff N (2002) Control of mobile DNA. In: Craig, N., Craigie, R., Gellert, M., Lambowitz, A. (Eds.), Mobile DNA II. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, pp. 997-1007.
- Feinberg AP & Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem 132: 6-13.
- Felder H, Herzceg A, de Chastonay Y, Aeby P, Tobler H et al (1994) Tas, a retrotransposon from the parasitic nematode *Ascaris lumbricoides*. Gene 149(2): 219-225.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 783-791.
- Felsenstein J (1994) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the Author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.
- Finnegan DJ (1992) Transposable elements. Curr Opin Genet Devel 2: 861-867.
- Fisher KT (1994) Eradication of the Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* from Western Australia. In: Calkins CO, Klassen W & Liedo P (eds) Fruit Flies and the Sterile Insect Technique, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 172-187.
- Fletcher BS, Pappas S, Kapatos E (1978) Changes in ovaries of olive flies (*Dacus oleae* (Gmelin)) during summer, and their relationship to temperature, humidity and fruit availability. Ecol Entomol 3: 99-107.
- Fletcher BS & Kapatos ET (1983) The influence of temperature, diet and olive fruits on the maturation rates of female olive flies at different times of the year. Entomol Exp Appl 33: 244-52.
- Frame IG, Cutfield JF, Poulter RT (2001) New BEL-like LTR-retrotransposons in *Fugu rubripes*, *Caenorhabditis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. Gene 263(1-2): 219-230.
- Franz G (2005) Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. In: Sterile insect technique: principles and practice in area wide integrated management. Ed. by Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, Springer, Netherlands, 427-452.
- Frizzi G & Springetti A (1953) Prime ricerche citogenetiche sul "*Dacus oleae* Gmel". Ric Sci 23: 1613-1620.
- Fu G, Condon KC, Epton MJ, Gong P, Jin L et al (2007) Female-specific insect lethality engineered using alternative splicing. Nat Biotech 25: 353-357.
- Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schödl T, Heitzer M et al (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. Plant Mol Biol 55: 869-881.
- Gabrieli P, Gomulski LM, Bonomi A, Siciliano P, Scolari F et al (2011) Interchromosomal duplications on the *Bactrocera oleae* Y chromosome imply a distinct evolutionary origin of the sex chromosomes compared to *Drosophila*. PLoS One 6(3): e17747.

- Gao J & Scott JG (2006) Use of quantitative real-time polymerase chain reaction to estimate the size of the house-fly *Musca domestica*. *Insect Mol Biol* 15: 835-83.
- Ganguly R, Ganguly N, Manning JE, 1985. Isolation and characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 35: 91-101
- Gariou-Papalexiou A, Gourzi P, Delprat A, Kritikou D, Rapti K et al (2002) Polytene chromosomes as tools in the genetic analysis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Genetica* 116: 59-71.
- Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM, Carter MJ (1999) The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-likevirus. *J Gen Virol* 80: 1541-9.
- Gomulski LM, Dimopoulos G, Xi Z, Soares MB, Bonaldo MF et al (2008) Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *BMC Genomics* 9: 243.
- Gong P, Epton M, Fu G, Scaife S, Hiscox A et al (2005) A dominant lethal genetic system for autocidal control of the Mediterranean fruitfly. *Nat Biotech* 23: 453-456.
- Goulielmos GN, Cosmidis N, Loukas M, Tsakas S, Zouros E (2001) Characterization of two alcohol dehydrogenase (Adh) loci from the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* and implications for Adh duplication in dipteran insects. *J Mol Evol* 52(1): 29-39.
- Goulielmos GN, Cosmidis N, Theodorakopoulou ME, Loukas M, Zouros E (2003) Tracing the history of an enzyme polymorphism: the case of alcohol dehydrogenase-2 (Adh-2) of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Mol Biol Evol* 20: 293-306.
- Gray Y (2000) It takes two transposons to tango. *Trends Genet* 16: 461-468.
- Gregory TR (2011) Animal genome size database <http://www.genomesize.com>
- Gregory TR & Johnston JS (2008) Genome size diversity in the family Drosophilidae. *Heredity* 101: 228-238.
- Han HY & McPheron BA (1994) Phylogenetic study of selected Tephritid Xies (Insecta: Diptera: Tephritidae) using partial sequences of the nuclear 18s ribosomal DNA. *Biochem Sys Ecol* 22: 444-457.
- Han HY & McPheron BA (1997) Molecular phylogenetic study of tephritidae (insecta: diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol* 7: 17-32.
- Han HY (2000) Molecular phylogenetic study of the tribe Trypetini (Diptera: Tephritidae), using mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. *Biochem Sys Ecol* 120: 501-513.
- Han HY & Ro KE (2009) Molecular phylogeny of the family Tephritidae (Insecta: Diptera): new insight from combined analysis of the mitochondrial 12S, 16S, and COII genes *Mol. Cells* 27: 55-66.
- Hartl DL (2000) Molecular melodies in high and low C. *Nat Rev Genet* 1: 145-149.
- Hawkes NJ, Janes RW, Hemingway J, Vontas JG (2005) Detection of resistance associated mutations of OP-insensitive AChE in the olive fruit fly, *B. oleae*. *Pestic Biochem Physiol* 81: 154-163.
- Havecker ER, Gao X, Voytas DF (2004) The diversity of LTR retrotransposons. *Genome Biol* 5(6): 225.
- He M & Haymer DS (1997) Polymorphic intron sequences detected within and between populations of the Oriental fruit fly (Diptera:Tephritidae). *Ann Entom Soc Am* 90: 825-831.
- He M & Haymer DS (1999) Genetic relationships of populations and the origins of the new infestations of the Mediterranean fruit fly. *Mol Ecol* 8: 1247-1257.
- Heckel DG (2003) Genomics in pure and applied entomology. *Annu Rev Entomol* 48: 235-260.

- Hendricks J, Ortiz G, Liedo P, Schvarz A (1983) Six years of successful medfly program in Mexico Guatemala, in CEC/IOBC International Symposium on Fruit Flies of Economic Importance, edited by Economopoulos. Athens, Greece.
- Hendricks J, Franz G, Rendo P (1995) Increased effectiveness and applicability of Sterile Insect Technique through male-only releases for control of Mediterranean fruit flies during fruiting seasons. *J Appl Entomol* 119: 371-377.
- Henikoff S (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* 28: 351-359.
- Henikoff S, Ahmad K, Malik HS (2001) The centromere paradox: stable inheritance with rapidly evolving DNA. *Science* 293: 1098-1102.
- Henikoff S & Dalal Y (2005) Centromeric heterochromatin: what makes it unique? *Curr Opin Genet Dev* 15: 177-184.
- Hershberg R & Petrov DA (2009) General Rules for Optimal Codon Choice. *PLoS Genet* 5(7): e1000556.
- Hickey DA (1982) Selfish DNA: a sexually-transmitted nuclear parasite. *Genetics* 101: 519-531.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA-sequences. *Bio-Technology* 10(4): 413-417.
- Hirosawa M, Nagase T, Murahashi Y, Kikuno R, Ohara O (2001) Identification of novel transcribed sequences on human chromosome 22 by expressed sequence tag mapping. *DNA Res* 8: 1-9.
- Hua-Van A, Le Rouzic A, Boutin TS, Filée J, Capy P (2011) The struggle for life of the genome's selfish architects. *Biol Direct* 17: 6-19.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R et al (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298: 129-149.
- Horwitz JP, Chua J, Curby RJ, Tomson AJ, DaRooge MA et al (1964) Substrates for cyrochemical demonstration of enzyme activity. I. Some substituted 3-indonyl-β-D-glycopyranosides. *J Med Chem* 7: 574-575.
- Ikemura T (1985) Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 2(1): 13-34.
- Ish-Horowicz D & Burke JF (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucleic Acids Res* 9: 2989-2998.
- Iwahasi O (1977) Eradication of the melon fly, *Dacus cucurbitae*, from Kume Is., Okinawa with the sterile insect release method. *Res Popul Ecol* 19: 87-98.
- John B & Miklos GLG (1979) Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *Int Rev Cyt* 58: 1-114.
- Jurka J, Kapitonov VV, Kohany O, Jurka MV (2007) Repetitive sequences in complex genomes: structure and evolution. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8: 241-59.
- Κακάνη Ε (2009) Μοριακή ανάλυση γονιδιακών τόπων που εμπλέκονται στο μηχανισμό ανάπτυξης της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα του σημαντικότερου παράσιτου της ελιάς, του εντόμου *Bactrocera oleae*. Διδακτορική Διατριβή.
- Kakani EG, Ioannides IM, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Skouras PJ et al (2008) A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 781-787.
- Kakani EG, Zygouridis NE, Tsoumani KT, Seraphides N, Zalom FG et al (2010) Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California. *Pest Manag Sci* 66(4): 447-53.
- Kakani EG, Bon S, Massoulié J, Mathiopoulos KD (2011) Altered GPI modification of insect AChE

- improves tolerance to organophosphate insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 41(3): 150-8.
- Kapatos ET & Fletcher BS (1984) The phenology of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera, Tephritidae), in Corfu Greece. *J Appl Entomol* 97: 360-70.
- Kapatos ET & Fletcher BS (1986) Mortality factors and life-budgets for immature stages of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae), in Corfu. *J Appl Entomol* 102: 326-42.
- Kapitonov VV & Jurka J (2003) Molecular paleontology of transposable elements in the *Drosophila melanogaster* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6569-6574.
- Kapitonov VV & Jurka J (2007) Helitrons on a roll: eukaryotic rolling-circle transposons. *Trends Genet* 23: 521-529.
- Katsoyannos P (1992) Olive pests and their control in the Near East. FAO Plant Production and Protection Paper No 115.
- Kazazian HH Jr (2004) Mobile elements: drivers of genome evolution. *Science* 303: 1626-1632.
- Khan E, Mack JPG, Katf RA, Kulkosky J, Skalka AM (1991) Retroviral integrase domains: DNA binding and the recognition of LTR sequences. *Nucleic Acids Res* 19: 851-860.
- Khila A, Haidani AEI, Vincent A, Payre F, Souda SI (2003) The dual function of *ovo/shavenbaby* in germline and epidermis differentiation is conserved between *Drosophila melanogaster* and the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 691-699.
- Kidwell MG & Lisch D (1997) Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 7704-7711.
- Kidwell MG & Lisch DR (2001) Perspective: transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Int J Org Evol* 55: 1-24.
- Kidwell MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63.
- Kidwell MG (2005) Transposable elements. In ed. T.R. Gregory. *The Evolution of the Genome*. San Diego: Elsevier. pp. 165-221.
- King LM & Cummings MP (1997) Satellite DNA repeat sequence variation is low in three species of burying beetles in the genus *Nicrophorus* (Coleoptera: Silphidae). *Mol Biol Evol* 14: 1088-1095.
- Knight RD, Freeland SJ, Landweber LF (2001) A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino-acid usage and GC composition within and across genomes. *Genome Biol* 2: 0010.1-0010.13.
- Komitopoulou K, Christophides GK, Kalosaka K, Chrysanthis G, Theodoraki MA et al (2004) Medfly promoters relevant to the sterile insect technique. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 149-157.
- Koukidou M, Klinakis A, Reboulakis C, Zagoraiou L, Tavernarakis N et al (2006) Germ line transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transgenesis marker. *Insect Mol Biol* 15: 95-103.
- Kounatidis I, Papadopoulos NT, Bourtzis K, Mavragani-Tsipidou P (2008) Genetic and cytogenetic analysis of the fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 51:479-491.
- Krimbas CB & Powell JR (1992) Introduction, pp. 2–33 in *Drosophila inversion polymorphism*, edited by CB Krimbas & JR Powell CRC Press.
- Kramer JA (2001) Omiga™: a PC-based sequence analysis tool. *Mol Biotechnol* 19: 97-106.
- Krimbas CB (1963) A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Trypetidae): the salivary gland and the mitotic chromosomes. *Caryologia* 16: 371-376.
- Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ (2001) Toward understanding *Anophelinae* (Diptera,

- Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and weight of evidence. *Syst Biol* 50: 540-556.
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J et al (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27: 95-125.
- Kuhn GCS, Franco FF, Manfrin MH, Moreira-Filho O, Sene FM (2007) Low rates of homogenization of the DBC-150 satellite DNA family restricted to a single pair of microchromosomes in species from the *Drosophila buzzatii* cluster. *Chromosome Res* 15: 457-46.
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA 3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis sequence alignment. *Brief Bioinform* 5: 150-163.
- Kurek R, Reugels AM, Lammermann U, Bunemann H (2000) Molecular aspects of intron evolution in dynein encoding mega-genes on the heterochromatic Y chromosome of *Drosophila* sp. *Genetica* 109: 113-123.
- Lachaise D & Silvai JF (2004) How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* palaeogeographic riddle. *Genetica* 120: 17-39.
- Lagos D, Ruizb FM, Sánchez L, Komitopoulou K (2005) Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 348: 111-121.
- Lagos D, Koukidou M, Savakis C, Komitopoulou K (2007) The transformer gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Mol Biol* 16: 221-230.
- Lahn BT, Pearson NM, Jegalian K (2001) The human Y chromosome in the light of evolution. *Nat Rev Genet* 2: 207-216.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, et al (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860-921.
- Leder P, Tiemeier D, Enquist L (1977) EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms: The gtWES system. *Science* 196: 175-177.
- Lichtenstein AV, Moiseev VL, Zaboikin MM (1990) A procedure for DNA and RNA transfer to membrane filters avoiding weight-induced flattening. *Anal Biochem* 191: 187-191.
- Lieb M (1953) Studies on lysogenization in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 18: 71-73.
- Lou Q, Liu Q, Yang Y, Chen J (2008) Rapid amplification of flanking sequences of a known DNA region by partial restriction digestion and Hot Start PCR. *J Integr Agric* 5: 542-546.
- Malik HS (2005) Ribonuclease H evolution in retrotransposable Elements. *Cytogenet Genome Res* 110: 392-401.
- Manoukas AG & Mazomenos B (1977) Effect of antimicrobials upon eggs and larvae of *Dacus oleae* (Diptera, Tephritidae) and the use of propionates for larval diet preservation. *Ann Zool Ecol Anim* 9: 277-285.
- Marsano RM, Marconi S, Moschetti R, Barsanti P, Caggese C et al (2004) MAX, a novel retrotransposon of the BEL-Pao family, is nested within the Bari1 cluster at the heterochromatic h39 region of chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. *Mol Genet Genomics* 270(6): 477-84.
- Mathiopoulos KD, Powell JR, McCutchan TF (1995) An anchored restriction-mapping approach applied to the genetic analysis of the *Anopheles gambiae* malaria vector complex. *Mol Biol Evol* 12: 103-112.
- Mathiopoulos KD, della Torre A, Predazzi V, Petrarca V, Coluzzi M (1998) Cloning of inversion breakpoints in the *Anopheles gambiae* complex traces a transposable element at the inversion junction. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12444-12449.

- Mathiopoulos KD, della Torre A, Santolamazza F, Predazzi V, Petrarca V et al (1999) Are chromosomal inversions induced by transposable elements? A paradigm from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Parassitologia* 41: 119-123.
- Mazi VE, Cosmidis N, Clonis YD, Loukas M (1998) Purification of alcohol dehydrogenase from four genotypes of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. *Biotechnol Prog* 14(2): 294-9.
- Mazomenos BE (1989) *Dacus oleae*. In: Robinson AS, Hooper G (eds) *World crop pests*. Vol.3B. Elsevier BV, Amsterdam, pp 169-177.
- Mavragani-Tsipidou P (2002) Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 116: 45-57.
- Mavragani-Tsipidou P, Karamanlidou G, Zacharopoulou A, Koliais S, Kastritis C (1992) Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 35(3): 373-378.
- Meats A, Maheswaran P, Frommer M, Sved J (2002) Towards a male-only release system for SIT with the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni*, using a genetic sexing strain with a temperature-sensitive lethal mutation. *Genetica* 116: 97-106.
- Miller JH (1972) *Experiments in Molecular Genetics* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Miller WJ, Nagel A, Bachmann J, Bachmann L (2000) Evolutionary dynamics of the SGM transposon family in the *Drosophila obscura* species group. *Mol Biol Evol* 17: 1597-1609.
- Montiel Bueno A & Jones O (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC wprs Bulletin* Vol 25 pp.
- Moriyama EN, Petrov DA, Hartl DL (1998) Genome size and intron size in *Drosophila*. *Mol Biol Evol* 15: 770-773.
- Morrison NI, Koukidou M, Franz G, Miller TA, Saccone G et al (2010) Review: Genetic improvements to the Sterile Insect Technique for agricultural pests. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology* 18(2): 275-295.
- Moser SC, Swedlow JR (2011) How to be a mitotic chromosome. *Chromosome Res* (2011) 19: 307-319.
- Muik B, Lendl B, Molina-Diaz A, Avora-Canãda MJ (2003) Fourier transform Raman spectrometry for the quantitative analysis of oil content and humidity in olives. *Appl Spectrosc* Feb 57: 223-227.
- Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G et al (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 51: 263-273.
- Murray AW (1985) Chromosome structure and behavior.
- Nam KD, Lee S, Zhou G, Clark T, Chen J et al (2002) Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. *PNAS* 99(9): 6152-6156.
- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Frati F (2003) The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Mol Biol* 12: 605-611.
- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F (2005) Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Mol Ecol* 14: 2729-2738.
- Neuenschwander P & Michelakis S (1978) Infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *J Appl Entomol* 86: 420-33.
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1: 841-845.

- Ohno S (1972) So much “junk” DNA in our genome. Brookhaven Symp Biol 23: 366-370.
- Oliver KR & Greene WK (2009) Transposable elements: powerful facilitators of evolution. BioEssays 31: 703-714.
- Orgel LE & Crick FH (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature 284: 604-607.
- Palomeque T & Lorite P (2008) Satellite DNA in insects: a review. Heredity 100: 564-573.
- Palumbi SR & Baker CS (1994) Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. Mol Biol Evol 11: 426-435.
- Page RDM (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci 12: 357–358.
- Pane A, Salvemini M, Bovi PD, Polito C, Saccone G (2002) The transformer gene in *Ceratitis capitata* provides a genetic basis for selecting and remembering the sexual fate. Development 129: 3715-3725.
- Papanicolaou A, Joron M, Mcmillan WO, Blaxter ML, Jiggins CD (2005) Genomic tools and cDNA derived markers for butterflies. Mol Ecol 14: 2883-2897.
- Pardue ML, Rashkova S, Casacuberta E, DeBaryshe PG, George JA et al (2005) Two retrotransposons maintain telomeres in *Drosophila*. Chromosome Res 13: 443-53.
- Parkinson J, Blaxter M (2009) Expressed sequence tags: an overview. Methods Mol Biol 533: 1-12.
- Pearce SR, Stuart-Rogers C, Knox MR, Kumar A, Ellis TH, Flavell AJ (1999) Rapid isolation of plant Ty1-copia group retrotransposon LTR sequences for molecular marker studies. Plant J. 19(6): 711-7.
- Petrov DA (2001) Evolution of genome size: new approaches to an old problem. Trends Genet 17: 23-28.
- Pimpinelli S, Berloco M, Fanti L, Dimitri P, Bonaccorsi S et al (1995) Transposable elements are stable components of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. Proc Natl Acad Sci USA 92: 3804-3808.
- Plohl M, Luchetti A, Mestrovic N, Mantovani B (2008) Satellite DNAs between selfishness and functionality: structure, genomics and evolution of tandem repeats in centromeric (hetero)chromatin. Gene 409(1-2): 72-82.
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL, Papanicolaou A, Chris Lee SF et al (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. Genetics 177: 417-426.
- Providenti MA, O'Brien JM, Ewing RJ, Paterson ES, Smith ML (2006) The copy-number of plasmids and other genetic elements can be determined by SYBR-Green-based quantitative real-time PCR. J Microbiol Methods 65(3): 476-87.
- Radu M, Rossler Y, Koltin Y (1975) The chromosomes of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Wied): karyotype and chromosomal organization. Cytologia 40: 823-828.
- Randig O, Bongiovanni M, Carneiro RM, Sarah JL, Castagnone-Sereno P (2002) A species-specific satellite DNA family in the genome of the coffee root-knot nematode *Meloidogyne exigua*: application to molecular diagnostics of the parasite. Mol Plant Pathol 3(6): 431-7.
- Rice RE (2000) Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. UC Plant Protection Quarterly 10: 1-5.
- Robinson AS, Franz G, Fisher K (1999) Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata*: development, mass rearing and field application. Trends Entomol 2: 81-104.
- Robinson AS & Franz G (2000) The application of transgenic insect technology in the sterile insect technique. Insect Transgenesis: Methods and Applications (ed. by AM Handler & AA James) CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 307-319.

- Robinson A, Franz G, Fisher K (1999) Genetic sexing strains in the medfly, *Ceratitis capitata*: Development, Mass Rearing and Field Application. *Trends in Entomology* 2: 81-104.
- Robinson AS & Franz G (2000) The application of transgenic insect technology in the sterile insect technique. In: Handler, M., James, A.A. (Eds.), *Insect Transgenesis: Methods and Applications*. CRC Press, Baton Rouge, pp. 307-319.
- Robinson A (2002) Mutations and their use in insect control. *Mutation Research* 511: 113-132.
- Robinson AS, Franz G, Atkinson PW (2004) Insect transgenesis and its potential role in agriculture and human health. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 113-120.
- Rohr CJB, Ranson H, Wang X, Besansky NJ (2002) Structure and evolution of mtanga, a retrotransposon actively expressed on the Y chromosome of the African malaria vector *Anopheles gambiae*. *Mol Biol Evol* 19: 149-162.
- Rojas AA, Vasquez-Tello A, Ferbeyre G, Venanzetti F, Bachmann L et al (2000) Hammerhead-mediated processing of satellite pDo500 family transcripts from *Dolichopoda cave* crickets. *Nucleic Acids Res* 28: 4037-4043.
- Rogozin IB, Sverdlov AV, Babenko VN, Koonin EV (2002) Analysis of evolution of exon-intron structure of eukaryotic genes. *Brief Bioinform* 6: 18-134.
- Roma G, Cobellis G, Claudiani P, Maione F, Cruz P et al (2007) A novel view of the transcriptome revealed from gene trapping in mouse embryonic stem cells. *Genome Res* 17: 1051-1060.
- Roth DB & Craig NL (1998) VDJ recombination: a transposase goes to work. *Cell* 94: 411-414.
- Saccone G, Pane A, Polito LC (2002) Sex determination in flies, fruitflies and butterflies. *Genetica* 116: 15-23.
- Sahara K, Marec F, Traut W (1999) TTAGG telomeric repeats in chromosomes of some insects and other arthropods. *Chromosome Res* 7(6): 449-60.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT et al (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- Sarot E, Payen-Groschene G, Bucheton A, Pelisson A (2004) Evidence for a *piwi*-dependent RNA silencing of the *gypsy* endogenous retrovirus by the *Drosophila melanogaster flamenco* gene. *Genetics* 166: 1313-1321.
- Schetelig M, Caceres C, Zacharopoulou A, Franz G, Wimmer EA (2009) Conditional embryonic lethality to improve the sterile insect technique in *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). *BMC Biology* 7: 4.
- Schlotterer C & Harr B (2000) *Drosophila virilis* has long and highly polymorphic microsatellites. *Mol Biol Evol* 17: 1641-1646.
- Schueler MG, Higgins, AW, Rudd MK, Gustashaw K, Willard HF (2001) Genomic and genetic definition of a functional human centromere. *Science* 294: 109-115.
- Schueler MG, Dunn MJ, Bird PC, Ross TM, Viggiano L et al (2005) Progressive proximal expansion of the primate X chromosome centromere. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10563-10568.
- Schwartz M (1967) Sur l'existence chez *Escherichia coli* K12 d'une régulation commune à la biosynthesis des récepteurs du bactériophage λ et au métabolisme du maltose. *Ann Instr Pasteur* 113: 685-704.
- Scolari F, Schetelig MF, Gabrieli P, Siciliano P, Gomulski LM et al (2008) Insect transgenesis applied to tephritid pest control. *J Appl Entomol* 132: 820-831.
- Scolari F, Siciliano P, Gabrieli P, Gomulski LM, Bonomi A et al (2011) Safe and fit genetically modified insects for pest control: from lab to field applications. *Genetica* 139: 41-52.

- Severson DW, DeBruyn B, Lovin DD, Brown SE, Knudson DL et al (2004) Comparative genome analysis of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* with *Drosophila melanogaster* and the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *Journal of Heredity* 95(2): 103-113.
- Sgaramella V & Ehrlich SD (1978) Use of T4 polynucleotide ligase in the joining of flush-ended DNA segments generated by restriction endonucleases. *Eur J Biochem* 86: 531-537.
- Shearman DC (2002) The evolution of sex determination systems in dipteran insects other than *Drosophila*. Review. *Genetica* 116(1): 25-43.
- Shields DC, Sharp PM, Higgins DG, Wright F (1988) 'Silent' sites in *Drosophila* genes are not neutral: evidence of selection among synonymous codons. *Mol Biol Evol* 5: 704-716.
- Siebel CW, Fresco LD, Rio DC (1992) The mechanism of somatic inhibition of *Drosophila* P-element premRNA splicing: multiprotein complexes at an exon pseudo-50 splice site control U1 snRNP binding. *Genes Devel* 6: 1386-1401.
- Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L et al (2003) The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature* 423: 825-37.
- Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.
- Stack SM, Anderson LK (2001) A model for chromosome structure during the mitotic and meiotic cell cycles. *Chrom Research* 9: 175-198.
- Steinemann M & Steinemann S (2000) Common mechanisms of Y chromosome evolution. *Genetica* 109: 105-111.
- Stratikopoulos EE, Augustinos AA, Gariou-Papalexioy A, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD (2002) Identification and partial characterization of a new *Ceratitidis capitata*-specific 44-bp pericentromeric repeat. *Chromosome Res* 10: 287-295.
- Szymański M, Barciszewska MZ, Zywicki M, Barciszewski J (2003) Noncoding RNA transcripts. *J Appl Genet* 44(1): 1-19.
- Tzanakakis ME (1989) Small-scale rearing *Dacus oleae*. In: *World Crop Pests: Fruit flies: their biology, natural enemies, and control*. Vol. 3B. Ed. by Robinson AS, Hooper G, Elsevier, Amsterdam, 105-118.
- Τζανακάκης ME (1995) *Εντομολογία*, University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Thomas M, Cameron JR, Davis RW (1974) Viable molecular hybrids of bacteriophage λ and eukaryotic DNA. *Proc Natl Acad Sci* 71: 4579-4583.
- Tsiropoulos GJ (1977) Reproduction and survival of adult *Dacus oleae* feeding on pollens and honeydews (Diptera: Tephritidae). *Environ Entomol* 6: 390-92.
- Tsitsipis JA (1975) Mass rearing of the olive fruit fly, *Dacus oleae* (Gmelin), at "Democritos". In: *Controlling fruit flies by the sterile-insect technique*. International Atomic Energy Agency IAEA-PL-582/9, STI/PUB/392, 93-100.
- Tsitsipis JA (1980) Effect of constant temperatures on larval and pupal development of olive fruit flies reared on artificial diet. *Environ Entomol* 9: 764-68.
- Tsitsipis JA & Kontos A (1983) Improved solid adult diet for the olive fruit fly *Dacus oleae*. *Entomol Hellenica* 1: 24-29.
- Tsoumani KT & Mathiopoulos KD (2011) Genome size estimation with quantitative real-time PCR in two Tephritidae species: *Ceratitidis capitata* and *Bactrocera oleae*. *J Appl Entomol* doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01684.x
- Tu Z (2005) Insect transposable elements. In Gilbert L.I., Iatrou K. & Gill S.S. (eds): *Molecular Insect Sciences*. Vol. 4. Biochemistry and Molecular Biology. Elsevier, Amsterdam, pp. 395-474.
- Tu Z & Coates C (2004) Mosquito transposable elements. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 631-44.

- Tzanakakis ME (1989) Small Scale Rearing. In: Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control, Vol. 3B. Ed. by Robinson AS, Hooper G, Amsterdam: Elsevier, pp. 105-118.
- Ugarković D, Podnar M, Plohl M (1996) Satellite DNA of the red flour beetle *Tribolium castaneum*-- comparative study of satellites from the genus *Tribolium*. *Mol Biol Evol.* 13(8): 1059-66.
- Ugarkovic D & Plohl M (2002) Variation in satellite DNA profiles—causes and effects. *EMBO J* 21: 5955-5959.
- Ugarkovic D (2005) Functional elements residing within satellite DNAs. *EMBO Rep* 6: 1035-1039.
- Ullman A, Jacob F, Monod J (1967) Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the beta-galactosidase structure gene of *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 24: 339-343.
- Ullrich A, Shine J, Chirgwin J, Pictet R, Tischer E et al (1977) Rat insulin genes: Construction of plasmids containing the coding sequences. *Science* 196: 1313-1319.
- United States Department of Agriculture (USDA) (2001) Fruit Fly Cooperative Control Program: Final Environmental Impact Statement, 2001. USDA Marketing and and Regulatory Programs, Animal and Plant Health Inspection Service, Riverdale, Maryland.
- Villablanca FX, Roderick GK, Palumbi SR (1998) Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Mol Ecol* 7: 547-560.
- Volff J-N (2006) Turning junk into gold: domestication of transposable elements and the creation of new genes in eukaryotes. *BioEssays* 28: 913-922.
- Vontas JG, Cosmidis N, Loukas M, Tsakas S, Hejazi MJ et al (2001) Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Pestic Biochem Physiol* 71: 124-132.
- Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M et al (2002) Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol Biol* 11: 329-336.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T et al (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23(21): 4407-4414.
- Vreysen MJB, Saleh KM, Ali MY, Abdulla AM, Zhu Z-R et al (2000) *Glossina austeni* (Diptera: Glossinidae) eradicated on the island of Unguja, Zanzibar, using the sterile insect technique. *J Econ Entomol* 93: 123-135.
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P et al (1998) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science* 280: 1077-1082.
- Werren JH (2011) Selfish genetic elements, genetic conflict and evolutionary innovation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 10863-10870.
- Whelan JA, Russel NB, Whelan MA (2003) A method for the absolute quantification of cDNA using real time PCR. *J Immunol Meth* 278: 261-269
- White IM & Elson-Harris MM (1992) Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. *CAB International*, Wallingford, UK.
- WhitWeld CW, Band MR, Bonaldo MF, Kumar CG, Liu L et al (2002) Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behavior in the honey bee. *Genome Res* 12: 555-566.
- Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P et al (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 8(12): 973-82.
- Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M (2003) Real-time PCR based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Res* 31: e56.
- Williams JGK, Kubelic AR, Livak KJ, Rafalski J, Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by

- arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.
- Willhoeft U & Franz G (1996) Identification of the sex-determining region of the *Ceratitidis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144: 737-745.
- Wyss JH (2000) Screw-worm eradication in the Americas—overview, in: *Area-wide Control of Fruit Flies and other Insect Pests*, Penerbit Universiti Sains Malaysia, Pulau Pinang. pp. 79–87.
- Xiong Y, Eickbush TH (1990) Origin and evolution of retroelements based upon their reverse transcriptase sequences. *EMBO J.* 9(10): 3353-3362.
- Xiong Y, Burke WD, Eickbush TH (1993) Pao, a highly divergent retrotransposable element from *Bombyx mori* containing long terminal repeats with tandem copies of the putative R region. *Nucleic Acids Res* 21(9):2 117-2123.
- Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, Lawhorne L, Treiber G (1970) Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology* 40: 734-744.
- Zabalou S, Riegler M, Theodorakopoulou M, Stauffer C, Savakis C et al (2004) *Wolbachia*-induced CI as a means for insect pest population control. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 15042-15045.
- Zabalou S, Apostolaki A, Livadaras I, Franz G, Robinson AS et al (2009) Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitidis capitata* genetic sexing strain. *Entomol Exp Appl* 132: 232-240.
- Zalom FG, Burrack HJ, Bingham R, Price R, Ferguson L (2008) Olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) introduction and establishment in California. *Acta Horticulturae* 791: 619-627.
- Zambetaki A, Kleanthous K, Mavragani-Tsipidou P (1995) Cytogenetic analysis of malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). *Genome* 38: 1070-1081.
- Zambetaki A, Zacharopoulou A, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P (1999) The genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: localization of molecular markers by *in situ* hybridization to salivary gland polytene chromosomes. *Genome* 42: 740-751.
- Zambetaki A, Mavragani-Tsipidou P, Scouras ZG (2000) Heat shock response of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae): genes and proteins. *Ann Entomol Soc Am* 93: 648-652.
- Zdobnov EM, Campillos M, Harrington ED, Torrents D, Bork P (2005) Protein coding potential of retroviruses and other transposable elements in vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res* 33: 946-954.
- Zhanga S, Zubaya G, Goldman E (1991) Low-usage codons in *Escherichia coli*, yeast, fruit fly and primates. *Gene* 105: 61-72.
- Zhang DX & Hewitt GM (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol Ecol* 12: 563-584.
- Zhimulev IF, Belyaeva ES, Semeshin VF, Koryakov DE, Demakov SA et al (2004) Polytene Chromosomes: 70 Years of Genetic Research. *International Review of Cytology* 241: 203-275.
- Zhou Q & Haymer DS (1998) Molecular structure of yoyo, a gypsy-like retrotransposon from the mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Genetica* 101: 167-178.
- Zhou Q, Untalan PM, Haymer DS (2000) Repetitive A-T rich DNA sequences from the Y chromosome of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*. *Genome* 43(3): 434-438.
- Zhou MY & Gomez-Sanchez CE (2000) Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol* 2: 1-7.
- Zouros E & Loukas M (1989) Biochemical and colonization genetics of *Dacus oleae* (Gmelin), pp. 75-87 in *Fruit Flies: Their Biology, Natural*

Enemies and Control, Vol. 3B, edited by A.S. Robinson & G.H.S. Hooper. Elsevier, Amsterdam.

Zouros E, Loukas M, Economopoulos A, Mazomenos B (1982) Selection at the alcohol dehydrogenase locus of the olive fruit fly *Dacus oleae* under artificial rearing. *Heredity* 48: 169-185.

Zdobnov EM, Campillos M, Harrington ED, Torrents D, Bork P (2005) Protein coding potential of retroviruses and other transposable elements in vertebrate genomes. *Nucleic Acids Res* 33: 946-954.

Zygouridis NE, Augustinos AA, Zalom FG, Mathiopoulos KD (2009) Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity* 102: 402-412.

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

6.1 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 3.1

Πίνακας 6.1-1 Χαρακτηριστικά εκκινητών και γονιδίων στόχων που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του μεγέθους των γονιδιωμάτων του *B. oleae* και της *D. melanogaster* μέσω Real-time PCR.

	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'→3')	Γονίδιο στόχος	Ta (°C)	Μέγεθος αλληλουχίας στόχου (bp)
<i>B. oleae</i>	Boace2F	TTCGCGTCAATACAGTGTCC	<i>ace</i>	60	315
	Boace2R	CTTTCTTGACACAGGTTGC			
<i>D. melanogaster</i>	Zw F	TCGGCAACAAGATCCTCAGC	<i>gbrd</i>	60	147
	Zw R	AGCAGATGGTTCTGCATCAGC			

6.2 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 3.2

Πίνακας 6.2-1 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις RT-PCR των δυνητικών *B. oleae* μεταγράφων. Το μετάγραφο Boace10 χρησιμοποιήθηκε ως θετικό δείγμα ελέγχου.

<i>B. oleae</i> ESTs	Αλληλουχίες ζευγών εκκινητών (5'-3')	Ta (°C)	E.S. (bp)
BoEST_86	F>CAATCCATTGCCTATCTCG R>CAGACGTTGGAAAAATTCACG	47	433
BoEST_95	F>CAAAGGATCAAATCTCACG R>GTATTGATCGGCTTGAAGG	53	244
BoEST_175	F>AAAATGCGCTTCATAAGATCG R>ATCCAACATCCTTGGAAATATCG	51	420
BoEST_100	F>ACTGCCACAGCGTATACAGC R>GGCTCAATAAATGCTTCGTCC	53	220
BoEST_320	F>GGTCGTACAACACTACAAATCG R>GCTGCTATTACTTGATTACC	51	390
BoEST_87	F>CTAAATGATCAGCGTGACC R>CGGAGATTGTGTTATTGC	47	221
BoEST_92	F>AGATGGAACCTGTTACAAGC R>GTCGTCAAAGTGTCTGGC	51	428
Boace10	F>TGAAGTCAAACCATCATCCG R>GACAGCGCCAACATGAACG	51	96

Ta (annealing temperature): θερμοκρασία υβριδισμού κάθε ζεύγους εκκινητών.

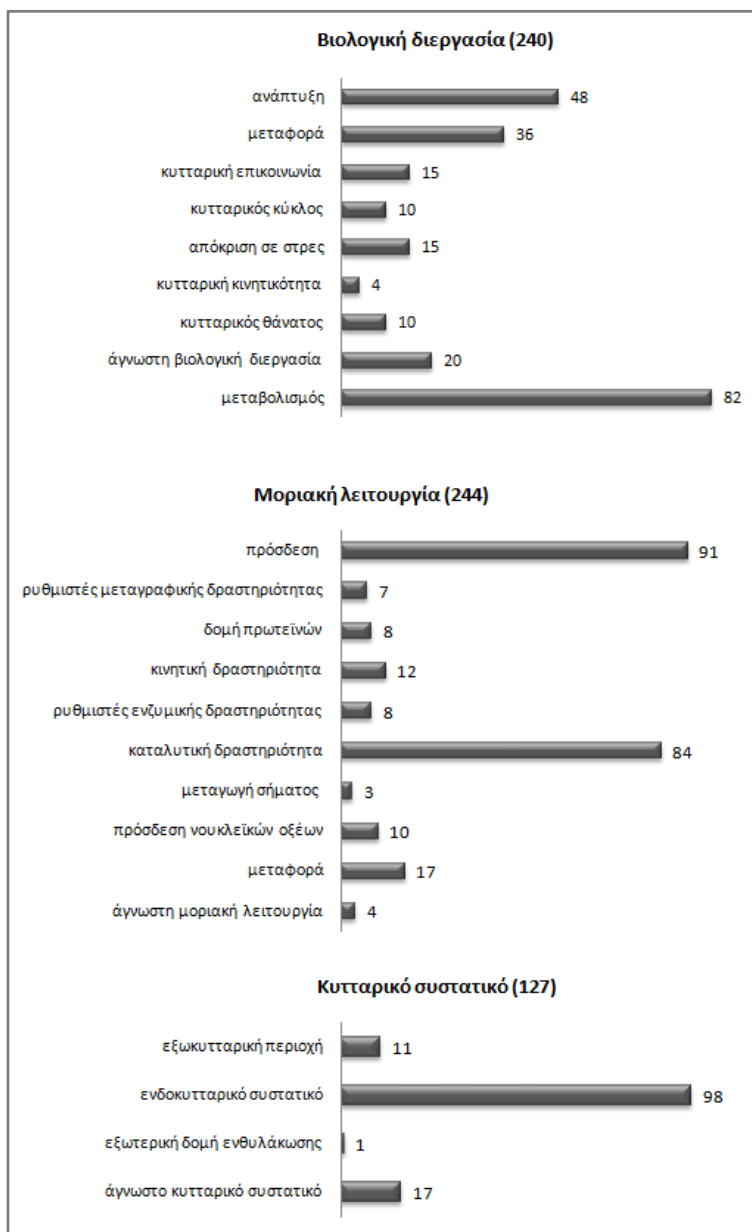
E.S (Expected Size): αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης.

Πίνακας 6.2-2 Βιολογικοί όροι και κωδικοί επισημείωσης GO.

Molecular function Μοριακή λειτουργία	Biological process Βιολογική διεργασία	Cellular component Κυτταρικό συστατικό
binding (GO:0005488) πρόσδεση	biological process unknown (GO:0008150) άγνωστη βιολογική διεργασία	cell (GO:0005623) ενδοκυτταρικό συστατικό
catalytic activity (GO:0003824) καταλυτική δραστηριότητα	cell communication (GO:0007154) κυτταρική επικοινωνία	cellular component unknown (GO:0005575) άγνωστο κυτταρικό συστατικό
enzyme regulator activity (GO:0030234) ρυθμιστές ενζυμικής δραστηριότητας	cell cycle (GO:0007049) κυτταρικός κύκλος	external encapsulating structure (GO:0030312) εξωτερική δομή ενθυλάκωσης
molecular function unknown (GO:0003674) άγνωστη μοριακή λειτουργία	cell motility (GO:0006928) κυτταρική κινητικότητα	extracellular region (GO:0005576) εξωκυτταρική περιοχή
motor activity (GO:0003774) κινητική δραστηριότητα	death (GO:0016265) κυτταρικός θάνατος	
nucleic acid binding (GO:0003676) πρόσδεση νουκλεϊκών οξέων	development (GO:0007275) ανάπτυξη	
signal transducer activity (GO:0004871) μεταγωγή σήματος	metabolism (GO:0008152) μεταβολισμός	
structural molecule activity (GO:0005198) δομή πρωτεϊνών	response to stress (GO:0006950) απόκριση σε στρες	
transcription regulator activity (GO:0030528) ρυθμιστές μεταγραφικής δραστηριότητας	transport (GO:0006810) μεταφορά	
transporter activity (GO:0005215) μεταφορά		

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6.2-3 Αριθμητική κατανομή των ESTs στις κατηγορίες GO. Τα ESTs ταξινομήθηκαν με βιολογικούς όρους στις οντολογίες α) βιολογικής διαδικασίας, β) μοριακής λειτουργίας και γ) κυτταρικό συστατικό. Ορισμένα γονιδιακά προϊόντα επισημειώθηκαν με περισσότερες του ενός βιολογικούς όρους μεταξύ των οντολογιών GO. Οι αριθμοί στα διαγράμματα αντιπροσωπεύουν τον αριθμό των επισημειωμένων γονιδιακών προϊόντων στις κατηγορίες βιολογικών όρων που επιλέχθηκαν για την ταξινόμηση. Οι τιμές στην κορυφή των διαγραμμάτων αντιστοιχούν στο συνολικό αριθμό επισημειώσεων για κάθε οντολογία.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6.2-4 Προσδιορισμός δυνητικής λειτουργίας και κωδικοί πρόσβασης των 195 ESTs του *B. oleae*, σύμφωνα με τα αποτελέσματα αναζήτησης ομοιοτήτων με γονίδια της *D. melanogaster* μετά από σύγκριση μέσω του προγράμματος BLASTX.

Τα σύμβολα ή/και τα ονόματα (όταν ήταν διαθέσιμα) των ομόλογων γονιδίων της *D. melanogaster* είναι σε αντιστοιχία με τα δεδομένα της FlyBase. Το σημείο διπλού αστερίσκου (**) δίπλα σε ορισμένα ESTs υποδηλώνει ότι δεν επισημειώθηκαν και δεν συμπεριλήφθηκαν στην ταξινόμηση γονιδιακής οντολογίας (GO). Το σημείο πληγ (-) υποδηλώνει την απουσία βιολογικών πληροφοριών για το αντίστοιχο γονιδιακό προϊόν. Το σημείο μονού αστερίσκου (*) υποδηλώνει τα ESTs που δεν ήταν εφικτή η κατηγοριοποίηση τους σύμφωνα με τους όρους GO slim που εφαρμόστηκαν κατά την ταξινόμηση.

<i>B.oleae</i> EST	Κωδικός πρόσβασης	Ομόλογα γονίδια της <i>D. melanogaster</i>	E-value	Βιολογική διεργασία	Μοριακή λεπτογγία	Κυτταρικό συστατικό
B0EST_37	HQ383926	CG14721	4E-07	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	-
B0EST_38	HQ383927	CG17652	2E-72	GO:0006810	-	-
B0EST_41	HQ383928	CG8485	2E-64	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824 GO:0004871	-
B0EST_43	HQ383929	Muscle-specific protein 300 (CG33715)	1E-118	GO:0008152 GO:0007275 GO:0006810 GO:0007154 GO:0006928	GO:0005488 GO:0003676 GO:0030234 GO:0030528	GO:0005623
B0EST_47	HQ383930	CG6782	2E-89	GO:0006810	GO:0005488 GO:0005215	GO:0005623
B0EST_49	HQ383931	Vps16B (CG18112)	6E-56	GO:0008150	GO:0003674	GO:0005575
B0EST_50	HQ383932	Galactose-1-phosphate uridylyltransferase (CG9232)	9E-79	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005575
B0EST_53	HQ383933	Armadillo repeat-containing protein 6 homolog (CG5721)	2E-68	GO:0008150	GO:0005488	GO:0005575
B0EST_54	HQ383934	CG42345	7E-40	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	-
B0EST_57	HQ383935	CG30387	5E-105	GO:0008150	GO:0003674	GO:0005575
B0EST_70	HQ383936	Rho-type guanine exchange factor (CG10043)	7E-05	GO:0007154	GO:0030234	GO:0005623
B0EST_71	HQ383937	Ceramide kinase (CG16708)	5E-78	GO:0008152 GO:0007275 GO:0016265	GO:0003824	GO:0005623
B0EST_72	HQ383938	T-cp1zeta (CG8231)	2E-91	GO:0008152 GO:0007049	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BoEST_73	HQ383939	Bendless (CG18319)	2E-62	GO:0008152 GO:0007275 GO:0007154	GO:0003824	-
BoEST_75	HQ383940	Spire (CG10076)	1E-39	GO:0007275 GO:0006810 GO:0007275	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_77	HQ383941	A kinase anchor protein 200 (CG13388)	1E-09	GO:0006950 GO:0007154 GO:0016265	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_80	HQ383942	Blistery (CG9379)	9E-30	GO:0007275	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_81	HQ383943	Protein disulfide isomerase (CG6988)	3E-56	GO:0008152	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_82	HQ383944	Hook-like (CG10473)	2E-10	GO:0008152 GO:0006810 GO:0016265	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_86	HQ383945	Insulin degrading metalloproteinase (CG5517)	3E-79	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	-
BoEST_88	HQ383946	Karyopherin alpha1 (CG8548)	5E-116	GO:0006810	GO:0005215	GO:0005623
BoEST_89	HQ383947	Exuperantia (CG8994)	9E-40	GO:0008152 GO:0007275 GO:0006810	-	GO:0005623
BoEST_90	HQ383948	CG1882	2E-10	-	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_94	HQ383949	CG33205	1E-58	GO:0007275	GO:0005488	-
BoEST_95	HQ383950	Eukaryotic release factor 1 (CG5605)	1E-70	GO:0008152 GO:0007275 GO:0006810 GO:0016265	GO:0005488 GO:0003676	GO:0005623
BoEST_103	HQ383951	Frequenin 2 (CG5907)	4E-53	GO:0007275 GO:0006810 GO:0007154	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_104	HQ383952	cAMP-dependent protein kinase 1 (CG4379)	2E-40	GO:0008152 GO:0007275 GO:0007154	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_105**	HQ383953	CG11926	2E-58			
BoEST_106	HQ383954	Rpn5 (CG1100)	1E-101	GO:0008152	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_107	HQ383955	ALG-2 interacting protein X (CG12876)	1E-98	GO:0006950 GO:0007154	GO:0004871	GO:0005575

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BoEST_108	HQ383956	Ulp1 (CG12359)	2E-05	GO:0016265	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_109	HQ383957	Mucin 11A (CG32656)	1E-08	GO:0008152	GO:0005488	GO:0005576
BoEST_110**	HQ383958	CG1146	4E-15			
BoEST_111	HQ383959	Septin-2 (CG4173)	2E-138	GO:0007275 GO:0007049	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623 GO:0005576
BoEST_113	HQ383960	CG5059	7E-32	GO:0016265	-	GO:0005623
BoEST_116	HQ383961	Ca ²⁺ -channel-protein-β-subunit (CG42403)	5E-30	GO:0006810	GO:0005215	GO:0005623
BoEST_117	HQ383962	CG11909	2E-80	GO:0008152	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_118	HQ383963	Radc protein kinase (CC5074)	2E-24	GO:0008152 GO:0007275 GO:0006810 GO:0006950	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_120	HQ383964	Transferrin 1 (CG6186)	1E-54	GO:0006810 GO:0006950	GO:0005488 GO:0005215	GO:0005576
BoEST_122	HQ383965	Lethal (2) 01289 (CG9432)	6E-143	*	GO:0003824	*
BoEST_123**	HQ383966	Lethal (2) K09913 (CG3082)	7E-64			
BoEST_125	HQ383967	CG9715	3E-33	-	GO:0005488 GO:0003676	-
BoEST_126	HQ383968	Retained (CG5403)	1E-32	GO:0008152 GO:0007275 GO:0006928	GO:0005488 GO:0003676 GO:00030528	GO:0005623
BoEST_129**	HQ383969	CG8568	7E-07			
BoEST_130	HQ383970	ensconsin (CG14998)	2E-21	*	-	GO:0005623
BoEST_131	HQ383971	Dgp-1 (CG5729)	1E-65	-	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005575
BoEST_132	HQ383972	Putative Achaete Scute Target 1 (CG6148)	9E-34	GO:0006810	GO:0005488 GO:0003824	-
BoEST_133	HQ383973	Gustavus (CG2944)	3E-85	GO:0007275	-	-
BoEST_134	HQ383974	Elongator complex protein 1 (CG10535)	4E-55	GO:0008152 GO:0006950	GO:0003824 GO:00030234	GO:0005623

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BoEST_135	HQ383975	Akirin (CG8580)	9E-66	GO:0007275 GO:0006950	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_136**	HQ383976	CG1091	1E-10			
BoEST_137	HQ383977	CG15534	2E-73	GO:0008152	GO:0003824	-
BoEST_138	HQ383978	CG1718	7E-71	-	GO:0005488 GO:0003824 GO:0005215	GO:0005623
BoEST_139	HQ383979	CG10277	9E-08	-	GO:0005488	-
BoEST_141	HQ383980	CG31030	3E-60	GO:0008152 GO:0006810	GO:0003824 GO:0005215	GO:0005623
BoEST_143	HQ383981	CG7220	4E-26	GO:0008152	GO:0003824	-
BoEST_146	HQ383982	Ubiquitin conjugating enzyme 2 (CG6720)	7E-11	GO:0008152	GO:0003824	-
BoEST_147	HQ383983	Peroxioredoxin 2540 (CG11765)	5E-05	GO:0008152 GO:0006950	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_149	HQ383984	CG7920	1E-78	GO:0008152	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_153	HQ383985	Larval serum protein 2 (CG6806)	2E-108	GO:0006810	GO:0005215	GO:0005623 GO:0005576
BoEST_154	HQ383986	Glutamine synthetase 2 (CG1743)	4E-82	GO:0008152 GO:0007275 GO:0007154	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_156	HQ383987	CnnA14D calcineurin A at 14F (CG9819)	6E-139	GO:0008152 GO:0006810	GO:0003824	GO:0005575
BoEST_157	HQ383988	CG3308	1E-21	-	GO:0003824	-
BoEST_163	HQ383989	Vacuolar H ⁺ -ATPase 55kD B subunit (CG17369)	1E-21	GO:0008152 GO:0006810	GO:0003824 GO:0005215	GO:0005623
BoEST_165	HQ383990	GDP dissociation inhibitor (CG4422)	1E-143	GO:0008152 GO:0006810 GO:0007154	GO:00030234	GO:0005623
BoEST_166	HQ383991	Heat shock protein 83 (CG1242)	3E-121	GO:0008152 GO:0007275 GO:0006950 GO:0007049	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_167	HQ383992	Gelsolin (CG1106)	3E-93	GO:0006810	GO:0005488	GO:0005623 GO:0005576
BoEST_168**	HQ383993	CG14646	6E-98			

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BoEST_169	HQ383994	Paramyosin (CG5939)	3E-156	GO:0007275	GO:0003824 GO:0005198	GO:0005623
BoEST_170	HQ383995	CG8834	8E-58	GO:0008152	GO:0003824	-
BoEST_171	HQ383996	CG5604	5E-113	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_172	HQ383997	CG9914	3E-104	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	-
BoEST_173	HQ383998	Cyclic-AMP response element binding protein B at 17A (CG6103)	3E-07	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003676 GO:0030528	GO:0005623
BoEST_174**	HQ383999	CG30069	2E-103			
BoEST_175	HQ384000	Alpha actinin (CG4376)	2E-128	*	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_178	HQ384001	RPT4 (CG3455)	3E-132	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_179	HQ384002	Mediator complex subunit 24 (CG7999)	2E-21	GO:0008152 GO:0007275	GO:0030528	GO:0005623
BoEST_181	HQ384003	CG3563	3E-68	GO:0008150	GO:0003674	GO:0005575
BoEST_182	HQ384004	Ethanol sensitive with low memory (CG2185)	1E-92	-	GO:0005488	-
BoEST_183	HQ384005	CG33523	3E-19	GO:0008150	GO:0005198	GO:0005575
BoEST_186	HQ384006	Yki6 (CG1515)	1E-73	GO:0006810	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_187	HQ384007	Mo25 (CG4083)	1E-63	GO:0007275	GO:0005488	GO:0005575
BoEST_188	HQ384008	CG3523	4E-30	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824 GO:0005215	GO:0005623
BoEST_189	HQ384009	CG9512	3E-98	GO:0008152	GO:0005488	-
BoEST_190	HQ384010	Bangles and beads (CG7088)	7E-04	GO:0007275	GO:0003674	GO:0005575
BoEST_193	HQ384011	CG7083	2E-94	GO:0008150	GO:0003674	GO:0005575
BoEST_197	HQ384012	Cytochrome P450 reductase (CG11567)	2E-154	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_199	HQ384013	CG1461	1E-42	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	-
BoEST_200	HQ384014	Chico (CG5686)	4E-12	GO:0008152 GO:0007275	GO:0005488	-

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BoEST_202	HQ384015	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II (CG18069)	4E-145	GO:0006950 GO:0008152 GO:0007275	GO:0005488 GO:0003824 GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_203	HQ384016	CG6439	6E-120	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_204**	HQ384017	CG7671	2E-54			
BoEST_205	HQ384018	Larval serum protein 1 γ (CG6821)	5E-25	GO:0006810	GO:0005215	GO:0005623 GO:0005576
BoEST_207	HQ384019	Preli-like (CG8806)	2E-04	GO:0007275	GO:0003674	GO:0005623
BoEST_208**	HQ384020	CG8959	2E-83			
BoEST_210	HQ384021	Heat shock cognate protein 70-4 (CG4264)	0.0	GO:0008152 GO:0007275 GO:0006810 GO:0007154 GO:0006928	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_212	HQ384022	Lola like (CG5738)	7E-19	GO:0008152	GO:0005488 GO:0030528	GO:0005623
BoEST_214	HQ384023	CG12795	/E-81	-	GO:0005488	-
BoEST_215	HQ384024	Vermiform (CG8756)	2E-81	GO:0008152 GO:0007275	GO:0005488 GO:0003824 GO:0004871	GO:0005576
BoEST_216**	HQ384025	CG7029	2E-84			
BoEST_218	HQ384026	CG33521	2E-21	-	GO:0005488	-
BoEST_222	HQ384027	Lethal (3) 70Da (CG6760)	2E-108	*	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_223	HQ384028	CG8630	1E-13	GO:0008152	GO:0003824	-
BoEST_224	HQ384029	DNA replication-related element factor (CG5838)	1E-07	GO:0008152 GO:0007049	GO:0005488 GO:0003676 GO:0030528	GO:0005623
BoEST_226	HQ384030	Upheid (CG7107)	3E-116	GO:0007275	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_228	HQ384031	Mutagen-sensitive 201 (CG10890)	1E-88	GO:0008152 GO:0006950	GO:0005488 GO:0003824 GO:0003676	GO:0005623
BoEST_230	HQ384032	Glycyl-tRNA synthetase (CG6778)	1E-80	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BøEST_240	HQ384033	Tfβ1 (CG8151)	1E-72	GO:0008152	GO:0030528	GO:0005623
BøEST_247	HQ384034	Moeskin (CG7935)	1E-69	GO:0007275 GO:0006810 GO:0016265	GO:0005488 GO:0005215	GO:0005623
BøEST_248**	HQ384035	CG13127	3E-31			
BøEST_254	HQ384036	Ribosomal protein L7A (CG3314)	1E-116	GO:0008152	*	GO:0005623
BøEST_255**	HQ384037	Z band alternatively spliced PDZ-motif protein 52 (CG36740)	2E-78			
BøEST_256	HQ384038	Easter (CG4920)	8E-52	GO:0008152 GO:0007275 GO:0006950	GO:0003824	GO:0005576
BøEST_257	HQ384039	CG4603	2E-59	GO:0008152 GO:0007049	GO:0003824 GO:0005198	GO:0005575
BøEST_264**	HQ384040	CG4619	6E-33			
BøEST_265	HQ384041	Effete (CG7425)	4E-20	GO:0008152 GO:0007275 GO:0007049	GO:0005488 GO:0003824	*
BøEST_268	HQ384042	Viking (CG16858)	2E-105	GO:0007275	GO:0005488 GO:0005198	GO:0005623 GO:0005576
BøEST_269	HQ384043	Tal (CG2827)	1E-94	GO:0008152	GO:0003824	GO:0005623
BøEST_270	HQ384044	Miscle LIM protein at 84B (CG1019)	1E-82	GO:0007275	GO:0005488 GO:0005198	GO:0005623
BøEST_272	HQ384045	CG7504	5E-18	-	GO:0005488 GO:0003824 GO:0003676	*
BøEST_273	HQ384046	Nucleoporin Nup54 (CG8831)	5E-45	GO:0006810	GO:0005215	GO:0005623
BøEST_274	HQ384047	SRY interacting protein 1 (CG10939)	2E-33	*	GO:0005488	-
BøEST_275	HQ384048	Elongation factor 2b (CG2238)	1E-105	GO:0008152 GO:0007049	GO:0005488 GO:0003824 GO:0003676	GO:0005623
BøEST_276	HQ384049	Mucin related 2B (CG14796)	4E-06	GO:0008152	GO:0005488	GO:0005623 GO:0005576 GO:0030312
BøEST_277	HQ384050	Ras which interacts with calmodulin (CG8418)	7E-63	*	GO:0003824	GO:0005623
BøEST_278	HQ384051	CG15892	3E-84	GO:0008150	GO:0003674	GO:0005575

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BoEST_279	HQ384052	CG8029	3E-26	GO:0008152 GO:0006810	GO:0005215 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_281	HQ384053	IdiCp-related protein (CG6177)	2E-58	GO:0006810	-	GO:0005623
BoEST_282	HQ384054	CG34365	3E-53	*	GO:0005488	-
BoEST_283	HQ384055	JmjC domain-containing protein 4 homolog (CG7200)	6E-41	GO:0008150	GO:0003674	GO:0005575
BoEST_284	HQ384056	CG12567	9E-88	-	GO:0003824	-
BoEST_287**	HQ384057	CG8538	1E-06			
BoEST_288	HQ384058	CG5798	1E-83	GO:0008152	GO:0003824	-
BoEST_289**	HQ384059	CG17230	3E-35			
BoEST_290	HQ384060	Alpha-Adaptin (CG4260)	2E-94	GO:0006810 GO:0007154	GO:0005488 GO:0003824 GO:0005215	GO:0005623
BoEST_294**	HQ384061	CG5642	3E-99			
BoEST_298	HQ384062	CC3534	1E-70	GO:0008152	GO:0003824	-
BoEST_301	HQ384063	Microtubule star (CG7109)	8E-109	GO:0008152 GO:0007275 GO:0007154 GO:0006810 GO:0007049	GO:0003824 GO:0030234	GO:0005623
BoEST_303**	HQ384064	CG30497	9E-05			
BoEST_305	HQ384065	Mitochondrial phosphate carrier protein (CG4994)	2E-83	GO:0007275 GO:0006810	GO:0005488 GO:0005215	GO:0005623
BoEST_309	HQ384066	Formin 3 (CG33556)	3E-34	GO:0007275	GO:0005488	-
BoEST_310**	HQ384067	CG31751	1E-64			
BoEST_313	HQ384068	CG6091	2E-72	GO:0006810	-	-
BoEST_316**	HQ384069	CG5630	2E-18			
BoEST_318**	HQ384070	CG18744	2E-33			
BoEST_322	HQ384071	Thiolester containing protein IV (CG10363)	6E-66	GO:0006950	GO:0005488 GO:0030234	GO:0005576

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BoEST_324	HQ384072	NTPase (CG3059)	1E-87	-	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_326	HQ384073	Lethal (3) malignant blood neoplasm (CG12755)	2E-18	GO:0007275	GO:0005198	GO:0005623
BoEST_327	HQ384074	Atlastin (CG6668)	5E-93	GO:0007275 GO:0007154	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_332	HQ384075	CG6370	7E-69	GO:0008152	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_334	HQ384076	Lissencephaly-1 (CG8440)	4E-07	GO:0007275 GO:0006810	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_335	HQ384077	Glycerophosphate oxidase-1 (CG8256)	7E-57	GO:0007049 GO:0008152 GO:0006810	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_337**	HQ384078	CG32638	4E-25			
BoEST_338	HQ384079	CG12857	7E-07	-	GO:0005488	-
BoEST_340	HQ384080	Rm62 (CG10279)	1E-18	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824 GO:0003676	GO:0005623
BoEST_341	HQ384081	Unc-89 (CG33519)	3E-91	GO:0008152 GO:0007154	GO:0005488 GO:0003824 GO:00030234	GO:0005623
BoEST_346	HQ384082	Darkener of apricot (CG42320)	3E-64	GO:0008152 GO:0007275 GO:0016265	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_349	HQ384083	Glycogenin (CG9480)	1E-74	GO:0007275	GO:0003824	-
BoEST_350	HQ384084	Troponin C at 41C (CG2981)	2E-73	-	GO:0005488	-
BoEST_351	HQ384085	Myosin heavy chain (CG17927)	0.0	GO:0007275 GO:0006928	GO:0005488 GO:0003824 GO:0005198 GO:0003774	GO:0005623
BoEST_353	HQ384086	Ribosomal protein L4 (CG5502)	4E-114	GO:0008152	GO:0005198	GO:0005623
BoEST_356	HQ384087	CG18081	2E-22	-	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_359	HQ384088	ATP synthase-β (CG11154)	1E-114	GO:0008152 GO:0006810	GO:0005488 GO:0003824 GO:0005215	GO:0005623
BoEST_360	HQ384089	Alpha-Esterase-2 (CG2505)	2E-68	-	GO:0003824	GO:0005623

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BoEST_364**	HQ384090	CG5612	7E-26			
BoEST_365	HQ384091	Sorbitol dehydrogenase-2 (CG4649)	1E-98	GO:0008152	GO:0005488 GO:0003824	-
BoEST_366**	HQ384092	Mann-cup (CG11896)	3E-84			
BoEST_370	HQ384093	CG7409	2E-70	GO:0008152 GO:0006950	GO:0005488	-
BoEST_373	HQ384094	Ubiquitin activating enzyme 1 (CG1782)	6E-113	GO:0008152 GO:0007275	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_375	HQ384095	Rab-protein 7 (CG5915)	3E-102	GO:0007275 GO:0006810 GO:0016265	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_380	HQ384096	Myosin light chain 2 (CG2184)	6E-109	-	GO:0005488 GO:0003824 GO:0003774	GO:0005623
BoEST_K164	HQ384097	Knockdown (CG3861)	9E-115	GO:0008152	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_K160	HQ384098	Tropomyosin 2 (CG4843)	1E-97	GO:0007275	GO:0005488	GO:0005623
BoEST_K158	HQ384099	CDK5RAP3-like protein (CG30291)	4E-80	GO:0008152 GO:0007049	GO:0003674	GO:0005575
BoEST_EM9	HQ384100	Kinesin light chain (CG5433)	3E-43	*	GO:0005488 GO:0003824 GO:0003774	GO:0005623
BoEST_E75	HQ384101	Glycerol 3 phosphate dehydrogenase (CG9042)	2E-70	GO:0008152 GO:0006810	GO:0005488 GO:0003824	*
BoEST_E58	HQ384102	Pineapple eye (CG5354)	8E-36	GO:0007275	GO:0005488	-
BoEST_E82	HQ384103	Glaikit protein (CG8825)	5E-07	GO:0008152 GO:0007275 GO:0006950	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_E26	HQ384104	CG6554	1E-21	GO:0008152	GO:0003824	GO:0005623
BoEST_E57	HQ384105	CathD (CG1548)	3E-11	GO:0008152 GO:0007275 GO:0016265	GO:0003824	*
BoEST_E65	HQ384106	Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (CG2259)	1E-44	GO:0008152 GO:0006950	GO:0005488 GO:0003824	GO:0005623
BoEST_E31	HQ384107	Microsomal triacylglycerol transfer protein (CG9342)	2E-14	GO:0008152 GO:0006810	GO:0005488 GO:0005215	GO:0005623
BoEST_78	HQ384108	No similarity				

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

BoEST_100	HQ384109	No similarity
BoEST_180	HQ384110	No similarity
BoEST_184	HQ384111	No similarity
BoEST_201	HQ384112	No similarity
BoEST_220	HQ384113	No similarity
BoEST_221	HQ384114	No similarity
BoEST_250	HQ384115	No similarity
BoEST_259	HQ384116	No similarity
BoEST_320	HQ384117	No similarity
BoEST_325	HQ384118	No similarity
BoEST_345	HQ384119	No similarity
BoEST_383	HQ384120	No similarity

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 5.2-5 Πίνακας συχνοτήτων επιλογής των κωδικών για 12 εξεταζόμενους οργανισμούς. Συντηρήσεις ειδών: Bc: *B. oleae*, Cc: *C. capitata*, Dm: *D. melanogaster*, Ag: *A. gambiae*, Md: *Musca domestica*, Am: *A. mellifera*, Bm: *B. mori*, Tc: *T. castaneum*, Gg: *G. gallus*, Xtr: *X. tropicalis*, Dr: *D. rerio*, Mm: *M. musculus*.

Αμινοξύ	Κωδικόνιο	Bc	Cc	Dm	Ag	Md	Am	Bm	Tc	Gg	Xtr	Dr	Mm
Ala / A	GCA	0,28	0,23	0,17	0,18	0,19	0,24	0,20	0,16	0,26	0,32	0,25	0,23
	GCC	0,24	0,26	0,45	0,35	0,42	0,23	0,27	0,41	0,32	0,29	0,30	0,38
	GCG	0,17	0,14	0,19	0,32	0,12	0,25	0,18	0,20	0,13	0,08	0,13	0,09
	GCT	0,32	0,36	0,19	0,15	0,27	0,28	0,35	0,23	0,29	0,32	0,32	0,29
Arg / R	AGA	0,12	0,13	0,09	0,07	0,17	0,35	0,25	0,18	0,22	0,27	0,26	0,22
	AGG	0,05	0,05	0,11	0,06	0,08	0,15	0,16	0,20	0,21	0,22	0,19	0,22
	CGA	0,12	0,11	0,15	0,13	0,14	0,18	0,13	0,16	0,10	0,12	0,12	0,12
	CGC	0,26	0,26	0,33	0,32	0,23	0,08	0,19	0,17	0,19	0,14	0,18	0,17
Cys / C	CGG	0,07	0,09	0,15	0,26	0,07	0,07	0,10	0,17	0,18	0,14	0,12	0,19
	CGU	0,37	0,37	0,16	0,16	0,32	0,17	0,18	0,11	0,10	0,12	0,13	0,08
Asn / N	AAC	0,36	0,42	0,56	0,68	0,31	0,39	0,55	0,55	0,57	0,48	0,60	0,57
	AAU	0,60	0,58	0,44	0,32	0,69	0,61	0,45	0,45	0,43	0,52	0,40	0,43
Asp / D	GAC	0,30	0,36	0,47	0,53	0,28	0,39	0,53	0,58	0,50	0,43	0,53	0,55
	GAU	0,70	0,64	0,53	0,47	0,72	0,61	0,47	0,42	0,50	0,57	0,47	0,45
Gln / Q	UGC	0,46	0,55	0,71	0,61	0,44	0,57	0,56	0,49	0,60	0,51	0,50	0,52
	UGU	0,54	0,45	0,29	0,39	0,56	0,43	0,44	0,51	0,40	0,49	0,50	0,48
	UAA	0,60	0,72	0,41	0,46	0,55	0,55	0,53	0,53	0,32	0,43	0,36	0,28
Glu / E	UAG	0,12	0,13	0,33	0,28	0,07	0,14	0,24	0,22	0,20	0,19	0,18	0,23
	UGA	0,28	0,15	0,25	0,26	0,38	0,31	0,23	0,25	0,47	0,38	0,46	0,49
Gly / G	CAA	0,68	0,60	0,30	0,26	0,62	0,68	0,52	0,57	0,27	0,34	0,26	0,25
	CAG	0,32	0,40	0,70	0,74	0,38	0,32	0,48	0,43	0,73	0,66	0,74	0,74
His / H	GAA	0,64	0,56	0,33	0,38	0,64	0,67	0,58	0,56	0,43	0,50	0,36	0,41
	GAG	0,36	0,44	0,67	0,62	0,36	0,33	0,42	0,44	0,57	0,50	0,64	0,59
	GGA	0,20	0,13	0,29	0,20	0,19	0,34	0,31	0,22	0,27	0,34	0,34	0,25
	GGC	0,31	0,34	0,43	0,38	0,34	0,23	0,27	0,29	0,31	0,24	0,28	0,33
Ile / I	GGG	0,06	0,04	0,07	0,16	0,06	0,12	0,11	0,27	0,25	0,23	0,16	0,23
	GGU	0,44	0,49	0,21	0,26	0,42	0,32	0,31	0,22	0,18	0,19	0,22	0,18
Leu / L	CAC	0,40	0,39	0,60	0,64	0,39	0,44	0,57	0,64	0,60	0,50	0,58	0,59
	CAU	0,60	0,61	0,40	0,36	0,61	0,56	0,43	0,36	0,40	0,50	0,42	0,41
	AUA	0,28	0,21	0,19	0,16	0,30	0,30	0,29	0,16	0,18	0,23	0,16	0,15
	AUC	0,25	0,34	0,47	0,57	0,25	0,31	0,37	0,39	0,46	0,35	0,50	0,50

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

	AUU	0,47	0,45	0,34	0,26	0,45	0,39	0,34	0,45	0,35	0,41	0,34	0,34
Leu / L	CUA	0,11	0,09	0,09	0,08	0,11	0,07	0,11	0,08	0,06	0,10	0,07	0,08
	CUC	0,10	0,15	0,15	0,16	0,09	0,15	0,18	0,18	0,18	0,14	0,18	0,20
	CUG	0,15	0,15	0,43	0,51	0,21	0,16	0,22	0,18	0,41	0,31	0,41	0,39
	CUU	0,12	0,12	0,10	0,09	0,09	0,16	0,14	0,13	0,13	0,18	0,14	0,13
	UUA	0,21	0,16	0,05	0,05	0,16	0,23	0,16	0,14	0,08	0,11	0,07	0,07
	UUG	0,31	0,34	0,18	0,12	0,35	0,23	0,19	0,29	0,13	0,16	0,13	0,13
Lys / K	AAA	0,57	0,53	0,30	0,30	0,60	0,66	0,55	0,63	0,44	0,50	0,49	0,39
	AAG	0,43	0,47	0,70	0,70	0,40	0,34	0,45	0,37	0,56	0,50	0,51	0,61
Met / M	AUG	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	UUC	0,49	0,61	0,62	0,66	0,49	0,55	0,61	0,53	0,55	0,44	0,53	0,56
Phe / F	UUU	0,51	0,39	0,38	0,34	0,51	0,45	0,39	0,47	0,45	0,56	0,47	0,44
	CCA	0,46	0,39	0,25	0,19	0,30	0,34	0,26	0,22	0,28	0,36	0,30	0,29
Pro / P	CCC	0,18	0,23	0,33	0,21	0,34	0,15	0,22	0,33	0,30	0,23	0,24	0,30
	CCG	0,18	0,15	0,29	0,52	0,19	0,23	0,25	0,26	0,14	0,10	0,15	0,10
	CCU	0,18	0,23	0,13	0,09	0,17	0,27	0,27	0,18	0,27	0,31	0,31	0,31
Ser / S	AGC	0,17	0,18	0,25	0,27	0,14	0,18	0,17	0,18	0,26	0,21	0,22	0,24
	AGU	0,18	0,16	0,14	0,11	0,17	0,16	0,17	0,19	0,14	0,17	0,16	0,15
	UCA	0,20	0,18	0,09	0,08	0,19	0,15	0,18	0,12	0,15	0,16	0,16	0,14
	UCC	0,14	0,16	0,24	0,18	0,18	0,15	0,17	0,19	0,20	0,19	0,18	0,22
	UCG	0,16	0,18	0,20	0,30	0,21	0,18	0,15	0,23	0,07	0,05	0,07	0,05
	UCU	0,16	0,14	0,08	0,06	0,11	0,18	0,18	0,09	0,18	0,22	0,20	0,20
Thr / T	ACA	0,35	0,31	0,20	0,14	0,34	0,29	0,28	0,21	0,30	0,35	0,31	0,29
	ACC	0,23	0,30	0,38	0,33	0,33	0,22	0,25	0,31	0,31	0,27	0,29	0,35
	ACG	0,15	0,14	0,26	0,43	0,17	0,27	0,21	0,24	0,14	0,09	0,13	0,10
	ACU	0,27	0,25	0,17	0,11	0,16	0,23	0,27	0,24	0,25	0,29	0,26	0,25
Trp / W	UGG	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
	UAC	0,39	0,50	0,63	0,75	0,30	0,43	0,61	0,65	0,60	0,50	0,57	0,57
Tyr / Y	UAU	0,61	0,50	0,37	0,25	0,61	0,57	0,39	0,35	0,40	0,50	0,43	0,43
	GUA	0,24	0,20	0,11	0,13	0,18	0,21	0,19	0,11	0,12	0,18	0,11	0,12
Val / V	GUC	0,17	0,19	0,24	0,24	0,22	0,21	0,26	0,30	0,22	0,19	0,23	0,25
	GUG	0,28	0,29	0,47	0,48	0,31	0,31	0,30	0,33	0,45	0,37	0,44	0,46
	GUU	0,31	0,31	0,19	0,16	0,29	0,28	0,26	0,26	0,21	0,26	0,22	0,17

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6.2-6 Χαρακτηριστικά των 17 EPRC δεικτών του *B. oleraceae* και δευτερεύοντα δια-ειδικής ενίσχυσης σε 12 είδη της οικογένειας Terphritidae. Η ονομασλογία των EPRC δεικτών ακολουθεί την αρίθμηση των αντίστοιχων EST βάσει των οποίων σχεδιάστηκαν. Οι αριθμοί στις στήλες των ειδών αντιπροσωπεύουν το προσδιορισμένο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης, μετά από ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αεραρίου (*) δίπλα από τα μεγέθη των ιντρονίων υποδηλώνει τις αλληλουχίες που κλωνοποιήθηκαν και περαιτέρω αλληλοκλήθηκαν. Τα τρία από τα είκοσι ζεύγη που συνολικά σχεδιάστηκαν και αποδείχτηκαν μη λειτουργικά στον *B. oleraceae* δεν συμπεριλαμβάνονται στον πίνακα.

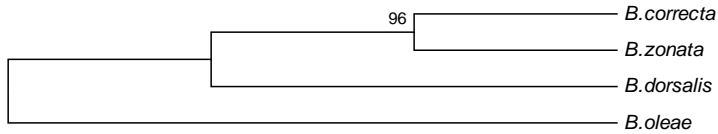
EPRC δείκτης	Αλληλουχίες ζεύγών εκκινητών (5'-3')	Ta	E.S.	Bo	Bo	Bd	Bz	Bcu	Af	Al	Astr	Aser	Cc	Cf	Rc
epic0138	F>GTTGACAAAGGAGAAATGG R>GCCAGATCTCAATGATAAG	48	550	470*	470*	470*	470*	480*	470	460	470	-	-	-	-
epic0149	F>AT8TGGATTTCTTGCAAG R>ATACAGCATCCGGGATATTACC	46	470	470*	470*	470*	460*	480*	460*	460*	460*	450	470*	470*	480*
epic0156	F>GATTGACAGTGGCCCTTTCC R>GCCAAACAATCGAAAGCATCC	48	510	520*	520*	520*	520*	520*	500*	500*	500*	-	500*	660*	500*
epic0186	F>CAATCCCAITGCCITATCTCG R>CAGACGTTGSAADAATTCACG	48	560	560*	570*	560*	560*	-	-	-	450	-	550	550	550*
epic0195	F>CAAGAGTCAAATCTCAAG R>GTZTTGATGGGTTGAAAR	54	320	320*	320*	320*	320*	320	330	330*	330*	330*	320*	320*	320*
epic0167	F>GGATGACCAAGCTTAATGG R>CCACCCAAAGTAAATAACC	54	700	1000*	1000*	1000*	1000*	1000*	-	1200	1100	1200	1000	1000	1000
epic0175	F>AAAATGGCTCCATAAGATCG R>ATCCACAGATCTTGGAAATATCG	51	480	550	550	550	550	550	-	-	550	-	-	-	550
epic0178	F>AAATGGCTCCATAAGATCG R>GTCCGAAACGATCTTAAABC	51	650	650*	650*	650*	650*	650*	550	650	650	-	650*	650*	-
epic0203	F>CCAAATGGAAAGATGATGAGC R>CTTAAAGGAAGATCCATCTCC	54	450	480*	470*	470*	470*	-	450	-	-	-	450	-	-
epic0169	F>GACCAATGCCGATGCTATTCC R>CCAATTCATCCAAAGCAGC	51	570	600*	600*	600*	600*	600*	600*	600	600	600*	600*	600*	600*
epic0215	F>AAACCTGTGACTGSAAGC R>CGATATTATCCACATTCACAGC	55	850	1100*	1100*	1100*	1100*	1100*	1300*	1000*	900*	900	1100*	1100*	1200*
epic0189	F>GATATTGACACAAGGGGAGC R>TTGGTTCTCATGATAGAC	55	470	1500*	1200*	1000*	1200*	1000*	-	-	-	-	1100	1100	1100
epic0275	F>ACCTTGAT8GACAA8AAGC R>AGCAATAATGAGGTTCAAG	51	700	760*	760*	760*	760*	750*	760*	750*	750	750*	750*	-	800*
epic0277	F>AGATTGTGATCTTGGAGATGG R>GCCCTTCAGTGGTTAAC	55	670	580*	560*	560*	560*	560*	-	-	-	-	570*	570*	-
epic0284	F>GACATACGTCATCTCTGG R>TAAATGUAATAGUUCALC	51	510	600	600	600	600	600	-	-	-	-	-	-	-
epic0228	F>CAGGCTTTGGAAGTTGG R>CTTAGCAAGATGATTCAGC	55	470	500	500	500	500	500	-	-	-	-	-	-	-
epic0282	F>ATCTCACAAACGCTAAGTCC R>GTCTCCAGCTCCGATGTGC	51	340	350	350	350	350	350	-	-	-	-	-	-	-

Ta (annealing temperature), θερμοκρασία υβρίδισμων (°C) εκκινητών στις εντοδόσεις PCR. E.S. (Expected Size): αναμενόμενο μέγεθος προϊόντων ενίσχυσης σε ζεύγη βάσεων (σύμφωνα με τα μεγέθη των ιντρονίων της D. melanogaster). Συμψηφισίς ειδών: Bo: *E. oleae*, Bco: *B. correctae*, Bcu: *B. cucurbitae*, Bd: *B. dorsalis*, Bz: *B. zonata*, Cc: *C. capitata*, Cf: *C. fasciventris*, Af: *A. fraterculus*, Al: *A. ludens*, Aser: *A. serpentina*, Rc: *Rhagoletis cerasi*.

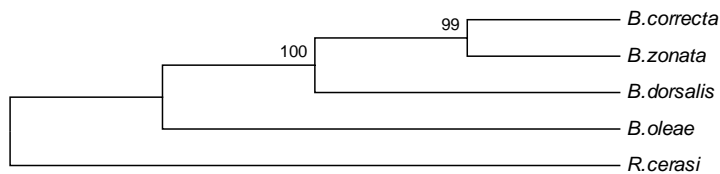
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Εικόνα 6.2-1 Δενδρογράμματα φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ ειδών της οικογένειας Terphritidae, σύμφωνα με τις διαφορές των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών των ιντρονίων που ενισχύθηκαν με τους EPIC δείκτες **α)** ericBo203, **β)** ericBo86, **γ)** ericBo169, **δ)** ericBo138, **ε)** ericBo275, **στ)** ericBo277, **ζ)** ericBo178, **η)** ericBo95. Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν βάσει του αλγόριθμου N-J και η αξιοπιστία κάθε κλάδου ελέγχθηκε με τη μέθοδο bootstrap, πραγματοποιώντας 100 ψευδοεπαναλήψεις.

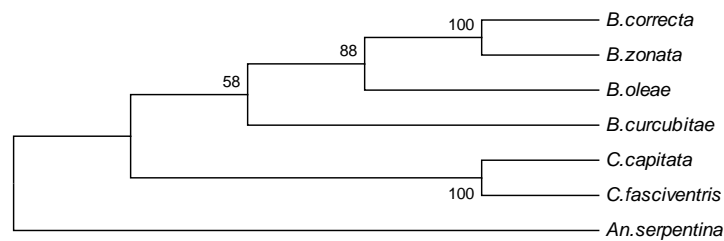
α



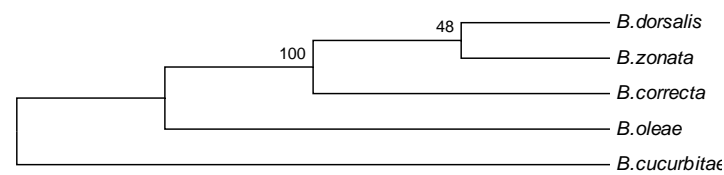
β



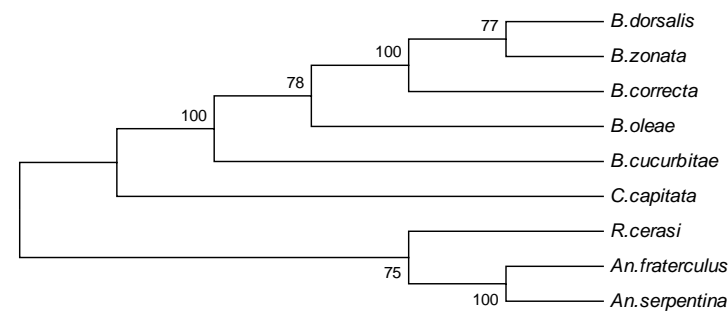
γ



δ

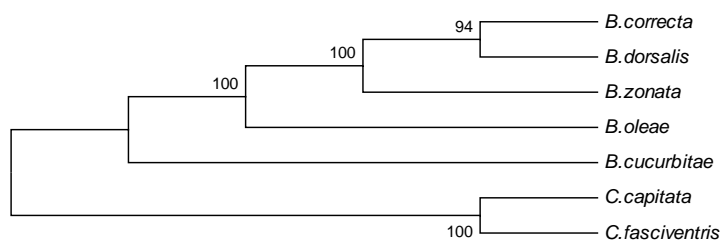


ε

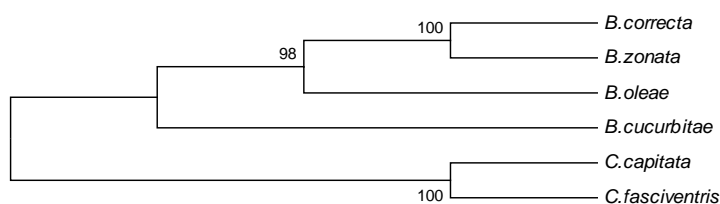


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

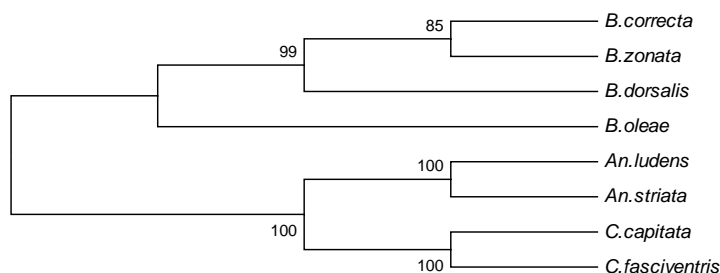
στ



ζ



η



6.3 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 3.3

Πίνακας 6.3-1 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διαλογή των προεπιλεγμένων κλασμάτων της γονιδιωματικής βιβλιοθήκης του *B. oleae*.

Εκκινητές	Αλληλουχίες ζευγών εκκινητών (5'-3')	Ta (°C)	E.S. (bp)
Achill400	F> AGTGTCTGATCAATGGC	47	338
	R> CAGCATCAGGTAGTGTCG		
1.2/5FF	F> AATTCCTCGCGACTCATCGC	53	244
	R> TACTAGGATAGGTCCCAG		

Ta (annealing temperature): θερμοκρασία υβριδισμού ζεύγους εκκινητών.

E.S (Expected Size): αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6.3-2 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση Long-PCR και περαιτέρω στην αλληλούχηση του προϊόντος ενίσχυσης. Οι εκκινητές αλληλούχησης τόσο για την εμπρόσθια (5') όσο και για την ανάστροφη (3') αντίδραση παρουσιάζονται με τη διαδοχική σειρά χρήσης τους κατά τη διαδικασία του βαδίσματος.

Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών (5'-3')	Ta (°C)	Διαδικασία
443-1.9Rii 6.0-2.4F-F2	TATCTTTCGACCAGTGCATCC TCAATGAACTACTACGCACAC	61	Long PCR (E.S. 3,6 kb)
443-1.9Ri	GACGGCCATTGATCATAACCTC		3' αλληλούχηση
443-3.6WRi	TTGCCGAAATTGCTTACTG		3' αλληλούχηση
443-3.6WRii	GCGGGAAATGTGCCAATG		3' αλληλούχηση
443-3.6WR3	CTTACCCCTTGTCTATGG		3' αλληλούχηση
6.0-2.4F-F2	TCAATGAACTACTACGCACAC		5' αλληλούχηση
443-3.6WFi	GCATATTCAAAGCTAAGAC		5' αλληλούχηση
443-3.6WFii	ACATCTTGACC GAATTAGAG		5' αλληλούχηση
443-3.6WF3	CGCGAAATCAATGGATATAC		5' αλληλούχηση

Ta (annealing temperature): θερμοκρασία υβριδισμού ζεύγους εκκινητών.

E.S (Expected Size): αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος ενίσχυσης.

Πίνακας 6.3-3 Αλληλουχίες των προσαρμογών Taq1 και Taq2, από τον υβριδισμό των οποίων σχηματίστηκε ο δίκλωνος προσαρμογέας TaqI-AD. Στην αλληλουχία σημειώνεται με έντονη γραφή το προεξέχον άκρο του προσαρμογέα που είναι συμπληρωματικό προς τα προεξέχοντα άκρα που δημιουργούνται με τη χρήση της ενδονουκλεάσης περιορισμού TaqI.

Προσαρμογείς	Αλληλουχίες (5'-3')
Taq1 adapter	GACGATGGATCCTGAG
Taq2 adapter	CGCTCAGGATCCAT

Πίνακας 6.3-4 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά και των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR και semi-nested PCR κατά τη διαδικασία ανίχνευσης της 3' περιοχής του *Achilles*.

Εκκινητές	Αλληλουχίες εκκινητών (5'-3')	Ta (°C)	Διαδικασία
Ανάστροφος	TaqI AP GATGGATCCTGAGCGA	45	PCR / Semi-nested PCR
Εμπρόσθιος	443-0.9 F1 TTCAAGACCCATCTCACCAC	45	PCR
	443-0.9 F2 GCTCCACTTCTCGCCATACC	45	Semi-nested PCR
	L19-F1 GACTAGGCCGATTGAAAAGG	45	PCR
	L19-F2 CGAGATGGTCACATAAGAATAG	45	Semi-nested PCR

Ta (annealing temperature): θερμοκρασία υβριδισμού ζεύγους εκκινητών

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 6.3-5 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των παρεμβαλλόμενων περιοχών μεταξύ των τριών υποκλώνων του βακτηριοφάγου φ443. Συγκεκριμένα το ζεύγος 1.9-1.3 gap ενισχύει και το χάσμα μεταξύ των κλώνων 1.9 kb και 1.35 kb, ενώ αντίστοιχα το ζεύγος 1.3-0.9 gap των κλώνων 1.35 kb και 0.9 kb.

Εκκινητές	Αλληλουχίες ζευγών εκκινητών (5'-3')	Ta (°C)
1.9-1.3 gap	F> CTACCCCAAATCACAAAACC R> GTCATATTACCCCGTGATGC	55
1.3-0.9 gap	F> AAAGTTAGTCGAAAGACGACC R> TACAAAGACAGCCACATACC	55

Ta (annealing temperature): θερμοκρασία υβριδισμού ζεύγους εκκινητών.

6.4 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΝΟΤΗΤΑΣ 3.4

Πίνακας 6.4-1 Αλληλουχίες και χαρακτηριστικά των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των επαναλαμβανόμενων μοτίβων BoR300 με συμβατική PCR και Real-time PCR. Η διάρκεια επιμήκυνσης της PCR για την ενίσχυση των μονομερών ήταν 15 sec.

Εκκινητές	Αλληλουχίες ζευγών εκκινητών (5'-3')	Ta (°C)
BoR300	F> TGCACATATGCATCTACC R> CTAAATGGGTTGAACG	47

Ta (annealing temperature): θερμοκρασία υβριδισμού ζεύγους εκκινητών.

7 ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Isolation, annotation and applications of expressed sequence tags from the olive fly, *Bactrocera oleae*

K. T. Tsoumani · A. A. Augustinos · E. G. Kakani ·
E. Drosopoulou · P. Mavragani-Tsipidou ·
K. D. Mathiopoulos

Received: 28 June 2010 / Accepted: 4 October 2010 / Published online: 27 October 2010
© Springer-Verlag 2010

Abstract The olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is the major pest of the olive tree. Despite its importance, very little genetic and molecular knowledge is available. The present study is a first attempt to identify and characterize *B. oleae* expressed sequence tags (ESTs). One hundred and ninety-five randomly selected cDNA clones were isolated and the obtained sequences were annotated through BLASTX similarity searches. A set of 159 unique putative transcripts were functionally assigned using Gene Ontology terms in broad categories of biological process, molecular function and cellular component based on *D. melanogaster* matches. Moreover, the cytogenetic location of 35 ESTs was determined by in situ hybridization to *B. oleae* polytene chromosomes. The resulting low-resolution EST map more than doubles the available entry points to the insect's genome and can assist syntenic comparisons with other distant species. The deduced codon usage of the isolated ESTs

suggested a conserved pattern of *B. oleae* with its closest relatives. Additionally, the comparative analysis of *B. oleae* ESTs with the homologous *D. melanogaster* genes led to the development of 17 nuclear EPIC-PCR markers for the amplification of intron sequences of 11 Tephritidae species. Sequencing analysis of several cross-amplified intron sequences revealed a high degree of conservation among *Bactrocera* species and a varying transferability of the generated markers across the examined genera, suggesting that this method can provide a useful tool for the clarification of phylogenetic relationships among different species, particularly in cases of species complexes.

Keywords Tephritidae · ESTs · Gene Ontology (GO) · In situ hybridization · EPIC markers · Codon usage

Introduction

The olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae), is the major pest of the olive tree. The adult female fly leaves its eggs in the olive fruit. The resulting larvae feed on the olive sap, thus destroying the fruit. The great economic impact of the losses that are attributed to this insect has led the olive-producing countries, especially in the Mediterranean basin, to search for new strategies of management and biological control (Mazomenos 1989; Montiel Bueno and Jones 2002). Till now its control has been based mainly on the use of chemical pesticides. In the early '70s, efforts to employ the sterile insect technique (SIT) against this insect were unsuccessful (Economopoulos et al. 1977), principally due to the low competitiveness of the released mass-reared males compared with the wild ones (Economopoulos and Zervas 1982). The method relies on the mass-rearing, sterilization and release of thousands

Communicated by S. Hohmann.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00438-010-0583-y) contains supplementary material, which is available to authorized users.

K. T. Tsoumani · A. A. Augustinos · E. G. Kakani ·
K. D. Mathiopoulos (✉)
Department of Biochemistry and Biotechnology,
University of Thessaly, Larissa, Greece
e-mail: kmathiop@bio.uth.gr

A. A. Augustinos
Department of Biology,
University of Patras, Rion, Greece

E. Drosopoulou · P. Mavragani-Tsipidou
Department of Biology,
Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece

of competing insects that could theoretically result in non-productive mating with the wild population. The use of such environmentally friendly approaches is hindered by the limited genetic and molecular information on *B. oleae*. In the past decade, molecular and genetic studies have focused on genetic analysis of natural populations (Augustinos et al. 2005; Nardi et al. 2005; Zygouridis et al. 2009), cytogenetics (for a review see Mavragani-Tsipidou 2002), isolation and characterization of a few genes that control important processes such as female germline differentiation and morphogenesis of epidermal cells (Khila et al. 2003), enzyme catalytic mechanisms (Benos et al. 2000) and sex-determining cascades (Lagos et al. 2005, 2007) as well as the identification and mapping of several microsatellite loci (Augustinos et al. 2002, 2005, 2008). Most notably, *B. oleae* has been successfully transformed recently (Koukidou et al. 2006), an achievement that gives new perspectives towards the efficient use of the SIT. Nonetheless, there is still an absence of genetic markers and promoter information that will render transformation more useful and effective.

In order to gain further insight into the molecular aspects of an organism, expressed sequence tag (EST) analysis is definitely an efficient and relatively low-cost approach for gene discovery and annotation (Adams et al. 2000; Deng et al. 2006; Gomulski et al. 2008), detection of gene expression (Whitfield et al. 2002), genome and physical mapping (della Torre et al. 1996, Hirotsawa et al. 2001) and molecular marker development (He and Haymer 1997, 1999; Papanicolaou et al. 2005). ESTs are single-pass sequence reads from randomly selected cDNA clones that sample the diversity of genes expressed in an organism. In organisms where polytene chromosomes are available, *in situ* hybridization of ESTs can identify the exact position of an expressed gene in the genome (Adams et al. 1991) and provide useful molecular landmarks for genetic mapping. For non-model organisms where whole genome sequencing is a distant goal, as in the case of *B. oleae*, EST analysis would represent a quick and cost-effective gene discovery method. Fortunately, however, the rapid advances in molecular and sequencing techniques may render such goals more tangible. Furthermore, codon usage analysis can give insight into the preference of the translation machinery and can provide useful information on evolutionary relationships among coding sequences of related taxa (Bulmer 1991; Goldman and Yang 1994; Duret 2002). ESTs can also assist in the recognition of intron/exon boundaries and therefore can prove helpful for the development of EPIC (Exon Primed-Intron Crossing) PCR markers based on nuclear genes (Berrebi et al. 2006). Despite the high levels of genetic variation within the intron sequence, the conserved nature of the flanking exons can facilitate cross-amplification in a wide range of target taxa, rendering EPIC

markers valuable tools for evolutionary and population genetics. This approach has been used in several studies, such as the population structure of whales (Palumbi and Baker 1994) or the invasion history of Tephritids (Villablanca et al. 1998).

The present study is a first attempt to identify putative genes on the basis of their expression in the adult olive fruit fly transcriptome. Here we report the isolation of ESTs derived from partial sequencing of randomly selected clones from an adult male cDNA library. Despite the relatively small number of ESTs, we were able to draw useful conclusions with regard to the categorization of the olive fly's genome according to GO assignments. In addition, we were able to demonstrate their utility in physical mapping of molecular markers, in codon usage analysis and in EPIC primer design and phylogenetic comparisons.

Materials and methods

Isolation of cDNA clones and sequence analysis

EST clones were obtained from an adult male cDNA directional library (Lagos et al. 2005). Mass-excision of cDNA clones was performed according to the protocol of the pBK-CMV phagemid vector (Stratagene) the only modification being the helper phage-to-cells ratio that was adjusted to 1:1. Randomly excised DNA clones were obtained from a plate pool. Plasmid DNA was isolated with the use of the Promega Wizard Plus Minipreps DNA Purification System. The isolated cDNA clones were partially sequenced from the 5' end using the pBK-CMV T3 primer. DNA sequencing was performed by Macrogen Inc. (Korea). Vector sequences were trimmed using the OMIGA software program.

The BLASTX program (Altschul et al. 1990) was used to search the NCBI non-redundant (nr) protein database for homologies with the putative translations of the ESTs in the three sense frames. Homology was reported for best hits, with the *E*-value threshold set to 10^{-4} for BLASTX algorithms. The presence of an open reading frame with or without a start codon was determined using the OMIGA software program.

Functional classification was based on GO assignments (The Gene Ontology Consortium 2000). Sequences were assigned to three categories (biological process, molecular function and cellular component) according to the defined significant hits with *Drosophila* genes (Deng et al. 2006). Gene symbols were manually loaded in GO Slimmer tool of AmiGO software (Carbon et al. 2009) for mapping into high-level broader terms referred to as GO slim terms. Accession numbers of the reported ESTs are presented in Table S1.

RT-PCR analysis

Adult *B. oleae* flies (from the “Demokritos” laboratory strain) were pooled and RNA was extracted using Strata-gene Absolutely RNA isolation kit. 1 µg of total RNA was reverse-transcribed using random primers with the Affinity-Script QPCR cDNA synthesis kit (Stratagene) according to the manufacturer’s instructions. One-tenth of the first-strand cDNA was further used for standard PCR. PCR amplification was carried out in a 20 µl reaction volume using 1.5 mM MgCl₂, 1× PCR reaction buffer, 1 unit Taq DNA polymerase (Bioline), 0.4 pmol of each forward and reverse primers and 0.8 mM dNTPs. The PCR amplification profile was: 94°C 4 min; 94°C 30 s, 47–53°C 30 s, 72°C 30 s 30 cycles; 72°C 5 min. Primers, annealing conditions and expected product sizes are given in Table S2. All PCR products were resolved in 1% agarose gels stained with ethidium bromide.

In situ hybridization to polytene chromosomes

Polytene chromosome preparations of salivary glands were made from late third-instar larvae, as described in Zambetaki et al. (1999). Selected EST clones were mapped on polytene chromosomes after labeling with digoxigenated dUTP (dig-11dUTP) using the random priming method at a hybridization temperature of 62°C and the detection of the signals was performed with specific antibodies (ROCHE Diagnostics, Mannheim, Germany) according to Drosopoulou et al. (1995).

Codon usage

Codon usage analysis was performed using the GCUA 2.0 (Fuhrmann et al. 2004). Codon frequencies of the 11 compared organisms [(Insecta: *Ceratitis capitata*, *Musca domestica*, *Apis mellifera*, *Tribolium castaneum*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Anopheles gambiae*), (Amphibia: *Xenopus tropicalis*), (Actinopterygii: *Danio rerio*), (Mammalia: *Mus musculus*), (Aves: *Gallus gallus*)] were retrieved from Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). A dendrogram was constructed utilizing the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) in PHYLIP 3.6C (Felsenstein 1994), based on codon frequencies. The robustness of each node was assessed by the bootstrap method. For this purpose, 500 pseudoreplicates were generated by random resampling of the original data using SEQBOOT and GENDIST. The new distance matrices that were created were then subjected to NEIGHBOUR in PHYLIP to construct dendrograms and CONSENSE in PHYLIP 3.6C to derive a consensus tree. Visualization of the dendrogram was performed by TreeView32 software (Page 1996).

Design and cross-species amplification of EPIC markers

The exon primed–intron crossing (EPIC) primer pairs were designed from the obtained ESTs of *B. oleae* using the OMIGA software program. The putative exons of each EST were determined after BLASTN search and alignment with the *D. melanogaster* genome. PCR amplification was carried out in a 20 µl reaction volume using 20 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 1× PCR reaction buffer, 1 unit Taq DNA polymerase (Bioline), 0.4 pmol of each forward and reverse primers and 0.8 mM dNTPs. The PCR amplification profile was 95°C 4 min; 94°C 1 min, 46–55°C 1 min, 72°C 1 min 30 cycles; 72°C 10 min. Primers, annealing conditions and expected product sizes are shown in Table S3. All PCR products were resolved in 1% agarose gels stained with ethidium bromide.

Cloning and sequencing of the EPIC-PCR products

PCR amplicons were gel-purified using Wizard1 SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) according to the suppliers’ manuals. Cloning of the cleaned amplified sequences was performed with the TA cloning system to pBlueScript-SK(+) (Sambrook et al. 1989). The alkaline lysis method was used to extract plasmid DNA. Sequencing was performed by Macrogen Inc. (Korea).

Phylogenetic analysis

The construction of the phylogenetic trees was based on the alignment of the exon–intron sequences by the Neighbor-Joining (NJ) method using the MEGA version 3.1 program (Kumar et al. 2004). The resultant trees were tested by bootstrapping 100 pseudoreplicates (Felsenstein 1994) to estimate the statistical reliability of the nodes.

Results

Isolation and characterization of ESTs

A total of 256 sequences from an adult male *B. oleae* cDNA library were randomly isolated. Approximately 800 nucleotides of each cDNA were determined by single-pass sequencing at the 5′ end. In order to verify that the putative transcripts represented true protein-encoding genes, the obtained sequences were individually examined to identify an open reading frame (ORF). We performed three sense frame translations for all the sequences and the longest of the three ORFs in the forward (5′) direction was queried against the NCBI non-redundant (nr) protein database using BLASTX with the *E*-value threshold set at 10^{−4}. Additional protein BLAST searches were

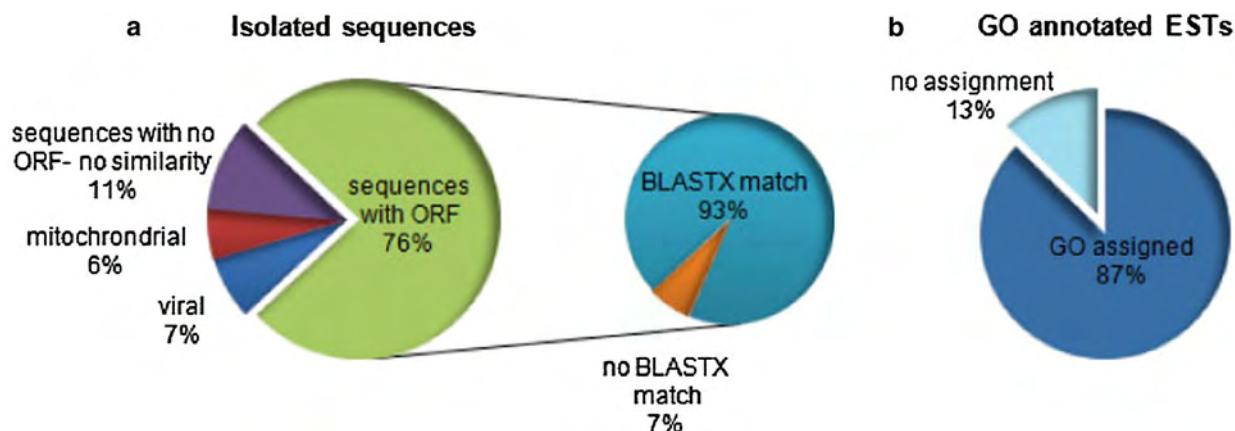


Fig. 1 BLASTX comparison results of all isolated sequences. The percentages indicate **a** the proportion of all isolated sequences with or without an open reading frame (ORF) and BLASTX results and **b** the proportion of the GO assigned ESTs

performed giving no diverged information to the previous BLASTX results.

Overall, out of 256 isolated sequences, 195 (76%) were characterized as ESTs based on the presence of an ORF. Among these 195 EST clones, 182 sequences (93%) displayed highly significant hits to *Drosophila melanogaster* predicted proteins or previously characterized proteins deposited in the GenBank nr (Fig. 1a). About 7% of the putative transcripts had either no BLAST results or no meaningful matches ($E > 10^{-4}$) and consequently their biological relevance remains doubtful. For 11% of the isolated 256 sequences neither the presence of a putative ORF nor a BLAST hit was confirmed. Formally, however, several of these clones could still be expressed sequence tags, since they could represent 5'- or 3' UTRs or other transcribed sequences, as discussed below. A surprisingly large number of sequences (7%) appeared to have matches to a polyprotein of the honey bee sacbrood virus and a remaining 6% corresponded to mitochondrial derived sequences (cytochrome oxidase subunits) (Fig. 1a). Both these fractions were not further considered in the analysis.

Gene Ontology analysis

The generated ESTs were annotated by homology using BLAST similarity and Gene Ontology (GO) terms (Table S1) (Adams et al. 2000). *Drosophila melanogaster* GO annotations were used to interpret the gene function of the ESTs. Each sequence was assigned in GO terms with respect to the best similarity match in BLASTX searches of *Drosophila* predicted proteins ($E \leq 10^{-4}$). The collection of GO terms used was “slimmed” in order to produce useful summaries of the annotations via the GO slimmer tool of the official software AmiGO (Fig. S1) (Carbon et al. 2009).

Among the 182 sequences that indicated homology to unique entries against the *Drosophila* peptide database

(Table S1), 159 ESTs (87%) had hits to annotated genes (Fig. 1b). The remaining 23 (13%) matched unassigned gene products and were excluded from GO classification. The sequences that showed significant similarity to known genes were further annotated. Finally, functional information was attributed to 159 of our ESTs, using a high-level view of the three ontologies based on GO slim terms (Fig. 2, S1). The most represented roots in biological process were metabolism and development, accounting for 34 and 20%, respectively, of the annotated sequences with at least one GO term. In terms of molecular function, 37 and 34% were involved in binding and catalytic activities, respectively. The largest subcategory in cellular process comprising 77% was related to cell.

RT-PCR analysis of putative *B. oleae* transcripts

In order to confirm that the isolated ESTs correspond to actual transcripts we checked for their presence by RT-PCR of total RNA from adult flies. We analyzed five putative ESTs (BoEST_86, 95, 175, 100, 320) as well two clones (87, 92) that presented neither a substantial ORF nor any similarity in the BLASTX. As a positive control, *B. oleae* acetylcholinesterase exon 10 (Boace10) was used (Kakani et al. 2008). All reactions produced intense bands of the expected size (Fig S2).

In situ hybridization to polytene chromosomes

The exact chromosomal position of thirty-five EST clones was determined by in situ hybridization to salivary gland polytene chromosomes using the entire clone as probe (Fig. S2). The hybridization sites were identified according to the available polytene chromosome maps (Mavragani-Tsipidou et al. 1992; Zambetaki et al. 1995). Map positions are summarized in Table 1. Unique hybridization signals were generated by all transcripts except one (BoEST_110).

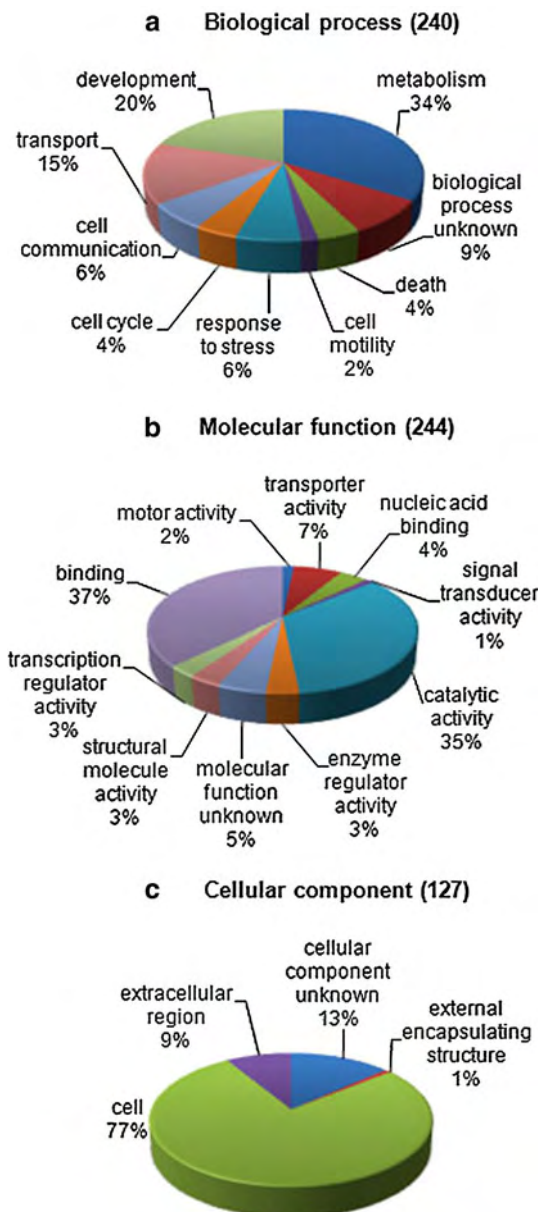


Fig. 2 Distribution of *B. oleae* ESTs across GO categories. ESTs were assigned in terms of **a** biological process, **b** molecular function and **c** cellular component. Several proteins have been assigned to more than one category. Therefore, 100% is considered the total number of assignments. Numbers *outside* the pie charts represent the percentage of gene products within each category. The numbers on the *top* of each pie chart denote the total number of assignments in each GO domain

Five sequences (BoEST_: 104, 116, 133, 175 and 200) were found to map on the centromeric region of chromosomes I, III, IV and V. Interestingly, three of the mapped clones neither generated hits at BLASTX searches (BoEST_100) nor had a putative ORF (BoEST_: 87, 92). Figure 3 presents an integrated cytogenetic map of *B. oleae* polytene chromosomes, containing all the in situ hybridization data accumulated from this study together with the previously described molecular markers.

Codon usage

The identified ORFs of the 195 sequences were manually analyzed and the amino acid composition of the putative proteins, consisting of a total of 40,359 codons, was examined. Twelve additional unique *B. oleae* coding sequences (CDS) that already existed in the GenBank were also included in our analysis: acetylcholinesterase (*ace*), alcohol dehydrogenase 1 and 2 (*Adh1*, *Adh2*), 6-phosphogluconic dehydrogenase (*6-Pgd*), *ovoA*, *ovoB*, female-specific doublesex (*dsx*), male-specific doublesex (*dsx*), female-specific transformer (*f-tra*), male-specific transformer (*m-tra*), sex-lethal (*sxl*), transformer-2 (*tra-2*). The overall frequencies of each codon were calculated (Table 2) and compared with the respective ones of 11 organisms from the main biological classes obtained from the Codon Usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>). The generated UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) relationships (Fig. 5) based on these frequencies demonstrate that the observed variations in codon usage are reflected in a species phylogeny where *B. oleae* correctly clusters with its mostly related species *C. capitata* and *M. domestica*.

Development of EPIC markers and cross-species amplification in Tephritidae

Homologous genomic DNA sequences from *D. melanogaster* were aligned with the generated *B. oleae* ESTs and the putative intron/exon boundaries of *B. oleae* were determined. Introns of expected lengths between 300 and 1,000 bp were selected for EPIC primer design. Twenty primer pairs were developed at the flanking exons of the selected introns and were further tested with regard to their ability to cross-amplify specific amplicons in 11 Tephritidae species. Four of these species belonged to genus *Bactrocera* (*B. correcta*, *B. cucurbitae*, *B. dorsalis* and *B. zonata*), four to *Anastrepha* (*A. fraterculus*, *A. ludens*, *A. serpentina* and *A. striata*), two to *Ceratitidis* (*C. capitata* and *C. fasciventris*) and one to *Rhagoletis* (*R. cerasi*). Three of the 20 primer pairs were not functional even to *B. oleae* while the rest 17 produced comparable amplicons of the expected size at least in one of the species examined (Table S3). In total, 145 amplification products were detected and 98 were cloned and sequenced in order to assess the divergence of the amplified products.

As expected, the average transferability of the generated markers was higher within the *Bactrocera* genus (92.6%) than for the other Tephritidae tested (Fig. 6). Among the *Bactrocera* species, *B. cucurbitae* showed a significantly lower percentage of amplification (76.5%), comparable to that of *Ceratitidis*. Success within members of the *Ceratitidis*

Table 1 Map positions (division number and chromosome arm) of the 35 EST clones after in situ hybridization to *B. oleae* salivary gland polytene chromosomes

<i>B. oleae</i> ESTs	EST map position	Gene map position	<i>D. melanogaster</i> genes
BoEST_122	1 IL	42C6-C7 2R	Lethal (2) 01289 (CG9432)
BoEST_86	1 IL	77B6 3L	Insulin degrading metalloproteinase
BoEST_107	4 IL	98B1 3R	ALG-2 interacting protein X
BoEST_175	Centromere I	2C4-C7 X	alpha actinin
BoEST_89	18 IR	57A9-A10 2R	Exuperantia
BoEST_87	18 IR	–	–
BoEST_72	20 IR	13E13-14 X	T-cp1zeta
BoEST_81	20–21 IR	71B5 3L	Protein disulfide isomerase
BoEST_108	23 IIL	18B1 X	Ulp1
BoEST_126	25 IIL	59F5 2R	Retained
BoEST_50	26–27 IIL	26F5 2L	CG9232
BoEST_117	36 IIR	96D2 3R	CG11909
BoEST_165	36 IIR	30B5 2L	GDP dissociation inhibitor
BoEST_106	38 IIR	83C4 3R	Rpn5
BoEST_100	39 IIR	–	–
BoEST_37	40 IIR	86E17 3R	CG14721
BoEST_92	42 IIR	–	–
BoEST_95	44 IIR	77B4-B5 3L	Eukaryotic release factor 1
BoEST_111	45 IIIL	92F2 3R	Septin-2
BoEST_90	48 IIIL	43E18 2R	CG1882
BoEST_41	58 IIIL	50E4 2R	CG8485
BoEST_133	Centromere III	41D3 2R	gustavus
BoEST_109	63–64 IIIR	11A2-A3 X	Mucin 11A
BoEST_94	67–68 IVL	–	–
BoEST_110	68, 70–71 IVL	62E3-E4 3L	CG1146
BoEST_166	68 IVL	63B11 3L	Heat shock protein 83
BoEST_169	74 IVL	13A1 X	Paramyosin
BoEST_113	75 IVL	77C6 3L	CG5059
BoEST_88	77 IVL	76C6 3L	Karyopherin alpha1
BoEST_200	Centromere IV	31B1 2L	Chico
BoEST_104	Centromere V	30C5 2L	cAMP-dependent protein kinase 1
BoEST_116	Centromere V	32D5-E1 2L	Ca ²⁺ -channel-protein- β -subunit
BoEST_43	96–97 VR	25C7-C10 2L	Muscle-specific protein 300
BoEST_105	97 VR	25B1 2L	CG11926
BoEST_38	100 VR	22B1 2L	CG17652

The respective locations of their *D. melanogaster* orthogs were attributed according to FlyBase information. The clones BoEST_87, 92 and 100 showed no similarity in BLASTX searches

genus was 64.7%, followed by 50.0 and 55.6% for *Anastrepha* and *Rhagoletis*, respectively.

The NJ trees generated from the sequencing alignments of several EPIC markers suggested that all *Bactrocera* species tend to cluster together with high bootstrap values, as well as the other species to their respective genera. Furthermore, it was also clear that *B. cucurbitae* does not share the phylogenetic proximity of the other three *Bactrocera* species to *B. oleae* but seems to be more distantly related. Moreover, the olive fly itself seems to be more distantly related to the other three *Bactrocera* (*B. dorsalis*, *B. zonata* and *B. correcta*), which form their own node. The generated tree topologies clearly manifest that the *Bactrocera*

genus is most closely related to the *Ceratitis*, followed by the *Anastrepha* and *Rhagoletis*. Some indicative dendrograms are presented in Fig. 7.

Discussion

ESTs' quality and annotation analysis

The manipulation of a species relies on the availability of fundamental information that provides novel insights into evolution and gene regulation. Although *B. oleae* is an insect of great economic importance, its basic genome

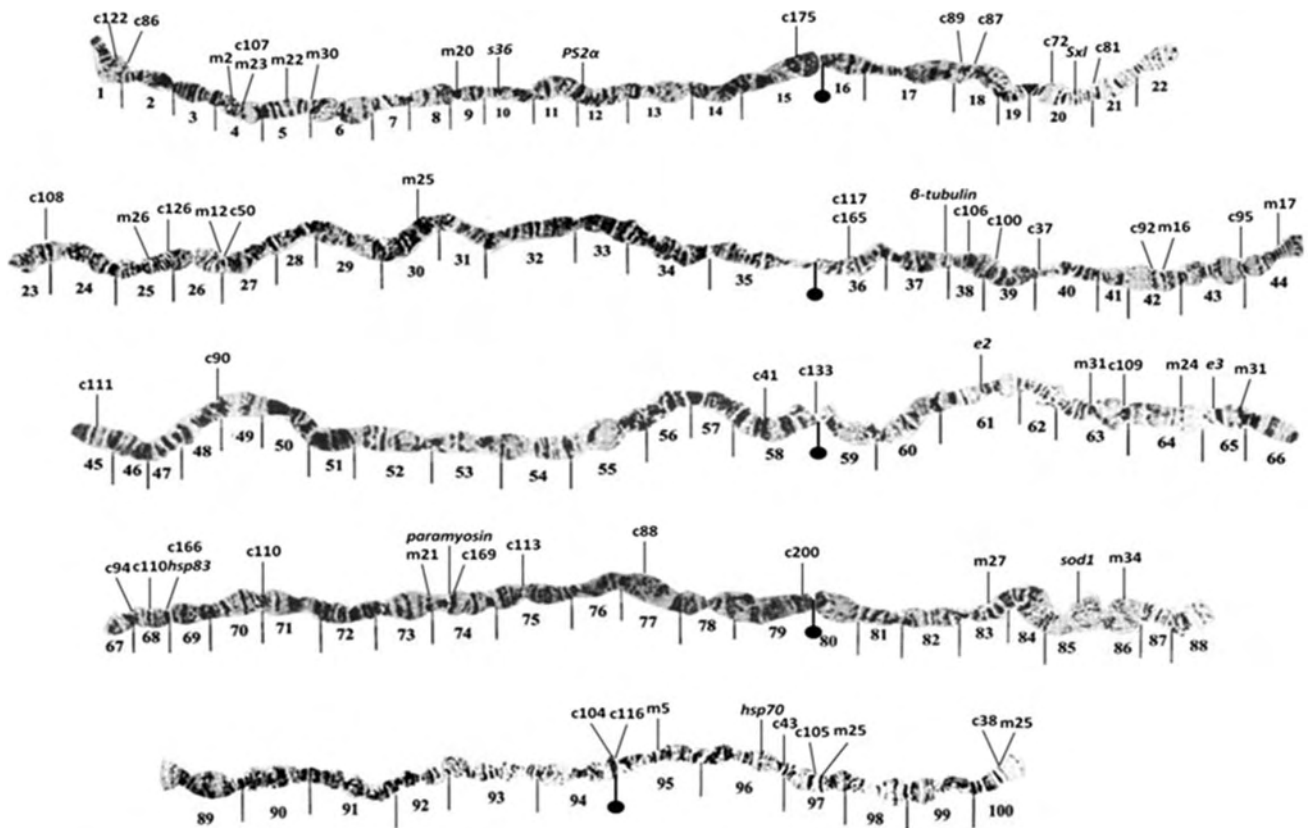


Fig. 3 Cytogenetic map of *B. oleae* autosomes. There are also included all the available in situ data (Mavragani-Tsipidou 2002; Augustinos et al. 2008). The letter *m* corresponds to microsatellite markers;

c corresponds to BoEST; mapped genes are shown in abbreviation or full names. The filled circle corresponds to the centromere. The numbers next to letters *c* follow the nomenclature of the generated ESTs

Table 2 Codon usage of *B. oleae* generated from 45,762 codons

Phe	UUU	0.49	Ser	UCU	0.16	Tyr	UAU	0.61	Cys	UGU	0.54
	UUC	0.51		UCC	0.14		UAC	0.39		UGC	0.46
Leu	UUA	0.21		UCA	0.20	TER	UAA	0.60	TER	UGA	0.27
	UUG	0.31		UCG	0.16		UAG	0.12	Trp	UGG	1.00
	CUU	0.12	Pro	CCU	0.18	His	CAU	0.60	Arg	CGU	0.37
	CUC	0.10		CCC	0.18		CAC	0.40		CGC	0.26
	CUA	0.11		CCA	0.46	Gln	CAA	0.68		CGA	0.12
	CUG	0.15		CCG	0.18		CAG	0.32		CGG	0.07
Ile	AUU	0.47	Thr	ACU	0.27	Asn	AAU	0.64	Ser	AGU	0.18
	AUC	0.25		ACC	0.23		AAC	0.36		AGC	0.17
	AUA	0.28		ACA	0.35	Lys	AAA	0.57	Arg	AGA	0.12
Met	AUG	1.00		ACG	0.15		AAG	0.43		AGG	0.05
Val	GUU	0.31	Ala	GCU	0.32	Asp	GAU	0.70	Gly	GGU	0.44
	GUC	0.17		GCC	0.24		GAC	0.30		GGC	0.31
	GUA	0.24		GCA	0.28	Glu	GAA	0.64		GGA	0.20
	GUG	0.28		GCG	0.17		GAG	0.36		GGG	0.06

Numbers in bold denote the codon with the highest frequency

research is still far behind compared with other organisms whose whole genome sequence projects have been completed or are in progress [*D. melanogaster* (Adams et al.

2000), *A. gambiae* (Holt et al. 2002), *A. mellifera* (The Honey bee Consortium 2006), *C. capitata* (Gomulski et al. 2008)]. Till now, a limited amount of genome and coding

sequences as well as molecular data of this species are available. The present study is a first attempt at transcriptome level sequencing of *B. oleae* through the isolation and partial characterization of an EST set, as well as an initial exploration of their utility. All obtained chromatographs were individually examined for possible frame-shift errors and sequences were manually analyzed to identify protein coding genes. Manual curation guarantees a high level of correctness in contrast to automatic assembly. Only the 5' forward frames were selected for the in silico analysis since the ZAP Express[®] cDNA synthesis kit used for the construction of the available library ensures the unidirectionality of the inserts. Our analysis revealed 195 putative transcripts (Fig. 1a) and most likely they represent an equal number of genes if we consider that each EST represents a transcript of a single protein-coding nuclear gene. Thirteen clones (7%) out of the above set (Fig. 1a) with well-defined ORFs produced no BLAST hits, indicating possible *B. oleae* functions distinct from *Drosophila*. Clones that lacked a putative ORF and showed no BLAST matches are probably non-coding sequences and were removed from the GO analysis. Such sequences are not unusual during the preparation of a poly-(dT) primed cDNA library. Many factors may be responsible for this, including frame-shift errors or 5' truncation of cDNAs through internal poly(A) priming, which would result in the isolation of 3' untranslated regions (UTRs) (Kyung Nam et al. 2002). Additionally, AT-rich genomic regions may also lead to ESTs not derived from mRNA. This may also explain the presence of mitochondrial sequences, as well as sequences of viral origin. The latest is most likely to have occurred as a result of the library's contamination by an uncharacterized *B. oleae* sacbrood RNA virus, as it is also reported in *C. capitata* (Gomulski et al. 2008).

Subsequent analysis of *B. oleae* ESTs was based on the availability of the *D. melanogaster* genome sequences and their extensive GO annotation. GO is a classification system by the Gene Ontology Consortium that provides assignments of a structured vocabulary to gene products including molecular function, biological process and cellular component, according to recognizable protein domains (The Gene Ontology Consortium 2000). In order to attribute GO annotations to our ESTs, 159 unique sequences were assigned to GO slim terms in each of the organizing principles through BLAST similarity information and their representation across the different functional categories was further examined (Fig. 2, S1). Nevertheless, 23 sequences (Table S1) that clearly encoded proteins of known or predicted function were not included in the annotation (Fig. 1b). This was due to fact that the respective "best hit" peptide of *D. melanogaster* was not yet assigned. The distribution of the proteins encoded from our ESTs across GO

broad categories, despite the small number of the sequences analyzed, follows to some extent that of *D. melanogaster* according to its proteome analysis reported at EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/integr8/GOAnalysisPage.do?orgProteomeID=17>).

These data suggest a phylogenetic proximity among *B. oleae* and *D. melanogaster* not only in protein conservation but also in their functional distribution. However, it is noteworthy that BLASTX results reflect the massive presence in databases of sequences from this insect genome. In the near future this may be altered as more genome sequences from other dipteran species will be reported. Further sequencing of the library should yield additional new transcripts, as genes sampled here represent a small fraction of the complete *B. oleae* gene set, whereas the availability of ESTs from different tissues or development stages will reveal more information about the transcriptome of the organism.

Experimental verification of expression of putative *B. oleae* transcripts

Confirmation of expression of the isolated clones was performed by RT-PCR on a few selected clones. Seven putative *B. oleae* transcripts that belonged to diverse categories according to BLASTX results (Fig. 1) were tested. Three ESTs with BLASTX similarity matches (BoEST_86, 95 and 175) and two (BoEST_100 and 320) that showed no similarity in BLASTX searches were selected. ORFs were identified in all five ESTs. In addition, two more isolated clones (87, 92) for which neither an ORF nor any BLASTX similarity was identified, were also used in order to examine the possibility of their being non-coding transcripts (such as 5'- or 3'-UTRs). Expected size bands were amplified for all of them (Fig. S2), a fact that indicates that even clones of no BLASTX similarity or no substantial open reading frames should, indeed, correspond to *B. oleae* expressed sequences. Quite interestingly, BLASTN comparisons of the minus strand of clone 87 presents a high similarity ($E = 3e^{-25}$) to the 5'-UTRs of *B. oleae*'s *ovoB* gene for zinc finger transcription factor. This may signify that clone 87 is an anti-sense transcript of *ovoB* 5'-UTR. To understand the exact nature of sequences such as 87 and 92 further analysis is necessary.

Cytological map and synteny comparisons

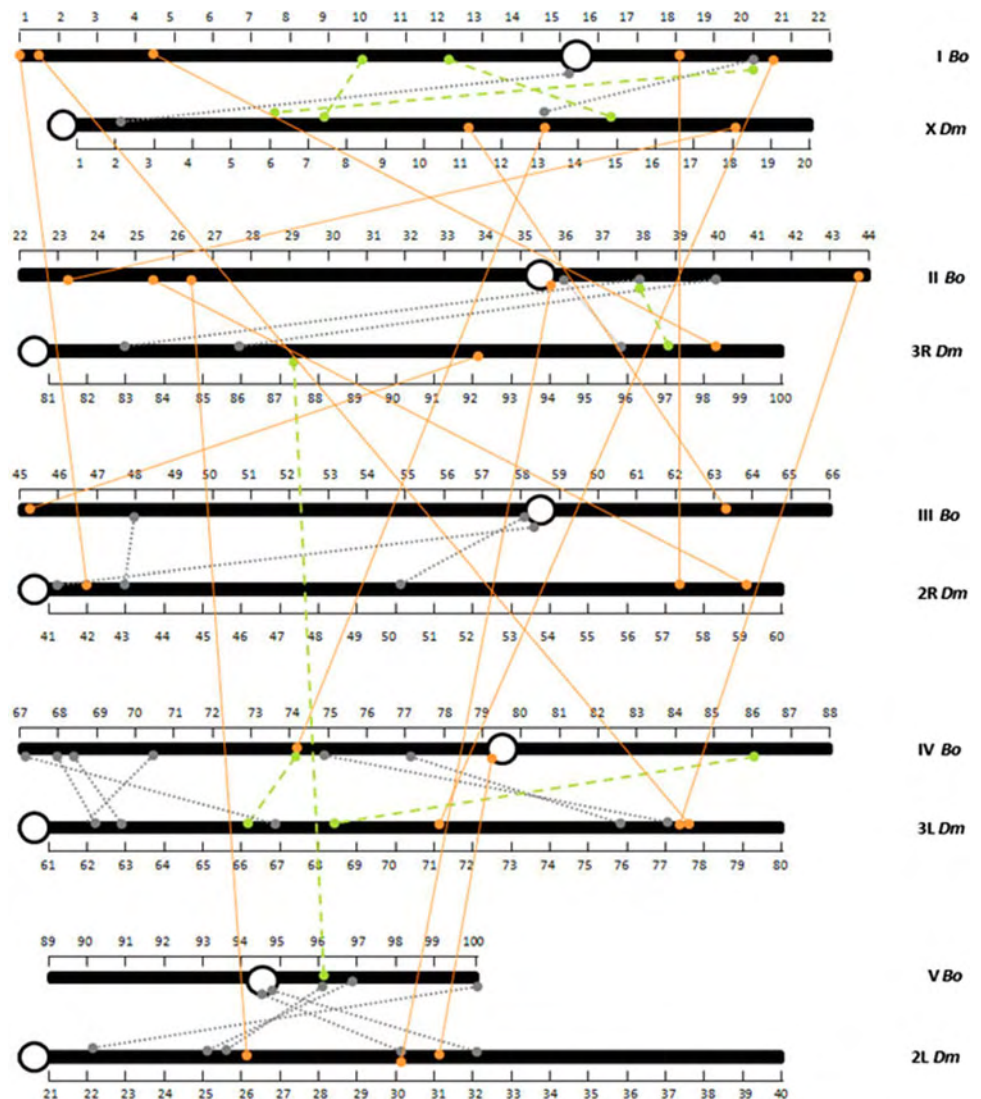
The availability of well-characterized cytological maps of the polytene chromosomes of *B. oleae* (Mavragani-Tsipidou 2002; Zambetaki et al. 1995) enabled the exact localization of 35 EST markers by in situ hybridization. The hybridized ESTs are dispersed on eight of the ten polytenized chromosomal arms. The establishment of the exact mapping

position of these markers more than doubles the available entry points to *B. oleae*'s chromosomes. Until now the available in situ data corresponded to 10 heterologous gene markers (Zambetaki et al. 1999) and 13 microsatellite markers (Augustinos et al. 2008). Given the absence of any morphological markers for this insect and, therefore, the difficulty of performing classical genetic analysis, the resulting low-resolution EST map should facilitate molecular genetic studies in *B. oleae*. Among the hybridization results some present particular interest. First, BoEST_100 for which no BLASTX hits were identified, a clear in situ hybridization signal was obtained in division 39 IIR. Given a substantial open reading frame of this clone, this sequence may indicate the presence of a *B. oleae* function distinct from *Drosophila*. Second, clones 87 and 92 for which neither an ORF nor any BLASTX similarity was identified, were also clearly mapped on the polytene chromosomes, a fact that further supports the results of the

RT-PCR analysis and suggests that these are bona fide transcripts.

Respective positions of hybridization sites in related species can be compared in order to define chromosome homologies and deduce common evolutionary histories of discrete chromosomal segments. As it has been reported, there is extensive conservation of *B. oleae* chromosomal segments with species not only of the same genus but also of distantly related Diptera (Gariou-Papalexidou et al. 2002; Mavragani-Tsipidou 2002). Direct comparison between *B. oleae* and *C. capitata* was not possible due to the lack of in situ data for the sequences analyzed in the present study. However, information obtained from the FlyBase (Drysdale 2008) allowed inferences about *B. oleae* and *D. melanogaster* chromosomal colinearity through synteny examination of our mapped ESTs and their *Drosophila* orthologs. The respective map positions of 39 genes of the two species (Table 1) are schematically represented in Fig. 4. The

Fig. 4 Schematic comparative representation of *B. oleae* and *D. melanogaster* homologous polytene chromosomes. The numbers correspond to the chromosome divisions. Lines link the relative in situ positions between ortholog genes and attribute the degree of synteny. The centromeres are indicated with open circles. Dotted (gray) lines represent the syntenic comparisons for the inferred potential chromosome correlations between the two species, whereas with solid (orange) lines represent those that do not follow the above hypothesis. Dashed (green) lines represent the relative positions of the cross-linked markers available till now. The exact mapping positions of the eight previously mapped genes are described in Mavragani-Tsipidou (2002)



present comparison confirms the previously reported correlation between the two species complements (Gariou-Papalexiou et al. 2002; Zambetaki et al. 1999) providing direct homologies between I, II, III, IV and V *B. oleae* chromosomes with the X, 3R, 2R, 3L and 3R *D. melanogaster*, respectively. It is evident that 18 of the examined ESTs (dotted lines) and seven of the previously mapped genes (dashed lines) map in the respective chromosomes, which is in agreement with the previously suggested homologies. However, 14 of them (solid lines) were observed to localize at different *Drosophila* chromosome elements, suggesting chromosomal rearrangements during the evolutionary separation of the two species. A similar situation concerning the *hsp70* gene was also reported in *C. capitata* comparative mapping analysis (Gariou-Papalexiou et al. 2002). Such comparisons can also define “syntenic blocks” where orthologous genes are maintained in the same order. For example, the entire area between divisions 95–98 of *B. oleae* chromosome V appears syntenic to the area between divisions 21–25 of *D. melanogaster* chromosome arm 2L (Fig. 4). Moreover, the area between divisions 26–35 of *B. oleae* chromosome II seems syntenic to the area between divisions 25–30 of *D. melanogaster* chromosome 2L. Since the order of genes is maintained in such regions, one can predict the presence of unknown genes within such blocks (Bolshakov et al. 2002; Pringle et al. 2007). Genome mapping of a greater number of ESTs will help accumulate syntenic information, which in turn will offer the opportunity of a better understanding of chromosomal evolution among Diptera.

Codon usage comparisons

Till the present study, 25 *B. oleae* coding sequences were deposited in the GenBank. Among these, only 12 represented unique sequences, corresponding to 5,403 codons, with the remaining referring to different electrophoretic alleles (Goulielmos et al. 2003) or various splice variants of them. The availability of 40,359 amino acids determined from 195 new unique coding sequences from this analysis allowed us to calculate codon frequencies in order to generate a codon usage table for *B. oleae*. The aforementioned 5,403 amino acids of the 12 existing protein sequences were included in this calculation. Comparison with codon frequencies in several other organisms revealed that codon preferences varied not only among the species but also among genes within a single genome (data not shown) and seemed to correlate with evolutionary distance, as has been shown

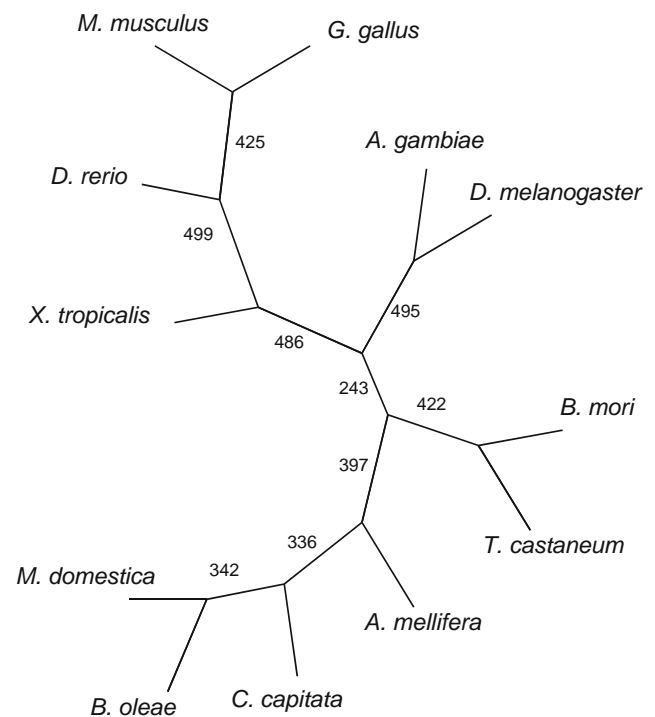


Fig. 5 UPGMA dendrogram based on codon usage frequencies of eukaryotic species. Bootstrap values after 500 resamples are indicated next to the nodes. The topology reflects the evolutionary relationships

previously (Sharp et al. 1995; Duret 2002). The comparison of usage frequencies in a UPGMA evolutionary dendrogram revealed the phylogenetic proximity of *B. oleae* codon usage with its closest relatives *M. domestica* and *C. capitata* indicating a general relationship between the nucleotide content of these species genes (Fig. 5). Divergence of codon usage and choice of optimal codons was also observed as the evolutionary distance between *B. oleae* and the examined organisms increased, suggesting that the overall differences between the genomes are due to differences in gene content and have occurred since their evolutionary divergence. Thus, knowledge of codon usage within and across genes and genomes provides useful insights into molecular and species evolution and can facilitate further applications concerning the improved design of oligonucleotide probes and primers.

Phylogenetic comparisons through EPIC-PCR markers

The provided EST sequence information was used for the development of EPIC-PCR markers in order to analyze intron polymorphisms. Intron sequences can be useful in drawing evolutionary relationships and solving

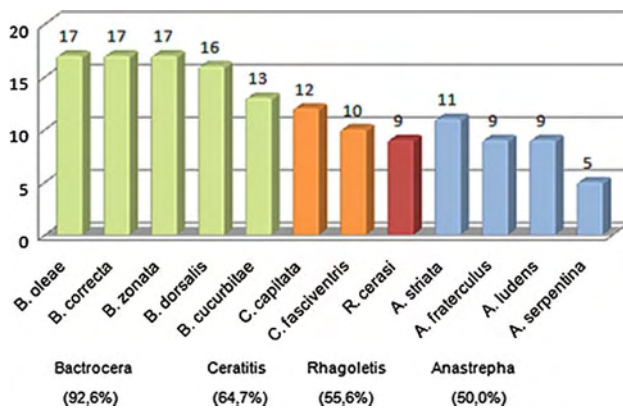


Fig. 6 Amplification efficiency of *B. oleae* EPIC markers in four Tephritidae genera. The numbers indicate the functional primer pairs in each species. The percentages correspond to the mean number of functional primer pairs cross-amplified in each genus, out of the 17 markers that successfully produced amplicons in *B. oleae*

intra genus ambiguities (Rogozin et al. 2002; Palumbi and Baker 1994; Villablanca et al. 1998). Among the 20 developed primer pairs, only three failed to amplify the respective introns in *B. oleae*. This can be attributed either to the primers' ineffectiveness to hybridize to their target or to the difficulty of producing a larger than initially expected PCR product. This latter explanation is not unlikely since the genome of *B. oleae* is estimated larger than that of *D. melanogaster* (Tsoumani et al. unpublished) and its intronic regions were also proven considerably larger (Kakani et al. unpublished). The remaining 17 primer pairs were proven highly conserved and functional across several examined species of the Tephritidae family. The ease with which these marker loci derived from the active transcriptome were amplified from

genomic DNA, as well as that they were functional in most species tested, demonstrates the potential of this approach in phylogenetic comparisons. It should also be mentioned that the occasional length polymorphisms of the amplified intron occurred because of indel formation in intron sequences. However, exon evolution in genetically distant taxa may reduce the conservation of the putative priming sites, resulting in the failure of the annealing of EPIC primers (Zhang and Hewitt 2003).

Previous molecular phylogenetic analyses of *B. oleae* were based mainly on mitochondrial sequences (Han et al. 1994, 1997, 2000). More recently, microsatellite markers analysis has also provided some interesting results (Augustinos et al. 2008). In the present study both the amplification efficiency (Fig. 6) and the topology of the generated trees (Fig. 7) confirm previous phylogenetic reports. The overall amplification efficiency is indicative of the conservation of the generated markers and their high transferability among the different examined genera. Sequencing alignment of the cross-species amplified products showed a closer relationship between *Bactrocera* and *Ceratitis*, while *Anastrepha* and *Rhagoletis* seemed more distantly related. In addition, all the examined species proved to cluster with high bootstrap values to their respective genera. Tree topology, along with amplification efficiencies show that *B. cucurbitae* is more distinctly related to the other *Bactrocera* species. While the present analysis was not designed to constitute a rigorous phylogenetic analysis (since larger sample sizes would be required), it nonetheless demonstrates that the approach provides a useful tool for the clarification of phylogenetic relationships among different species, particularly in cases of closely related complex species.

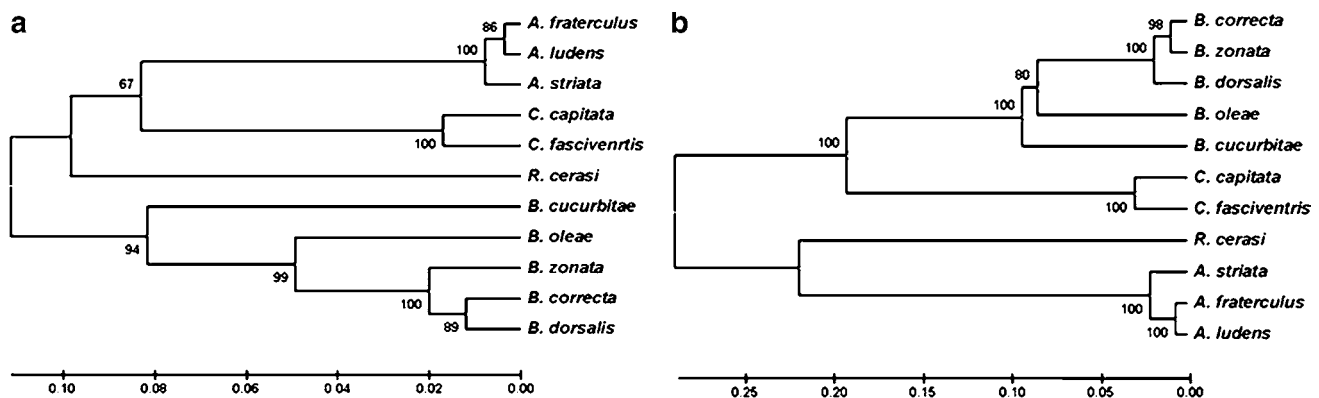


Fig. 7 Phylogenetic relationships among Tephritidae species. NJ trees were based on intron diversity, using the EPIC markers a epicBo149 and b epicBo215. Bootstrap values after 100 bootstrap resamples are indicated next to the nodes

Acknowledgments We thank Dr Komitopoulou at the Biology Department of Athens University (Greece) for the generous gift of the *B. oleae* cDNA library, which was used for the EST isolation. This research was partially supported by the Pythagoras II grant to KDM from the Greek Ministry of National Education and Religious Affairs and the Graduate Programs of the Biochemistry and Biotechnology Department of the University of Thessaly.

References

- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, Merrill CR, Wu A, Olde B, Moreno RF et al (1991) Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252:1651–1656
- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF et al (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25:25–29
- Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD (2002) Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol Ecol Notes* 2:278–280
- Augustinos AA, Mamuris Z, Stratikopoulos E, D'Amelio S, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD (2005) Microsatellite analysis of olive fly populations in the mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* 125:231–241
- Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Drosopoulou E, Kakani EG, Mavragani-Tsapidou P, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD (2008) Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics* 9:618
- Benos P, Tavernarakis N, Brogna S, Thireos G, Savakis C (2000) Acquisition of a potential marker for insect transformation: isolation of a novel alcohol dehydrogenase gene from *Bactrocera oleae* by functional complementation in yeast. *Mol Gen Genet* 263:90–95
- Berrebi P, Retif X, Fang F, Zhang CC (2006) Population structure and systematics of *Opsariichthys bidens* (Osteichthyes: Cyprinidae) in south-east China using a new nuclear marker: the introns (EPIC-PCR). *Biol J Linn Soc Lond* 87:155–166
- Bolshakov VN, Topalis P, Blass C, Kokoza E, della Torre A, Kafatos FC, Louis C (2002) A comparative genomic analysis of two distant diptera, the fruit fly, *Drosophila melanogaster*, and the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genome Res* 12:57–66
- Bulmer M (1991) The selection–mutation–drift theory of synonymous codon usage. *Genetics* 129:897–907
- Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, the AmiGO Hub and the Web Presence Working Group (2009) AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25:288–289
- della Torre A, Favia G, Mariotti G, Coluzzi M, Mathiopoulos KD (1996) Physical map of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Genetics* 143:1307–1311
- Deng Y, Dong Y, Thodima V, Clem RJ, Passarelli LA (2006) Analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the fall armyworm *Spodoptera frugiperda*. *BMC Genomics* 7:264
- Drosopoulou E, Scouras ZG (1995) The beta-tubulin gene family evolution in the *Drosophila montium* subgroup of the *melanogaster* species group. *J Mol Evol* 41(3):293–298
- Drysdale R (2008) FlyBase Consortium 2008 FlyBase: a database for the *Drosophila* Research Community. *Methods Mol Biol* 420:45–59
- Duret L (2002) Evolution of synonymous codon usage in metazoans. *Curr Opin Genetics Dev* 12:640–649
- Economopoulos AP, Zervas GA (1982) Sterile insect technique and radiation in insect control. IAEA-SM-255/39 357–368
- Economopoulos AP, Avtzis N, Zervas G, Tsitsipis J, Haniotakis G, Tsiropoulos G, Manoukas A (1977) Experiments on control of olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by combined effect of insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects. *J Appl Entomol* 83:201–215
- Felsenstein J (1994) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the Author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle
- Fuhrmann M, Hausherr A, Ferbitz L, Schödl T, Heitzer M, Hegemann P (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol* 55:869–881
- Gariou-Papalexiou A, Gourzi P, Delprat A, Kritikou D, Rapti K, Chrysanthakopoulou B, Mintzas A, Zacharopoulou A (2002) Polytene chromosomes as tools in the genetic analysis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genetica* 116:59–71
- Goldman N, Yang Z (1994) A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Mol Biol Evol* 11:725–736
- Gomulski LM, Dimopoulos G, Xi Z, Soares MB, Bonaldo MF, Malacrida AR, Gasperi G (2008) Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Genomics* 9:243
- Goulielmos GN, Cosmidis N, Theodorakopoulou ME, Loukas M, Zouros E (2003) Tracing the history of an enzyme polymorphism: the case of alcohol dehydrogenase-2 (*Adh-2*) of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Mol Biol Evol* 20:293–306
- Han HY (2000) Molecular phylogenetic study of the tribe Trypetini (Diptera: Tephritidae), using mitochondrial 16S ribosomal DNA sequences. *Biochem Sys Ecol* 120:501–513
- Han HY, McPheron BA (1994) Phylogenetic study of selected Tephritid flies (Insecta: Diptera: Tephritidae) using partial sequences of the nuclear 18s ribosomal DNA. *Biochem Sys Ecol* 22:444–457
- Han HY, McPheron BA (1997) Molecular phylogenetic study of tephritidae (insecta: diptera) using partial sequences of the mitochondrial 16S ribosomal DNA. *Mol Phylogenet Evol* 7:17–32
- He M, Haymer DS (1997) Polymorphic intron sequences detected within and between populations of the Oriental fruit fly (Diptera:Tephritidae). *Ann Entom Soc Am* 90:825–831
- He M, Haymer DS (1999) Genetic relationships of populations and the origins of the new infestations of the Mediterranean fruit fly. *Mol Ecol* 8:1247–1257
- Hirosawa M, Nagase T, Murahashi Y, Kikuno R, Ohara O (2001) Identification of novel transcribed sequences on human chromosome 22 by expressed sequence tag mapping. *DNA Res* 8:1–9
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM et al (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298:129–149
- Kakani EG, Ioannides IM, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Skouras PJ, Tsitsipis JA, Mathiopoulos KD (2008) A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 38:781–787
- Khila A, El Haidani A, Vincent A, Payre F, Souda SI (2003) The dual function of *ovo/shavenbaby* in germline and epidermis differentiation is conserved between *Drosophila melanogaster* and the

- olive fruit fly *Bactrocera oleae*. Insect Biochem Mol Biol 33:691–699
- Koukidou M, Klinakis A, Reboulakis C, Zagoraiou L, Tavernarakis N, Livadaras I, Economopoulos A, Savakis C (2006) Germ line transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transgenesis marker. Insect Mol Biol 15:95–103
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) MEGA 3: integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis sequence alignment. Brief Bioinform 5:150–163
- Lagos D, Ruiz FM, Sánchez L, Komitopoulou K (2005) Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster*. Gene 348:111–121
- Lagos D, Koukidou M, Savakis C, Komitopoulou K (2007) The *transformer* gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. Insect Mol Biol 16:221–230
- Mavragani-Tsipidou P (2002) Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). Genetica 116:45–57
- Mavragani-Tsipidou P, Karamanlidou G, Zacharopoulou A, Koliais S, Kastritis C (1992) Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). Genome 35(3):373–378
- Mazomenos BE (1989) *Dacus oleae*. In: Robinson AS, Hooper G (eds) World crop pests. Vol.3B. Elsevier BV, Amsterdam, pp 169–177
- Montiel Bueno A, Jones O (2002) Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. IOBC wprs Bull 25:1–11
- Nam KD, Lee S, Zhou G, Clark T, Chen J, Rowley JD, Wang SM (2002) Oligo(dT) primer generates a high frequency of truncated cDNAs through internal poly(A) priming during reverse transcription. PNAS 99(9):6152–6156
- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F (2005) Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). Mol Ecol 14:2729–2738
- Page RDM (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comput Appl Biosci 12:357–358
- Palumbi SR, Baker CS (1994) Contrasting population structure from nuclear intron sequences and mtDNA of humpback whales. Mol Biol Evol 11:426–435
- Papanicolaou A, Joron M, Mcmillan WO, Blaxter ML, Jiggins CD (2005) Genomic tools and cDNA derived markers for butterflies. Mol Ecol 14:2883–2897
- Pringle EG, Baxter SW, Webster CL, Papanicolaou A, Chris Lee SF, Jiggins CD D (2007) Synteny and chromosome evolution in the Lepidoptera: evidence from mapping in *Heliconius melpomene*. Genetics 177:417–426
- Rogozin IB, Sverdlov AV, Babenko VN, Koonin EV (2002) Analysis of evolution of exon–intron structure of eukaryotic genes. Brief Bioinform 6:18–134
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual. ed. 2 Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Sharp PM, Averof M, Lloyd AT, Matassi G, Peden JF (1995) DNA sequence evolution: the sounds of silence. Philos Trans R Soc Lond Ser B 349:241–247
- The Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. Nature 443:931–949
- Villablanca FX, Roderick GK, Palumbi SR (1998) Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. Mol Ecol 7:547–560
- Whitfield CW, Band MR, Bonaldo MF, Kumar CG, Liu L, Pardinas JR, Robertson HM, Soares MB, Robinson GE (2002) Annotated expressed sequence tags and cDNA microarrays for studies of brain and behavior in the honey bee. Genome Res 12:555–566
- Zambetaki A, Kleantous K, Mavragani-Tsipidou P (1995) Cytogenetic analysis of malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). Genome 38:1070–1081
- Zambetaki A, Zacharopoulou A, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P (1999) The genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: localization of molecular markers by in situ hybridization to salivary gland polytene chromosomes. Genome 42:740–751
- Zhang D-X, Hewitt GM (2003) Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. Mol Ecol 12:563–584
- Zygouridis NE, Augustinos AA, Zalom FG, Mathiopoulos KD (2009) Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. Heredity 102:402–412

ORIGINAL CONTRIBUTION

Genome size estimation with quantitative real-time PCR in two Tephritidae species: *Ceratitis capitata* and *Bactrocera oleae*

K. T. Tsoumani & K. D. Mathiopoulos

Department of Biochemistry and Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

Keywords*Bactrocera oleae*, *Ceratitis capitata*, Diptera, genome size, quantitative real-time PCR**Correspondence**K. D. Mathiopoulos (corresponding author),
Department of Biochemistry and
Biotechnology, University of Thessaly,
Ploutonos 26, Larissa 41221, Greece.
E-mail: kmathiop@bio.uth.grReceived: June 10, 2011; accepted:
September 26, 2011.

doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01684.x

Abstract

The medfly *Ceratitis capitata* and the olive fruit fly *Bactrocera oleae* belong to the Tephritidae family of Diptera, a family whose members cause severe damages in agriculture worldwide. For such insect pests, the utmost concern is their population control. The sterile insect technique (SIT) has been used in the Tephritidae family with varying degrees of success. Its efficient use usually depends on the development of genetic sexing strains and the release of only male flies. However, such advances are based on modern genetic, molecular and genomic tools. The medfly is clearly the prototype of the family, since such tools have advanced considerably, which has resulted in effective SIT efforts around the world. A whole-genome sequencing project of this insect is already underway. In contrast, similar tools in the olive fly lag behind, even though the insect is considered a promising candidate for a next SIT target. An accurate estimate of genome size provides a preliminary view of genome complexity and indicates possible difficulties in genome assembly in whole-genome projects. Taking advantage of a quantitative real-time PCR approach, we determined the genome size of these two species *C. capitata* and *B. oleae* as 591 Mb (CI range: 577–605 Mb) and 322 Mb (CI range: 310–334 Mb) respectively.

Introduction

In recent years, the field of molecular entomology has been revolutionized by the rapid development of massive sequencing techniques. Because of their agricultural, economic and health importance or of their being model species, over seventy insect genomes are in the process of being sequenced or have already been sequenced (NCBI Genome list: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>). Their genomes come in a wide variety of sizes. Interestingly, the insect genome size-range of all sequenced species so far can be represented by the size-range observed within a single order, the diptera order: till today, *Drosophila* species represent the lower limit [120 Mb, (0.14 pg), (Gregory 2011)] while *Aedes aegypti*, the upper (1374 Mb, Severson et al. 2004). Furthermore, highly diverse genome sizes have also been observed

even within species of the same family, as happens in the case of *Anopheles gambiae* (278 Mb) and *A. aegypti* (1374 Mb) (Severson et al. 2004). This may not be a surprise, however, given the evolutionary distances found within the family of mosquitoes (Culicidae) with probable divergence time of at least 95 million years (Krzywinski et al. 2001). Similar observations have also been obtained comparing genome sizes within the same subgroup, as reported for species of the *Drosophila melanogaster* subgroup (Boulesteix et al. 2006; Gregory and Johnston 2008), which diverged from their most recent common ancestor 10–15 Myr (million years ago) (Lachaise and Silvai 2004).

The Tephritidae family of Diptera includes the most important agricultural pests of fruits and vegetables, whose control is primarily based on chemical pesticide use (White and Elson-Harris 1994). Their great impact on agriculture and, consequently, the

human economy has led to an active search for more effective and environmentally friendly methods of management and biological control.

Beyond doubt, the medfly, *Ceratitis capitata*, is the best studied member of the family. The medfly is a cosmopolitan pest, affecting more than 350 different fruits and vegetables around the world (Fletcher 1989). Its genetics is highly developed (Gourzi et al. 2000; Gariou-Papalexiou et al. 2002; Robinson 2002; Stratikopoulos et al. 2008), an extensive list of ESTs is available (Gomulski et al. 2008), its genetic transformation has been achieved (Loukeris et al. 1995) and, currently, its genome is being analysed (as reported in the NCBI Genome list: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>). All these achievements have clearly facilitated the development of sexing strains, a prerequisite for the efficient application of a sterile insect technique (SIT) approach to insect control (Robinson 2002, 2005; Franz 2005). On the other hand, the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, is a very specialized insect pest, associated exclusively with the olive fruit, causing extensive damages in the olive production in all olive-producing countries (Mazomenos 1989). Contrary to the medfly, its genetics and genomics is relatively poorly developed, a fact that has hindered the development of effective SIT-based approaches to its control (Economopoulos et al. 1977). However, recent advances in particular gene systems (Lagos et al. 2005, 2007; Vontas et al. 2002; Kakani et al. 2008, 2011), cytogenetics (for a review see Mavragani-Tsipidou 2002), population structure (Augustinos et al. 2005; Nardi et al. 2005, Nardi et al., 2010; Zygouridis et al. 2009), genetic transformation (Koukidou et al. 2006) and EST markers (Tsoumani et al. 2011), give promise that alternative control approaches may soon be developed.

Measure of genome size and thus a preliminary view of genome complexity provide useful information prior to large-scale sequencing efforts. Taking advantage of a quantitative real-time PCR (qRT-PCR) approach for the estimation of genome sizes (Wilhelm et al. 2003; Gao and Scott 2006), we determined the genome size of these two Tephritidae species, *C. capitata* and *B. oleae*. Additionally, the genome size of *D. melanogaster* was also estimated alongside, to certify the accuracy of the approach.

Results and Discussion

The real-time PCR method for the determination of genome size provides both reliable and fast results

(Wilhelm et al. 2003; Gao and Scott 2006). Therefore, it was considered as the most applicable approach to obtain an accurate estimate of the genome size of the two Tephritidae species analysed in this report. The DNA content of each haploid genome in picograms (presented as C) was calculated by the absolute quantification of a single-copy gene in a genomic sample. More specifically, the corresponding target sequence for each primer pair was amplified in a genomic template by conventional PCR and subsequently cloned in order to be used in the real-time PCR as standard. According to the length of the cloned amplicon and its concentration (as determined by UV-absorbance measurements), we were able to determine the number of copies of each standard in a given dilution series, which was used to generate the standard curve. The standard curve provides a functional relationship between measured C_t values and target gene copy number. By interpolating the C_t value of the unknown genomic DNA samples against the generated standard curve, it was feasible to calculate the absolute initial concentrations of copies of the genomic template used in the real-time PCR and therefore to determine the genome size in base pairs (Γ).

From the qPCR assay conducted in this analysis, five independent experiments were performed for each organism. The amplification efficiency of the target sequences from standards and unknowns was estimated by performing four log₁₀-fold dilutions of the standard and genomic DNA (1 ng–1 pg/reaction) for each gene to determine the PCR efficiency. The estimates of all reactions fell within the generally accepted optimal range of 90–105% for the amplification efficiency (data not shown). The copy number from the qPCR assay was estimated as the average of the triplicate determinations of the unknowns. Subsequently, the overall mean estimation of the genome size at a confidence level 95% was calculated as the average of five different experiments. Thus, the genome sizes were determined to be 591 Mb (CI range: 577–605 Mb) for *C. capitata* and 322 Mb (CI range: 310–334 Mb) for *B. oleae*. There has never been an estimate of *B. oleae* genome size before, whereas unpublished data report that the *C. capitata* genome size is nearly 540 Mb (as cited in Gomulski et al. 2008). The genome size of *D. melanogaster* was included in our estimates as control for the validation of the conducted experimental procedure. The estimated *D. melanogaster* genome size in this analysis was 194 Mb (CI range: 183–205 Mb), which is close to previously published values (~180 Mb) (Adams et al. 2000).

Searching the NCBI Genome Project database for other insect sequenced genomes, it becomes clear that insect genome sizes range variably. In general, larger genomes are estimated to have larger regions of heterochromatin (Petrov 2001). However, no correlation has been attributed between genome size and total gene number. The genome size evolution is affected by a combined interaction of several forces resulting in either expansion or contraction of genome size. Such forces include mutational mechanisms (such as transposition, spontaneous indels and genome duplications), which produce pressure for the change. If a phenotype is affected, then natural selection is undergone, whereas negligible selective effects are governed by genetic drift (for reviews see Hartl 2000; Petrov 2001, 2002). In insects, comparative genome analysis between several genera or even closely related species revealed a positive correlation between the average size of introns, intergenic regions and exons with genome size (Moriyama et al. 1998; Zdobnov et al. 2002; Schlötterer and Harr 2000). Genome size changes have also been positively associated with the copy number of transposable elements and repeated sequences (Petrov 2001; Kidwell 2002; Boulesteix et al. 2006). The variation of such repeats in heterochromatin content and their interspersed pattern demonstrate the observed size divergence even at intraspecific level (Bosco et al. 2007).

Both closely related Tephritidae species included in this analysis have similar chromosome complements, consisting of five autosome pairs and a pair of sex chromosomes (Mavragani-Tsipidou 2002; Zacharopoulou 1987). Although homologies between polytene chromosomal segments of both species have already been assigned (Zambetaki et al. 1999) and cytogenetic maps have been constructed (for revised maps see Stratikopoulos et al. 2008; Tsoumani et al. 2011), it is still necessary to generate denser and therefore more informative genetic maps for interspecies comparisons. Differences in structure of intergenic regions and introns, which have been demonstrated in previous cross-species analyses of microsatellite and EPIC markers (Augustinos et al. 2008; Stratikopoulos et al. 2009; Tsoumani et al. 2011), as well as identified species-specific repeats (Stratikopoulos et al. 2002; Tsoumani unpublished data) are factors contributing to their different genome structure. Thus, the observed differences in their genome size reflect the considerable chromosomal reorganization and the variation in their repetitive DNA during their evolutionary divergence.

Further genomic information on these two organisms through a genome project would give a new prospect in insect comparative studies, designating the common and distinct features of the species that shape genome structure and evolution. But above all, it will provide significant sources of molecular tools to develop effective control strategies and novel management options.

Experimental Procedures

DNA isolation

Bactrocera oleae and *C. capitata* genomic DNA was extracted from adult flies of the 'Demokritos' and 'Benakeion' strains, respectively, maintained in our laboratory. The Canton-S (Canton Special) wild-type strain of *D. melanogaster* was used as a source for the *Drosophila* DNA. DNA was extracted as described by Ashburner (1989).

Oligonucleotide primers

The primer sets were selected to amplify a single-copy gene for each species. Three primer sets were used specific for *B. oleae* acetylcholinesterase (*ace*) (Vontas et al. 2002), *C. capitata* heat-shock 83 (*hsp83*) (Theodoraki and Mintzas 2006) and *D. melanogaster* glucose-6 phosphate dehydrogenase (*g6pd*) (Ganguly et al. 1985), respectively (Table 1). The primer set for *g6pd* was designed using Omega software (Oxford Molecular, Oxford, UK), according to database-deposited sequences. The other two primer sets were retrieved from previous studies (Theodoraki and Mintzas 2006; Kakani et al. 2008).

Amplification and cloning of target genes

Target regions of each PCR primer pair were cloned in order to be used as quantitative standards. Conventional PCR amplification was carried out in a 20- μ l reaction volume using 20 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl₂, 1 \times PCR buffer, 1 unit Taq DNA polymerase (Bioline, Taunton, MA, USA), 0.4 pmol of each forward and reverse primers and 0.8 mM dNTPs. The PCR amplification profile consisted of a first 4 min DNA denaturation step at 95°C, followed by 29 cycles of denaturation for 30 s at 95°C, primer annealing at 60°C for 15 s (Table 1) and extension at 72°C for 15 s. An additional final extension step at 72°C for 5 min was included. PCR products were detected in 1% agarose gels stained with ethidium bromide (0.5 μ g/ml). Subsequently, products were

Organism	Primer	Sequence 5' → 3'	Target gene	Size (bp)
<i>Bactrocera oleae</i>	Boace2F	TTCGCGTCAATACAGTGTCTG	<i>ace</i>	315
	Boace2R	CTTTCTTGACACAGGTTGC		
<i>Ceratitis capitata</i>	Hsp83 F1	GTCTGAAGAAGTGAAACCTTCGC	<i>hsp83</i>	319
	Hsp83 R1	CCATGAATGCTTTAGTGCCGG		
<i>Drosophila melanogaster</i>	Zw F	TCGGCAACAAGATCCTCAGC	<i>g6pd</i>	147
	Zw R	AGCAGATGGTTCTGCATCACG		

Table 1 Sequences of primers and target regions

gel-eluted using Wizard1 SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison WI, USA) according to the suppliers' manuals. The purified amplicons were cloned to plasmid vector pBlueScript-SK(+) using the TA cloning system (Sambrook et al. 1989). The recombinant plasmid DNA was propagated and isolated from competent cells of *E. coli* DH5 α with the use of the Promega Wizard *Plus* Minipreps DNA Purification System. The final concentration of each standard plasmid was estimated spectrophotometrically as the average of three independent absorbance measurements at 260 nm with a UV/Vis spectrophotometer (Eppendorf Biophotometer). The purity was considered acceptable when the ratio A_{260}/A_{280} was between 1.8 and 2.0. One A_{260} unit was assigned to correspond to a DNA concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$.

Construction of standard curves

A four-point standard curve was generated from 10- or 20-fold serial dilutions of the recombinant plasmids. Dilution concentrations were converted to a copy number value based on the molecular weight of the standard plasmid used. The standard curve was plotted with the threshold cycle (C_t) values of the serially diluted DNA against the logarithm of copies per microlitre of the initial target concentration.

Real-time qPCR using SYBR Green I dye

The quantification of the amount of a target sequence in a genomic DNA sample was performed with the use of real-time PCR. Quantitative real-time PCR was undertaken using the KAPATM SYBR[®] Green FAST qPCR kit (Kapa Biosystems, Woburn, MA, USA) and the Mx3005P spectrofluorometric thermal cycler operated by the MxProTM PCR software (Stratagene, Santa Clara, CA, USA). Each PCR was carried out using as template either cloned PCR amplicons (standards) or genomic DNA for one target (unknowns). The series of standards ranged between 10^3 and 10^7 copies of standard DNA. The

genomic samples were determined by three replicates in each experiment. No template control was also included in each experimental run as negative control to verify that no reagent contamination had occurred by the target DNA.

PCR was performed in a total volume of 20 μl consisting of 1 μl of template DNA (~ 100 ng), 150 nM of each primer and 1 \times of qPCR master mix. The thermal cycling conditions were as follows: initial denaturation for 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 10 s at 95°C, 10 s at 60°C and 10 s at 72°C. The fluorescence signal for SYBR Green I dye was automatically measured for both standards and unknowns at the end of each extension step at 72°C in the same run. At the end of each PCR assay, a melting curve ramp in the default thermal profile was performed to control the amplification specificity. The PCR products were further confirmed by electrophoresis. The real-time qPCR testing was conducted five times overall per organism.

Calculation of the genome size

The number of base pairs per haploid genome is reported as genome size (Γ) and was calculated using the following equation (Wilhelm et al. 2003):

$$\Gamma = \frac{C \times N_A}{M_{Bp}}$$

Where N_A is Avogadro's number ($6.022 \times 10^{23}/\text{mol}$) and M_{Bp} is the average mass of a base pair (660 g/mol). The amount of DNA (C) is given by $C = m \times N^{-1}$, which is the ratio of the template DNA mass (m) as determined by UV-absorbance measurements and the copy number (N) of the target sequence as quantified by real-time PCR.

References

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG et al., 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287, 2185–2195.

- Ashburner M, 1989. *Drosophila: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Augustinos AA, Mamuris Z, Stratikopoulos E, D'Amelio S, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD, 2005. Microsatellite analysis of olive fly populations in the mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* 125, 231–241.
- Augustinos AA, Stratikopoulos EE, Drosopoulou E, Kakani EG, Mavragani-Tsipidou P, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD, 2008. Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family. *BMC Genomics* 9, 618.
- Bosco G, Campbell P, Leiva-Neto JT, Markow TA, 2007. Analysis of *Drosophila* species genome size and satellite DNA content reveals significant differences among strains as well as between species. *Genetics* 177, 1277–1290.
- Boulesteix M, Weiss M, Biéumont C, 2006. Differences in genome size between closely related species: the *Drosophila melanogaster* species subgroup. *Mol. Biol. Evol.* 23, 162–167.
- Economopoulos AP, Avtzis N, Zervas G, Tsitsipis J, Haniotakis G, Tsiropoulos G, Manoukas A, 1977. Experiments on control of olive fly, *Dacus oleae* (Gmelin), by combined effect of insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects. *J. Appl. Entomol.* 83, 201–215.
- Fletcher BS, 1989. Life history strategies of tephritid fruit flies. In: *Fruit flies, their biology, natural enemies and control*, vol 3B. Ed. by Robinson AS, Hooper G, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 195–208.
- Franz G, 2005. Genetic sexing strains in Mediterranean fruit fly, an example for other species amenable to large-scale rearing for the sterile insect technique. In: *Sterile insect technique: principles and practice in area wide integrated management*. Ed. by Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, Springer, Netherlands, 427–452.
- Ganguly R, Ganguly N, Manning JE, 1985. Isolation and characterization of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 35, 91–101.
- Gao J, Scott JG, 2006. Use of quantitative real-time polymerase chain reaction to estimate the size of the house-fly *Musca domestica*. *Insect Mol. Biol.* 15, 835–837.
- Gariou-Papalexioy A, Gourzi P, Delprat A, Kritikou D, Rapti K, Chrysanthakopoulou B, Mintzas A, Zacharopoulou A, 2002. Polytene chromosomes as tools in the genetic analysis of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Genetica* 116, 59–71.
- Gomulski LM, Dimopoulos G, Xi Z, Soares MB, Bonaldo MF, Malacrida AR, Gasperi G, 2008. Gene discovery in an invasive tephritid model pest species, the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *BMC Genomics* 23, 243.
- Gourzi P, Gubb D, Livadaras Y, Caceres C, Franz G, Savakis C, Zacharopoulou A, 2000. The construction of the first balancer chromosome for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Mol. Gen. Genet.* 264, 127–136.
- Gregory TR, 2011. Animal genome size database. <http://www.genomesize.com>.
- Gregory TR, Johnston JS, 2008. Genome size diversity in the family Drosophilidae. *Heredity* 101, 228–238.
- Hartl DL, 2000. Molecular melodies in high and low C. *Nat. Rev. Genet.* 1, 145–149.
- Kakani EG, Ioannides IM, Margaritopoulos JT, Seraphides NA, Skouras PJ, Tsitsipis JA, Mathiopoulos KD, 2008. A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 781–787.
- Kakani EG, Bon S, Massoulié J, Mathiopoulos KD, 2011. Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance to organophosphate insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 3, 150–158.
- Kidwell MG, 2002. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115, 49–63.
- Koukidou M, Klinakis A, Reboulakis C, Zagoraiou L, Tavernarakis N, Livadaras I, Economopoulos A, Savakis C, 2006. Germ line transformation of the olive fly *Bactrocera oleae* using a versatile transgenesis marker. *Insect Mol. Biol.* 15, 95–103.
- Krzywinski J, Wilkerson RC, Besansky NJ, 2001. Toward understanding *Anophelinae* (Diptera, Culicidae) phylogeny: insights from nuclear single-copy genes and weight of evidence. *Syst. Biol.* 50, 540–556.
- Lachaise D, Silvai JF, 2004. How two Afrotropical endemics made two cosmopolitan human commensals: the *Drosophila melanogaster*-*D. simulans* palaeogeographic riddle. *Genetica* 120, 17–39.
- Lagos D, Ruiz FM, Sánchez L, Komitopoulou K, 2005. Isolation and characterization of the *Bactrocera oleae* genes orthologous to the sex determining *Sex-lethal* and *doublesex* genes of *Drosophila melanogaster*. *Gene* 348, 111–121.
- Lagos D, Koukidou M, Savakis C, Komitopoulou K, 2007. The *transformer* gene in *Bactrocera oleae*: the genetic switch that determines its sex fate. *Insect Mol. Biol.* 16, 221–230.
- Loukeris TG, Livadaras I, Arca B, Savakis C, 1995. Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, using a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* 270, 2002–2005.
- Mavragani-Tsipidou P, 2002. Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit Xy *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica* 116, 45–57.
- Mazomenos BE, 1989. *Dacus oleae*. In: *World crop pests volume 3B*. Ed. by Robinson AS, Hooper G, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 169–177.
- Moriyama EN, Petrov DA, Hartl DL, 1998. Genome size and intron size in *Drosophila*. *Mol. Biol. Evol.* 15, 770–773.

- Nardi F, Carapelli A, Dallai R, Roderick GK, Frati F, 2005. Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Mol. Ecol.* 14, 2729–2738.
- Nardi F, Carapelli A, Boore JL, Roderick GK, Dallai R, Frati F, 2010. Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: comparative dating using complete mitochondrial genomes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 57, 678–686.
- Petrov DA, 2001. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends Genet.* 17, 23–28.
- Petrov DA, 2002. Mutational equilibrium model of genome size evolution. *Theor. Popul. Biol.* 61, 531–544.
- Robinson AS, 2002. Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitidis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica* 116, 5–13.
- Robinson AS, 2005. Genetic basis of the sterile insect technique. In: *Sterile insect technique: principles and practice in area-wide integrated management*. Ed. by Dyck VA, Hendrichs J, Robinson AS, Springer, Netherlands, 95–114.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schlötterer C, Harr B, 2000. *Drosophila virilis* has long and highly polymorphic microsatellites. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1641–1646.
- Severson DW, DeBruyn B, Lovin DD, Brown SE, Knudson DL, Morlais I, 2004. Comparative genome analysis of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* with *Drosophila melanogaster* and the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*. *J. Hered.* 95, 103–113.
- Stratikopoulos EE, Augustinos AA, Gariou-Papalexioiu A, Zacharopoulou A, Mathiopoulos KD, 2002. Identification and partial characterization of a new *Ceratitidis capitata*-specific 44-bp pericentromeric repeat. *Chromosome Res.* 10, 287–295.
- Stratikopoulos EE, Augustinos AA, Petalas YG, Vrahatis MN, Mintzas A, Mathiopoulos KD, Zacharopoulou A, 2008. An integrated genetic and cytogenetic map for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*, based on microsatellite and morphological markers. *Genetica* 133, 147–157.
- Stratikopoulos EE, Augustinos AA, Pavlopoulos ID, Economou KP, Mintzas A, Mathiopoulos KD, Zacharopoulou A, 2009. Isolation and characterization of microsatellite markers from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitidis capitata*: cross-species amplification in other Tephritidae species reveals a varying degree of transferability. *Mol. Genet. Genomics* 282, 283–306.
- Theodoraki MA, Mintzas AC, 2006. cDNA cloning, heat shock regulation and developmental expression of the hsp83 gene in the Mediterranean fruit fly *Ceratitidis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 15, 839–852.
- Tsoumani KT, Augustinos AA, Kakani EG, Drosopoulou E, Mavragani-Tsipidou P, Mathiopoulos KD, 2011. Isolation, annotation and applications of expressed sequence tags from the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol. Genet. Genomics* 285, 33–45.
- Vontas JG, Hejazi MJ, Hawkes NJ, Cosmidis N, Loukas M, Janes RW, Hemingway J, 2002. Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Mol. Biol.* 4, 329–336.
- White IM, Elson-Harris MM, 1994. *Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics*. CAB International & ACIAR, Wallingford.
- Wilhelm J, Pingoud A, Hahn M, 2003. Real-time PCR-based method for the estimation of genome sizes. *Nucleic Acids Res.* 31, e56.
- Zacharopoulou A, 1987. Cytogenetical analysis of mitotic and salivary gland chromosomes in the Medfly *Ceratitidis capitata*. *Genome* 29, 67–71.
- Zambetaki A, Zacharopoulou A, Scouras ZG, Mavragani-Tsipidou P, 1999. The genome of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*: localization of molecular markers by in situ hybridization to salivary gland polytene chromosomes. *Genome* 42, 740–751.
- Zdobnov EM, von-Mering C, Letunic I, Lorrens D, Suyama M, Copley RR, Christophides GK, Thomasova D, Holt RA, Subramanian GM, Mueller HM, Dimopoulos G, Law JH, Wells MA, Birney E, Charlab R, Halpern AL, Kokoza E, Kraft CL, Lai Z, Lewis S, Louis C, Barillas-Mury C, Nusskern D, Rubin GM, Salzberg SL, Sutton GG, Topalis P, Wides R, Wincker P, Yandell M, Collins FH, Ribeiro J, Gelbart WM, Kafatos FC, Bork P, 2002. Comparative genome and proteome analysis of *Anopheles gambiae* and *Drosophila melanogaster*. *Science* 298, 149–159.
- Zygoridis NE, Augustinos AA, Zalom FG, Mathiopoulos KD, 2009. Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity* 102, 402–412.

