

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΣΤ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ ΤΗΣ
ΕΛΙΑΣ, *Bactrocera oleae*.»

ΚΑΚΑΝΗ ΕΥΔΟΞΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2004

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«ΑΝΑΛΥΣΗ ΕΣΤ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΟ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΟ ΠΑΡΑΣΙΤΟ ΤΗΣ
ΕΛΙΑΣ, *Bactrocera oleae*.»

ΚΑΚΑΝΗ ΕΥΔΟΞΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ 2004



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

Αριθ. Εισ.: 4070/1

Ημερ. Εισ.: 03-11-2004

Δωρεά: _____

Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2004

ΚΑΚ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000075131

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
Η καλλιέργεια της ελιάς.....	1
1. Ο δάκος της ελιάς.....	2
1.1 Μορφολογία.....	2
1.2 Βιολογικός κύκλος.....	3
1.3 Προκαλούμενη ζημιά.....	4
1.4 Καταπολέμηση.....	5
1.5 Μοριακές και γενετικές μελέτες στο δάκο.....	6
2. Πολυταινικά χρωμοσώματα.....	8
3. Χάρτες χρωμοσωμάτων.....	11
4. Γενετικοί δείκτες.....	13
5. Expressed sequence tags.....	14
Σκοπός.....	16
ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ	17
1. cDNA βιβλιοθήκη.....	17
2. Ανάπτυξη βακτηριακού στελέχους XL1-Blue MRF'.....	18
3. Τιτλοδότηση και επίστρωση μολυσμένων κυττάρων με φάγους.....	20
4. In vivo εκτομή ενθέματος από φορέα λΖΑΡ.....	21
5. Έκλουση σωματιδίων φάγου.....	23
6. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια.....	24
7. Πέψη πλασμιδιακού DNA με ένζυμο περιορισμού.....	26
8. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης.....	28
9. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	30
10. Καθαρισμός μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	32
11. Προσδιορισμός της πρωτοδιάταξης του DNA.....	33
12. Ανάλυση αποτελεσμάτων.....	34
13. Κατασκευή πολυταινικών χρωμοσωμικών παρασκευασμάτων.....	34
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	36
1. Συλλογή ενθεμάτων.....	36
1.1 Απομόνωση φαγεμιδίου.....	36
1.2 Ενίσχυση με PCR των ενθεμάτων.....	37
2. Ανάλυση της πρωτοδιάταξης των συλλεχθέντων ενθεμάτων.....	38
3. Πολυταινικά χρωμοσώματα.....	40
ΣΥΖΗΤΗΣΗ	43
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	46

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ



Η φυσιογνωμία των λαών και των κοινωνιών πλάθεται, εκτός των άλλων, και μέσα από τον διάλογό τους με τον φυσικό χώρο που τους περιβάλλει. Για τους Έλληνες και τους άλλους Μεσογειακούς λαούς, αν θα έπρεπε να κατονομάσουμε ένα χαρακτηριστικό της οικείας σ' αυτούς φύσης, ένα καρποφόρο δέντρο που επέδρασε και επιδρά όχι μόνο στην κοινωνική και οικονομική πραγματικότητα αλλά και στο πεδίο της λατρευτικής τους πρακτικής, των δοξασιών και των εθίμων, την πρώτη θέση κατέχει αναμφισβήτητα, η ελιά.

Η ελιά ευδοκίμει σχεδόν αποκλειστικά στη λεκάνη της Μεσογείου και ο τρόπος καλλιέργειάς της αποτελεί βασικό παράγοντα διατήρησης του οικοσυστήματος. Ζει και προσφέρει καρπούς για αιώνες καθώς καλλιεργείται σε κάθε έδαφος και απαιτεί ελάχιστη περιποίηση. Αξιοποιείται πλήρως, ως καρπός, φύλλωμα και ξύλο, συμβάλλει στην αποτροπή της διάβρωσης σε περιοχές με οξυμένο το φαινόμενο της ερημοποίησης και αποτελεί πρωταρχικό παράγοντα ανάπτυξης περιοχών με σοβαρά προβλήματα απασχόλησης και συνοχής.

Σήμερα, υπάρχουν στην Ελλάδα 150.000.000 περίπου ελαιόδεντρα, λειτουργούν 2.800 ελαιοτριβεία και 500.000 οικογένειες ζουν από την καλλιέργεια της ελιάς αφού σε αρκετές -κυρίως άγονες- περιοχές το ελαιόλαδο αποτελεί το αποκλειστικό εισόδημα των κατοίκων (επιμελητήριο Μεσσηνίας, RIPE 2003). Η ευρωστία και η παραγωγικότητα της ελιάς όμως μπορούν να διαταραχθούν από ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών που προσβάλλουν το φυτό ή από τη δράση παρασίτων και εντόμων. Οι ασθένειες έχουν προέλευση κυρίως μυκητολογική. Η μόνη βακτηριακή πάθηση είναι ο καρκίνος της ελιάς. Οι εχθροί της ελιάς είναι κυρίως έντομα όπως ο πυρηνοτρήτης (*Prays oleae*), ο οποίος προκαλεί ζημιές στα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς, ο θρίπας (*Liothrips oleae*) ο οποίος προσβάλλει τους βλαστούς και τα φύλλα και πολλές φορές προκαλεί ανθόρροια, παραμόρφωση καρπών και πτώση τους ή η μαργαρόνια

(*Palpita unionalis*), η οποία προσβάλλει τα φύλλα. Ο σημαντικότερος όμως εχθρός παραμένει ο δάκος (*Bactrocera oleae*).

1. Ο ΔΑΚΟΣ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (Gmelin) (στο παρελθόν *Dacus oleae*), αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά και ιδιαίτερα καταστρεπτικό γεωργικό έντομο της χώρας μας, προκαλώντας την πιο διαδεδομένη οικονομική ζημία στις καλλιέργειες της ελιάς. Η ζημία που προκαλείται από το συγκεκριμένο έντομο οδηγεί σε απώλεια περίπου 30% της συγκομιδής ελιών, ιδιαίτερα στις Μεσογειακές χώρες. Αυτό σχετίζεται άμεσα με το γεγονός ότι ο δάκος είναι μονοφάγος, τρεφόμενος αποκλειστικά με τον ελαιόκαρπο. Η πρώτη εμφάνισή του καταγράφεται τον 3^ο αιώνα π.Χ. στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου όπου συναντάται και σήμερα. Ακόμη βρίσκεται στην Αφρική, τα Κανάρια Νησιά και τη Μέση Ανατολή, ενώ πρόσφατα εντοπίστηκε (1998) και στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α. (Rice, 2000). Είναι μάλιστα αποδεκτό μεταξύ των ερευνητών πως το έντομο αυτό μπορεί να επιβιώσει και να αναπτυχθεί σε οποιαδήποτε περιοχή του κόσμου υπάρχουν ελιές, άγριες ή ήμερες.

1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ

Ο δάκος της ελιάς ανήκει ταξινομικά στην οικογένεια Tephritidae των Δίπτερων, μέλη της οποίας είναι επίσης η Μεσογειακή μύγα (*Ceratitis capitata*), η μύγα των κερασιών (*Rhagoletis cingulata*), η μύγα των μήλων (*Rhagoletis pomonella*) και πολλά άλλα έντομα (Romoser et al., 1998). Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει τις λεγόμενες "μύγες των φρούτων" ("fruit flies"), οι οποίες χαρακτηρίζουν εκείνες τις μύγες που εναποθέτουν τα αυγά τους στα ώριμα ή ανώριμα φρούτα έτσι ώστε οι προνύμφες τους αναπτύσσονται μέσα σε αυτά καθιστώντας τα μη εμπορεύσιμα.



Εικόνα 1 : Ενήλικο άτομο *B.oleae*

Η μύγα της ελιάς είναι ένα από τα μικρότερα είδη στο γένος. Το ενήλικο θηλυκό έχει περίπου 5mm μήκος και έκταση φτερών 10mm. Η κεφαλή έχει ανοιχτό καστανό χρώμα και οι σύνθετοι οφθαλμοί πρασινωπές μεταλλικές ανταύγειες. Ο θώρακας χαρακτηρίζεται από μαύρο χρώμα με μία αργυροειδή ραχιαία επιφάνεια κατά μήκος

Εικόνα 2 : Σχηματική αναπαράσταση του δάκου



της οποίας υπάρχουν 3 στενές παράλληλες μαύρες γραμμές. Η κοιλία έχει χρώμα καστανό ενώ οι βραχίονες και μία περιοχή πάνω και κάτω από τη βάση των φτερών είναι κίτρινοι. Τα φτερά είναι συνήθως διαφανή και ιριδίζοντα με μία μικρή χαρακτηριστική μαύρη κηλίδα στις άκρες τους. Οι αλτήρες είναι λευκοί και τα ποδιά κίτρινο-

κόκκινα (Εικ.2). Το αυγό έχει λευκό χρώμα με μήκος και διάμετρο 0.7mm και 0.2mm



αντίστοιχα. Η προνύμφη είναι επίσης λευκόχρωμη, χωρίς πόδια και με μήκος 7mm (Εικ.3). Τέλος το βομβύκιο είναι ωσειδές, με χρώμα που ποικίλει από κίτρινο ως καφέ και με μήκος 4-5mm (Εικ.4) (Katsoyannos 1992).



Εικόνα 3 : Προνύμφη δάκου

Εικόνα 4 : Βομβύκιο δάκου

1.2 ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Ο δάκος της ελιάς, όπως και όλα σχεδόν τα σημαντικά επιβλαβή Tephritidae πλην του *Regholetis*, είναι έντομο πολυκυκλικό, δηλαδή συμπληρώνει περισσότερους από έναν βιολογικούς κύκλους ανά έτος. Όταν οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για την αναπαραγωγή και την ανάπτυξή του (ύπαρξη διαθέσιμων καρπών για ωοτοκία, κατάλληλη θερμοκρασία και υγρασία κ.ά.) οι γενεές μπορούν να διαδέχονται η μία την άλλη χωρίς διακοπή καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

Στη περιοχή της Μεσογείου εμφανίζονται 2 έως 5 γενεές ετησίως. Ο πληθυσμός του εντόμου κατά τη διάρκεια του χειμώνα, όπου υπάρχει μειωμένη διαθεσιμότητα



καρπών και χαμηλές θερμοκρασίες, αποτελείται κυρίως από βομβύκια στο έδαφος, κάτω από στρώματα χώματος και φύλλων, και λιγότερο από ανήλικα ή ενήλικα άτομα στο καρπό, που

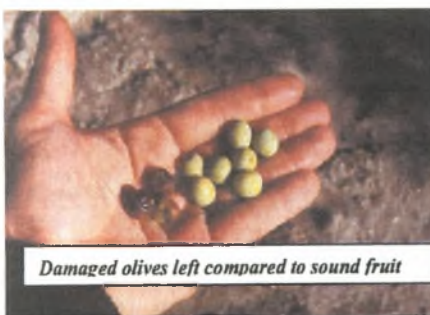
μπορεί να επιβιώσουν ως την ερχόμενη άνοιξη εάν οι συνθήκες το επιτρέψουν. Τα ενήλικα άτομα, που προκύπτουν από τα βομβύκια του χειμώνα, εμφανίζονται κυρίως το Μάρτιο και τον Απρίλιο ανάλογα με το γεωγραφικό πλάτος και τη θερμοκρασία της κάθε περιοχής. Τα θηλυκά αυτής της γενιάς εναποθέτουν αυγά στους καρπούς που έχουν απομείνει επάνω στα δέντρα από τη προηγούμενη χρονιά. Οι προνύμφες που προκύπτουν τρέφονται από τον καρπό και βομβυκιώνονται σε μία περιοχή ακριβώς κάτω από το επικάρπιο. Η πρώτη

γενιά ενήλικων εμφανίζεται την άνοιξη. Η δεύτερη γενιά εμφανίζεται στα μέσα του καλοκαιριού. Κατά τη διάρκεια αυτής της εποχής ο δάκος μπορεί να συμπληρώσει μία γενιά σε 30-35 ημέρες αν οι συνθήκες είναι οι κατάλληλες. Τα αυγά εκκολάπτονται μέσα σε 2 με 3 ημέρες, οι προνύμφες αναπτύσσονται σε περίπου 20 ημέρες ενώ τα βομβύκια σε 8 με 10 ημέρες. Οι ενήλικες μύγες μπορούν να ζήσουν από 2 έως 6 μήνες. Επιπλέον γενεές είναι δυνατόν να παραχθούν κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου μέχρι και το Δεκέμβριο εάν φυσικά υπάρχει διαθέσιμη τροφή. Τα περισσότερα άτομα της τελευταίας γενιάς του κάθε έτους (λίγο πριν το χειμώνα) εγκαταλείπουν τον καρπό και βομβυκίζονται στο έδαφος, έτσι ώστε να δώσουν τη γενιά της άνοιξης και να συνεχίσουν τον βιολογικό κύκλο του εντόμου (Rice, 2000).

Ο ετήσιος κύκλος του εντόμου, επομένως, θα έχει διαφορετικά χαρακτηριστικά σε περιοχές όπου οι ρυθμιστικοί παράγοντες και κυρίως η θερμοκρασία διαφέρουν. Και αυτό διότι ανάλογα με την επικρατούσα θερμοκρασία (βέλτιστη 20°-30°C), η διάρκεια ανάπτυξης των ανηλικών σταδίων και, κατά συνέπεια, η διάρκεια όλου του βιολογικού κύκλου, μπορεί να ποικίλει πολύ. Αυτό άλλωστε δικαιολογεί και το γεγονός της εμφάνισης περισσότερων ή λιγότερων γενεών σε μία περιοχή σε σύγκριση με μία διαφορετική.

1.3 ΠΡΟΚΑΛΟΥΜΕΝΗ ΖΗΜΙΑ

Η προκαλούμενη ζημία από τον δάκο ποικίλλει αισθητά από έτος σε έτος, από περιοχή σε περιοχή και διακρίνεται σε ζημία ποσοτικής και ποιοτικής φύσεως. Το ενήλικο θηλυκό μπορεί να εναποθέσει έως και 400 αυγά, συνήθως ένα σε κάθε καρπό. Αφού αποθέσει το αυγό και πριν αφήσει τον καρπό, το θηλυκό με τον ωθέτη του απλώνει στην επιφάνεια του καρπού τους χυμούς που βγαίνουν από την πληγή. Αυτή η "σήμανση" δρα αποτρεπτικά για



Εικόνα 6 : Σύγκριση προσβεβλημένων ελιών (αριστερά) με φυσιολογικές

άλλα θηλυκά που πιθανώς έρθουν να γεννήσουν στον ίδιο καρπό. Μετά από επώαση 2-6 ημερών, τα αυγά εκκολάπτονται σε μικρές λάρβες, οι οποίες είναι δύσκολα να διακριθούν έως ότου τραφούν για λίγο και αναπτυχθούν. Καθώς τρέφονται, όμως, σχηματίζουν ακανόνιστες στοές μέσα στο καρπό, καταστρέφοντας τη σάρκα και

επιτρέποντας την είσοδο βακτηρίων και μυκήτων. Κάθε προνύμφη για να συμπληρώσει την ανάπτυξή της καταναλώνει από το 1/5 ως το 1/4 του μεσοκαρπίου ενός μέσου μεγέθους καρπού. Η απώλεια βάρους είναι ακόμα πιο σημαντική εάν ο καρπός έχει προσβληθεί από περισσότερες της μίας προνύμφες. Η ποιοτική υποβάθμιση οφείλεται στη ρύπανση από τα περιττώματα της προνύμφης και στις σήψεις από την είσοδο των βακτηρίων και των μυκήτων. Οι οργανισμοί αυτοί αποσυνθέτουν την ελιά και αυξάνουν το επίπεδο των ελευθέρων λιπαρών οξέων (οξύτητα) του λαδιού (B.Muik et al, 2003). Έτσι το λάδι που προέρχεται από ελιές προσβεβλημένες από το δάκο είναι υποβαθμισμένης ποιότητας, αυξημένης οξύτητας (από 7°–8° μέχρι 15°-20° στις σοβαρές περιπτώσεις) και έχει οσμή χύματος (Neuenschwander & Michelakis 1978).

Η προσβολή, τέλος, από το δάκο έχει ως αποτέλεσμα την πρόωρη πτώση του καρπού, σε περιόδους που η περιεκτικότητά του σε λάδι είναι ακόμα μικρή ενώ η εναπόθεση του αυγού από το θηλυκό καταστρέφει την αξία της επιτραπέζιας ελιάς, με αποτέλεσμα να μην είναι δυνατόν να διατεθεί στην αγορά.



Εικόνα 7: Καταστροφή καρπού μετά από προσβολή από δάκο.

1.4 ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ

Η μεγάλη οικονομική σημασία της ελαιοκαλλιέργειας κάνει επιτακτική την ανάγκη ανεύρεσης μεθόδων καταπολέμησης του δάκου. Παραδοσιακά ο έλεγχος των φυσικών πληθυσμών του εντόμου στηρίζεται στη χρήση χημικών μέσων υπό τη μορφή δύο διαφορετικών ψεκασμών, του ψεκασμού καλύψεως και του προληπτικού. Η επιλογή του εντομοκτόνου ψεκασμού γίνεται ανάλογα με το αν ο στόχος είναι ενήλικα άτομα (μύγες), όποτε πρόκειται για προληπτικό ψεκασμό, ή ανήλικα άτομα (προνύμφες) που ήδη βρίσκονται μέσα στον καρπό, ο λεγόμενος ψεκασμός καλύψεως.

Η παρατεταμένη χρήση των εντομοκτόνων, η οποία έχει σοβαρές συνέπειες όχι μόνο στην ισορροπία των οικοσυστημάτων, αλλά και στη μόλυνση του περιβάλλοντος, έχει οδηγήσει τον άνθρωπο στην αναζήτηση φιλικότερων μεθόδων, όπως για παράδειγμα η χρήση δακοπαγίδων που εκμεταλλεύονται διάφορα ερεθίσματα για να προσελκύσουν το έντομο και να παγιδευτεί εκεί. Υπάρχουν παγίδες, οι οποίες

χρησιμοποιούν ερεθίσματα φαγητού ή οπτικά ερεθίσματα (Εικ.8) καθώς και παγίδες που έχουν ως δόλωμα τη φερομόνη. Η αποτελεσματικότητα των τελευταίων αυξάνεται σε καιρούς αναπαραγωγής (Bueno et al, 2002), ενώ των πρώτων εάν επικαλύπτονται με κολλώδη υλικά (Econoμοπουλος et al, 1986). Γενικότερα χρησιμοποιούνται και συνδυασμοί των παραπάνω παγίδων ώστε να γίνει πιο αποτελεσματική η καταπολέμηση (Katsoyannos, 1992).



Εικόνα 8: Δακοπαγίδα McPhail.

Επίσης μέσα στα πλαίσια ανεύρεσης ασφαλέστερων μεθόδων η τεχνική στείρωσης των εντόμων αποκτά μεγάλη σημασία (S.I.T). Η τεχνική συνίσταται στη μαζική παραγωγή ή συλλογή ατόμων, στη στείρωση τους με εφαρμογή ακτινοβολίας γ, και στην απελευθέρωση τους στον αγρό με ελεγχόμενο τρόπο έτσι ώστε να μειώνεται ο αριθμός των γόνιμων διασταυρώσεων στους φυσικούς πληθυσμούς και ακολούθως να περιορίζεται η αύξηση του πληθυσμού. Ενώ τα αρσενικά είναι ικανά προς σύζευξη και μεταφορά σπέρματος, το σπέρμα αυτό καθ'αυτό δε μπορεί να δώσει γένεση σε απογόνους. Ακόμη και αν προκύψουν κάποια άτομα, αυτά πεθαίνουν πρόωρα πριν ολοκληρώσουν την ανάπτυξη τους λόγω δομικών αλλαγών των χρωμοσωμάτων των γαμετών από την ακτινοβολία (Robinson, 2002). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει δώσει σημαντικά αποτελέσματα στην καταπολέμηση των εντόμων οικονομικής σημασίας, όπως τη *Colchiomyia hominivorax*, ένα είδος μύγας τσε τσε τη *Glossina austeni*, και τρία είδη *Tephritidae*, τη μεσογειακή μύγα *C. capitata*, τη μύγα του πεπониού *Bactrocera curcubitae* και την Αυστραλιανή μύγα *Bactrocera tryoni* (IAEA, 1998). Η μέθοδος αυτή έχει δοκιμαστεί και στο δάκο τη δεκαετία του 1980, χωρίς όμως μεγάλη επιτυχία (Econoμοπουλος et al, 1977). Ο κυριότερος λόγος της αποτυχίας θεωρήθηκε ο κακός συγχρονισμός της συμπεριφοράς σύζευξης ανάμεσα στο εργαστηριακό στέλεχος και στο φυσικό πληθυσμό. Η προσπάθεια εγκαταλείφθηκε λόγω της απουσίας βασικών μοριακών και γενετικών δεδομένων που θα μπορούσαν να βοηθήσουν στην επίλυση παρόμοιων προβλημάτων.

1.5 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΚΑΙ ΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΤΟ ΔΑΚΟ

Η οικογένεια των Tephritidae περιέχει αρκετά είδη στα οποία η μοριακή και γενετική μελέτη έχει αναπτυχθεί ταχύτατα. Η Μεσογειακή μύγα αποτελεί ένα οργανισμό μοντέλο για ολόκληρη την οικογένεια εφ' όσον είναι το καλύτερα μελετημένο έντομο

στο γενετικό και μοριακό επίπεδο (Robinson και Zacharopoulou 1996). Μέχρι σήμερα έχει επιτευχθεί η κλωνοποίηση, η μοριακή ανάλυση αλλά και η χαρτογράφηση γονιδίων στα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου (Zacharopoulou et al 1992). Μεταξύ αυτών συγκαταλέγονται γονίδια που σχετίζονται με τον καθορισμό και την ανάπτυξη του φύλου, θερμοεπαγόμενα γονίδια, ή γονίδια τα οποία αποτελούν σημαντικούς γενετικούς δείκτες σε πειράματα γενετικού μετασχηματισμού (Saccone et al 1998, Thymianou et al 1998). Επιπλέον, έχει χαρτογραφηθεί ο παράγοντας γονιμότητας των αρσενικών ατόμων στο Υ χρωμόσωμα (Willhoeft and Franz 1996). Το πιο σημαντικό, όμως, επίτευγμα είναι η ανάπτυξη συστήματος γενετικού μετασχηματισμού στη Μεσογειακή μύγα (Loukeris et al., 1995) που άνοιξε τον δρόμο για την γενετική τροποποίηση του εντόμου (Zwiebel et al., 1995). Και αυτό διότι ο γενετικός έλεγχος των φυσικών πληθυσμών της Μεσογειακής μύγας μέσω της δημιουργίας διαγονιδιακών στελεχών, μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη μέθοδο, SIT (Sterile Insect Technique, Τεχνική Στείρωσης Εντόμων). Η μέθοδος αυτή θεωρείται σήμερα η μόνη εναλλακτική λύση βιολογικού ελέγχου εντόμων οικονομικής σημασίας φιλικής προς το περιβάλλον και έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα στις περιπτώσεις που εφαρμόστηκε

Όσον αφορά το δάκο, παρά την οικονομική του σημασία, η γενετική και μοριακή ανάλυση του υστερεί σε πολύ μεγάλο βαθμό. Οι πληροφορίες σχετίζονται κυρίως, α) με την τροφή, τις συνθήκες διαβίωσης (θερμοκρασία, υγρασία, φως κλπ.), τους χώρους και τα υλικά για την επιτυχή καλλιέργεια του στο εργαστήριο (για ανασκόπηση Tzanakakis 1989), β) με την αντίδραση του δάκου σε αντικείμενα με διαφορετικό σχήμα, χρώμα, μέγεθος για πιθανή χρήση τους για παγίδες στους αγρούς (για ανασκόπηση Katsoyannos 1989), γ) με ουσίες που έχουν σχέση με τη σύζευξη, όπως οι φυλετικές φερομόνες (για ανασκόπηση Mazomenos 1989), και δ) με αβιοτικούς παράγοντες θνησιμότητας (για ανασκόπηση Meats 1989).

Η γενετική πληροφορία για το δάκο προέρχεται κυρίως από βιοχημικές μελέτες που αφορούν ενζυμικούς πολυμορφισμούς σε άγριους και εργαστηριακούς πληθυσμούς (για ανασκόπηση Zouros and Loukas 1989) καθώς επίσης και από μελέτες που αφορούν πρωτεΐνες του ορού και της επιδερμίδας από διάφορα αναπτυξιακά στάδια ενός εργαστηριακού στελέχους (Patrinou-Georgoulas et al 1987, Souliotis et al 1988, 1990). Προσπάθεια μοριακής προσέγγισης έχει γίνει από τους Souliotis και Dimitriadis (1989) και αφορά τα γονίδια των πρωτεϊνών της επιδερμίδας.

Σύμφωνα με κυτταρογενετικά δεδομένα, στους μιτωτικούς πυρήνες του δάκου υπάρχουν 5 ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και ένα ζεύγος φυλετικών, με ετερογαμετικό το αρσενικό άτομο (Frizzi and Springhetti 1953, Krimbas 1963, Mavragani-Tsipidou et al. 1992). Τελευταία, η δημιουργία φωτογραφικών χαρτών των πολυταινικών χρωμοσωμάτων τριών προνομφικών ιστών, του λιπώδους ιστού, των μαλπιγγειανών σωληναρίων και των σιελογόνων αδένων του δάκου, έδειξε ότι τα πολυταινικά χρωμοσώματα του εντόμου αυτού είναι αρκετά καλό υλικό για κυτταρογενετική ανάλυση (Mavragani-Tsipidou et al. 1992, Zambetaki et al. 1995). Έτσι, με την μέθοδο υβριδισμού *in situ* χαρτογραφήθηκαν 10 DNA ακολουθίες στα πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου, δημιουργώντας μοριακούς δείκτες και για τα 5 αυτοσωμικά χρωμοσώματα (Zambetaki et al. 1999). Επιπλέον, μελετήθηκε το πρότυπο των θερμοεπαγόμενων χρωμοσωματικών διογκώσεων (heat-shock puffs) και χαρτογραφήθηκαν θερμοεπαγόμενα γονίδια (Zambetaki et al. 2000). Τέλος, οι προσπάθειες των τελευταίων χρόνων έχουν οδηγήσει στην κατασκευή μιας γενωμικής και δύο cDNA βιβλιοθηκών (από ενήλικο αρσενικό και θηλυκές μύγες), στη κλωνοποίηση του *white* και των γονιδίων καθορισμού φύλου -sex lethal, double sex και tra-2- και στην απομόνωση και τον χαρακτηρισμό των δορυφορικών δεικτών (A. Zacharoglou; K. Komitoroglou; P. Mavragani-Tsipidou, αδημοσίευτα στοιχεία).

Εντούτοις, πολλές πτυχές της βιολογίας και γενετικής αυτού του βασικού εντόμου της συγκομιδής ελιών παραμένουν άγνωστες. Η δημιουργία μοριακών και γενετικών εργαλείων είναι αναγκαία και αποτελεί την βάση για την ανάπτυξη μεθόδων βιολογικού ελέγχου των πληθυσμών του δάκου της ελιάς. Η απομόνωση και η κλωνοποίηση κωδικοποιούσων ή μη ακολουθιών DNA και η χαρτογράφησή τους στα πολυταινικά χρωμοσώματα είναι η βάση για τον καθορισμό της οργάνωσης του γονιδιώματος του εντόμου, της εύρεσης μοριακών δεικτών για πληθυσμιακές και γενετικές αναλύσεις και της συσχέτισης φαινοτυπικών και γενετικών δεδομένων.

2. ΠΟΛΥΤΑΙΝΙΚΑ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΑ

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα περιγράφηκαν πρώτη φορά από τον *Balbani* το 1881, ωστόσο όμως χρειάστηκαν να περάσουν 50 χρόνια ώστε λεπτομερείς έρευνες να αναδείξουν την πραγματική σημασία τους.

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα προέρχονται από τα φυσικά σωματικά χρωμοσώματα τα οποία υφίστανται αρκετούς διαδοχικούς αναδιπλασιασμούς του DNA χωρίς όμως να ακολουθεί πυρηνική ή κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα να είναι πολύ μεγαλύτερα από τα μιτωτικά ή μειωτικά του ίδιου οργανισμού. Τα πολυταινικά χρωμοσώματα από τους σιελογόνους αδένες της Δροσόφιλας είναι 200 φορές μεγαλύτερα από το μήκος των μιτωτικών χρωμοσωμάτων του ίδιου είδους και το συνολικό μήκος τους φθάνει τα 2mm. Τα πολυταινικά χρωμοσώματα τα συναντάμε σε ορισμένους ιστούς όπως για παράδειγμα στους σιελογόνους αδένες στις προνύμφες ορισμένων δίπτερων και έχουν χαρακτηριστική μορφολογική κατασκευή. Κατά μήκος των πολυταινικών χρωμοσωμάτων διακρίνεται μία σειρά από ζώνες που ονομάζονται δεσμικές περιοχές και αντιστοιχούν στα χρωμομερή. Οι δεσμικές περιοχές εναλλάσσονται με τις μεσοδεσμικές περιοχές, οι οποίες χρωματίζονται ασθενέστερα από τις δεσμικές περιοχές. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα πολυταινικά χρωμοσώματα να παρουσιάζουν γραμμική διαφοροποίηση σε σκοτεινές και φωτεινές περιοχές. Κατά μήκος των πολυταινικών χρωμοσωμάτων διακρίνονται επίσης ζώνες όπου το DNA τους δεν είναι ισχυρά συσπειρωμένο και σχηματίζονται ειδικοί μεγάλοι βρόγχοι, οι οποίοι αποτελούν τόπους ενεργής μεταγραφής της γενετικής πληροφορίας (Macgregor et Varley 1983) .

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα από τη στιγμή της ανακάλυψης (ή επαναανακάλυψης) τους στους προνυμφικούς ιστούς της Δροσόφιλας και άλλων δίπτερων από τον *Painter* το 1933 αποτέλεσαν ένα σημαντικό εργαλείο στη γενετική ανάλυση και παρουσίασαν την πρώτη ευκαιρία για τη συσχέτιση των φυσικών με τους γενετικούς χάρτες. Ο *Painter* αντιλήφθηκε ότι τα πρότυπα ζωνών των πολυταινικών χρωμοσωμάτων αποτελούσαν σταθερά χαρακτηριστικά, αναγνωρίσιμα από προνύμφη σε προνύμφη, από στέλεχος σε στέλεχος, και από έτος σε έτος.

Τα επίπεδα του πολυταινισμού μπορεί να διαφέρουν μεταξύ των ιστών κάποιου είδους, αλλά οι ζώνες των μπάντων παραμένουν σταθερές. Αυτό του επέτρεψε να σχεδιάσει έναν χάρτη αυτών των χρωμοσωμάτων, κάτι που τελειοποιήθηκε από τον *Calvin Bridges*. Ο *Calvin Bridges* πρότεινε ότι οι ζώνες των μπαντών κατά μήκος των πολυταινικών χρωμοσωμάτων αναπαριστούν ανεξάρτητα γονίδια κι επομένως μπορεί να συσχετιστεί η διάταξη των μπαντών με τη χαρτογράφηση, η απώλειά τους με ελλείψεις γονιδίων και ο διπλασιασμός τους με άλλες φαινοτυπικές επιδράσεις (Macgregor H & Varley J 1983).

Η σημαντικότητα των πολυταινικών χρωμοσωμάτων ως γενετικά εργαλεία εντοπίζεται στις ακόλουθες χρήσεις τους :

1. ο μοναδικός διαχωρισμός των πολυταινικών χρωμοσωμάτων και η σημαντική πρόοδος της μοριακής τεχνολογίας επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό κάθε κλωνοποιημένης αλληλουχίας DNA επάνω στο χρωμόσωμα με την *in situ* υβριδοποίηση. Αυτή η τεχνική παρέχει ένα πολύπλευρο εργαλείο για τη σύνδεση μοριακών και γενετικών πληροφοριών.
2. ως διαγνωστικά εργαλεία για το διαχωρισμό μελών που ανήκουν σε συμπλέγματα αδελφών ειδών, τα οποία είναι μορφολογικά αδιάχωριστα.
3. η ομοιότητα των πολυταινικών χαρτών μεταξύ κοντινών συγγενών ειδών προσφέρει έναν γρήγορο τρόπο προσδιορισμού των φυλογενετικών σχέσεων.

Σήμερα υπάρχουν χάρτες πολυταινικών χρωμοσωμάτων για περίπου 270 δροσοφιλίδες και για περισσότερα από 250 άλλα είδη διπτέρων (Ashburner, 1992). Η ύπαρξη όμως πολυταινικών χρωμοσωμάτων δεν σημαίνει και τη δυνατότητα χρήσης τους στη γενετική ανάλυση, διότι σε πολλές περιπτώσεις έχουν κακή σύναψη ή παρουσιάζεται δυσκολία στο άπλωμα τους. Όσον αφορά τα πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου, παρά το γεγονός ότι είναι μέτριας ποιότητας, έχει καταστεί δυνατός ο χαρακτηρισμός τους και η χαρτογράφηση σε αυτά 10 μοριακών δεικτών, κάτι που αποτελεί τη μοναδική πρόσβαση στα χρωμοσώματα του εντόμου (Zambetaki et al., 1999).



IR

Εικόνα 9: Ο δεξιός βραχίονας των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του λιπώδους ιστού (FB), των σιελογόνων αδένων (SG) και των μαλπιγγειανών σωληναρίων (MT) του δάκου.

Η πρώτη προσπάθεια περιγραφής των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του δάκου από τους σιελογόνους αδένες χρονολογείται το 1963 από τον Krimba, ο οποίος αναγνώρισε 10 πολυταινικούς βραχίονες και δύο πολύ μικρότερους (Krimbas 1963). Σήμερα, τρεις δεκαετίες αργότερα είναι στη διάθεση μας οι φωτογραφικοί χάρτες των πολυταινικών χρωμοσωμάτων του δάκου από τρεις διαφορετικούς ιστούς, του λιπώδους ιστού (Mavragani-Tsipridou et al., 1992), των μαλπιγγειανών σωληναρίων και των σιελογόνων αδένων (Zambetaki et al., 1995). Από την ανάλυση αυτών διαπιστώθηκε η ύπαρξη 5 χρωμοσωμάτων με 2 βραχίονες το καθένα που

αντιστοιχούν στα 5 αυτοσωμικά χρωμοσώματα των μιτωτικών πυρήνων καθώς και μία ετεροχρωματική δομή, η οποία αντιστοιχεί στα φυλετικά χρωμοσώματα. Ο διαχωρισμός μεταξύ ενός αρσενικού και θηλυκού ατόμου εξαρτάται από το μέγεθος και την πυκνότητα της δομής αυτής καθώς στο θηλυκό άτομο είναι μεγαλύτερη και περισσότερο συμπαγής ενώ στη περίπτωση του αρσενικού ατόμου αυτή είναι μικρότερη και λιγότερο συμπαγής (Zambetaki et al.,1995). Ακόμη, από τους φωτογραφικούς χάρτες διαπιστώθηκε η απουσία ενός τυπικού χρωμοκέντρου, το οποίο χαρακτηρίζεται από συσσώρευση ετεροχρωματίνης, η ύπαρξη αντίστροφων διαδοχικών διπλασιασμών και η παρουσία δακτυλιοειδών (toroid) άκρων των χρωμοσωμικών βραχιόνων (Mavragani-Tsipidou et al.,1992). Τέλος, η ανάλυση των δεσμικών και μεσοδεσμικών αλληλουχιών των χρωμοσωμάτων και των τριών σωματικών ιστών ανέδειξε την ύπαρξη σταθερότητας του πρότυπου των ζωνών.

3.ΧΑΡΤΕΣ ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΩΝ

Οι χάρτες των χρωμοσωμάτων αποτελούν έναν φυσικό τρόπο οργάνωσης των γενετικών πληροφοριών των χρωμοσωμάτων και μπορούν να παρομοιαστούν με τους χαρτογραφικούς χάρτες, οι οποίοι οργανώνουν τις γεωγραφικές πληροφορίες για τις ηπείρους, τις χώρες και τις πόλεις. Οι ήδη υπάρχοντες χάρτες μπορούν να διαχωριστούν σε τέσσερις κατηγορίες: γενετικοί, υβριδικοί χάρτες ακτινοβολίας (Radiation Hybrids), χάρτες γονιδίων και φυσικοί. Αν και όλοι αναφέρονται στην ίδια βιολογική οντότητα, δηλαδή τα χρωμοσώματα, αυτοί οι χάρτες διαφέρουν ουσιαστικά στους τύπους των γενετικών πειραμάτων που πραγματοποιούνται και τους τύπους των συλλεχθέντων γενετικών στοιχείων. Διαφέρουν επιπλέον στις μεθόδους που υιοθετούνται για να καθορίσουν τις αποστάσεις και το καλύτερο δυνατό διαχωρισμό. Συλλογικά, αυτοί οι χάρτες παρέχουν σημαντικά εργαλεία για τη κατανόηση της οργάνωσης και της λειτουργίας του γονιδιώματος.

Οι γενετικοί χάρτες είναι μία αναπαράσταση των γενετικών αποστάσεων που διαχωρίζουν μη αλληλόμορφους γονιδιακούς τόπους σε μία δομή σύνδεσης. Αποτελούν τον πρώτο τύπο χάρτη που κατασκευάστηκε για τον εντοπισμό γονιδίων κατά μήκος των χρωμοσωμάτων. Οι αποστάσεις μεταξύ των γονιδίων μετρούνται σε centimorgans (cM) και καθορίζονται από τα κλάσματα του ανασυνδυασμού. Δύο

γονίδια απέχουν μεταξύ τους απόσταση ίση με 1 cM, όταν διαχωρίζονται από 1% ανασυνδυασμό (Casey, 1992).

Οι χάρτες των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων όπου μεσολαβούν στο διαχωρισμό των γενετικών και φυσικών χαρτών είναι οι *υβριδικοί χάρτες (RH) ακτινοβολίας*. Αυτοί είναι βασισμένοι σε πειραματικά δεδομένα που προκύπτουν από υβρίδια ανθρώπινων σωματικών κυττάρων με τρωκτικών που περιέχουν μικρά τεμάχια των ανθρώπινων χρωμοσωμάτων. Έχουν το δικό τους μετρικό σύστημα, δηλαδή ο μέσος αριθμός σπασιμάτων ανά τη μονάδα φυσικής απόστασης, απεικονίζει τη δόση ακτινοβολίας που χρησιμοποιείται για να τεμαχίσει τα χρωμοσώματα (Speed et Zhao, 2003).

Επόμενοι στο διαχωρισμό, αν και διαφορετικοί στο χαρακτήρα, είναι οι *χάρτες γονιδίων*. Αυτοί οι χάρτες κατασκευάζονται με τη συλλογή των *expressed sequence tags (ESTs)*, τα οποία αποτελούν σύντομες ακολουθίες DNA της 3'-αμετάφραστης περιοχής συμπληρωματικού DNA (cDNA), και έπειτα την εντόπιση των συμπλεγμάτων αυτών στα χρωμοσώματα χρησιμοποιώντας *sequence tags sites (STSs)* σε αυτές τις περιοχές. Ιδανικά, κάθε σημείο σε έναν τέτοιο χάρτη αντιστοιχεί σε ένα μοναδικό γονίδιο, και έτσι οι χάρτες γονιδίων μπορούν να προσδιορίζουν γονίδια επάνω στους φυσικούς χάρτες. Έως ότου καθοριστεί πλήρως η αλληλούχιση ενός γονιδιώματος, αυτοί οι χάρτες παρέχουν την καλύτερη χρησιμοποιήσιμη περιγραφή των θέσεων των γονιδίων ενός οργανισμού (Speed et Zhao, 2003).

Η φυσική χαρτογράφηση είναι η διαδικασία καθορισμού της θέσης διάφορων «περιοχών» όπως οι περιοχές περιορισμού, οι *sequence-tagged sites* και τα κλωνοποιημένα τμήματα επάνω σε ένα μεγαλύτερο μόριο DNA ή ένα χρωμόσωμα. Οι φυσικοί χάρτες λαμβάνουν διάφορες μορφές, όπως κυτταρογενετικοί ή μακροπεριοριστικοί χάρτες, αλλά κοινό χαρακτηριστικό όλων είναι ότι οι αλληλουχίες που χαρτογραφούνται είναι συγκεκριμένες και οι αποστάσεις είναι φυσικές, χιλιάδων (kb) ή εκατομμυρίων (Mb) ζευγάρια-βάσεων, που απεικονίζουν το γεγονός ότι τα χρωμοσώματα είναι μεγάλα μόρια DNA (Casey, 1992). Εντούτοις, οι πρώτοι φυσικοί χάρτες δεν ήταν ακριβώς αυτού του τύπου. Τα πρώτα παραδείγματα των φυσικών χαρτών βασίζονται στα πολυταινικά σιελογόνα χρωμοσώματα των σιελογόνων αδένων των εντόμων που ανήκουν στα δίπτερα, όπως η *Drosophila melanogaster*. Σε αυτούς τους χάρτες ο προσδιορισμός θέσης παρέχεται από τις ορατές ζώνες με την τεχνική της *in situ* υβριδοποίησης. Η φυσική χαρτογράφηση των γονιδιακών τόπων χρησιμοποιεί ανιχνευτές για την αναγνώριση συγκεκριμένων χρωμοσωμικών περιοχών ή για την ανίχνευση επικαλυπτόμενων τμημάτων. Ο πιο χρήσιμος δείκτης

σε αυτό το πλαίσιο είναι τα sequence tagged sites (STS), που καθορίζονται από ένα τμήμα 20-30 ζευγάρια βάσεων PCR εκκινητών, οι οποίοι ενισχύουν ένα μοναδικό τμήμα του γονιδιώματος (Speed et Zhao, 2003).

Οι φυσικοί και γενετικοί χάρτες, όπως προκύπτει, είναι απαραίτητα γενετικά και μοριακά εργαλεία για την ανάλυση του γονιδιώματος οποιουδήποτε οργανισμού. Είναι το προοίμιο κάθε σοβαρής προσεγγιστικής ανάλυσης της οργάνωσης του γονιδιώματος, του χαρακτηρισμού γονιδίων καθώς και των προσπαθειών γονιδιωματικής ανάλυσης. Όσον αφορά το δάκο, μέχρι στιγμής, δεν υπάρχουν καθόλου παρόμοια στοιχεία, παρά μόνο η χαρτογράφηση δέκα ετερόλογων δεικτών (εννέα από τη *Ceratitis capitata* και έναν από την *Drosophila melanogaster*) στα πολυταινικά του χρωμοσώματα. Όλες οι προσπάθειες απομόνωσης και χαρτογράφησης μορφολογικών μεταλλάξεων, κάτι που θα καθιστούσε δυνατή τη γενετική ανάλυση, έχουν αποβεί άκαρπες.

4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Στα πρώτα στάδια εφαρμογής της Μεντελικής Γενετικής χρησιμοποιήθηκαν ως γενετικοί δείκτες διάφορα γνωρίσματα, όπως είναι ο χρωματισμός, η μορφολογία κτλ. Αργότερα (μετά το 1971) άρχισαν να χρησιμοποιούνται ως γενετικοί δείκτες ανοσολογικοί ή βιοχημικοί χαρακτήρες. Το βασικό μειονέκτημα αυτών των δεικτών είναι ότι επιτρέπουν να διερευνηθεί μικρό μόνο μέρος του γενώματος κάθε είδους. Σημαντική βελτίωση απετέλεσε η χρησιμοποίηση των ενζύμων περιορισμού που επιτρέπει την ανακάλυψη εκτεταμένου γενετικού πολυμορφισμού. Ως πολυμορφισμός ορίζεται η εμφάνιση δύο ή περισσότερων γενετικά καθορισμένων εναλλακτικών φαινοτύπων σε ένα πληθυσμό, σε τέτοια συχνότητα, ώστε ο σπανιότερος δεν θα μπορούσε να διατηρηθεί μόνο με αλληπάλληλες μεταλλάξεις. Με τη χρήση των ενδονουκλεασών περιορισμού στο DNA δημιουργούνται ποικίλου μήκους περιοριστικά θραύσματα (restriction fragment length polymorphisms RFLPs), τα οποία με ηλεκτροφόρηση αποκαλύπτουν ένα πρότυπο ζωνών (Casey, 1992). Μεταλλάξεις στην αλληλουχία του DNA, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν την απάλειψη των ήδη υπαρχόντων ή/και την δημιουργία νέων περιοχών αναγνώρισης ενδονουκλεασών θεωρούνται η κύρια αιτία των πολυμορφισμών μήκους (Sunpuks 2000). Τα RFLPs έχει βρεθεί ότι είναι μετρίως πολύμορφα και μπορούν να εφαρμοστούν σε διάφορες

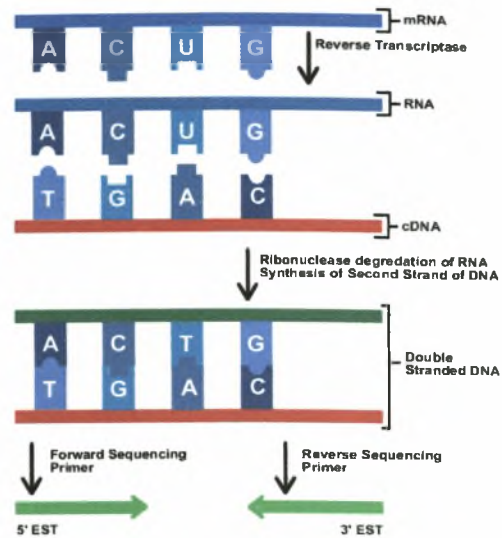
συγκρίσεις που κυμαίνονται από το μεμονωμένο επίπεδο έως τα κοντινά συγγενικά είδη. Λόγω του μεγάλου αριθμού τους και της τυχαίας κατανομής τους σε όλο το γονιδίωμα, τα RFLPs μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις μελέτες χαρτογράφησης γονιδίων (Neale & Williams, 1991). Παρόμοια τεχνική είναι και τα AFLPs (amplified fragment length polymorphisms), η οποία βασίζεται στη PCR και αφορά την ενίσχυση τμημάτων DNA αφ' ότου έχει γίνει η πέψη τους με ένζυμα περιορισμού (Vos et al, 1995).

Σημαντική επιπλέον εξέλιξη είναι η χρησιμοποίηση ολιγονουκλεοτιδίων, μεθοδολογία που επιτρέπει τη μελέτη πολυμορφισμού σχεδόν όλου του γενώματος κάθε είδους. Το μη επαναλαμβανόμενο DNA (single copy nuclear, scnDNA) αποτελεί το 70% του συνολικού DNA των θηλαστικών. Το υπόλοιπο τμήμα περιέχει διαδοχικά επαναλαμβανόμενες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες γνωστές ως VNTRs (variable number of tandem repeats). Το μέγεθος αυτών των επαναλήψεων ποικίλει. Επαναλήψεις μεγέθους 15-65bp ονομάζονται μινιδορυφόροι, ενώ όταν έχουν μέγεθος 1-6bp ονομάζονται μικροδορυφόροι. Εξαιτίας του υψηλού μεταλλακτικού ρυθμού οι VNTRs εμφανίζουν μεγάλη γενετική ποικιλότητα και υψηλό ποσοστό ετεροζυγωτίας με αποτέλεσμα να αποδεικνύονται ιδιαίτερα χρήσιμοι μάρτυρες στη διάκριση πληθυσμών του ίδιου ή συγγενικών ειδών (Tautz, 1989). Ειδικότερα οι μικροδορυφόροι, λόγω του υψηλού επιπέδου πολυμορφισμού, αποτελούν πληροφοριακούς δείκτες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διάφορους λόγους στη γενετική πληθυσμών, που κυμαίνονται από το μεμονωμένο επίπεδο (π.χ. προσδιορισμός κλώνων) ως τα πολύ συγγενικά είδη. Ακόμη είναι πολυάριθμοι και υπάρχουν στο γονιδίωμα όλων των ευκαρυωτικών οργανισμών, κληρονομούνται ως συνεπερέχοντα αλληλόμορφα, έχουν μεγάλη επαναληψιμότητα και μπορούν να απομονωθούν σχετικά εύκολα από γονιδιωματική βιβλιοθήκη με ανιχνευτές συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια που περιέχουν επαναλήψεις δι- ή τρινουκλεοτιδίων (Sunpuks 2000). Επιπλέον, οι μικροδορυφόροι θεωρούνται ιδανικοί δείκτες στις μελέτες χαρτογράφησης γονιδίων.

5. EXPRESSED SEQUENCE TAGS (ESTs)

Ένα από τα πλέον πολύτιμα εργαλεία στην αναγνώριση και χαρτογράφηση των γονιδίων έχει αναδειχθεί και η χρησιμοποίηση διάφορων αλληλουχιών cDNAs, όπως τα expressed sequence tags, τα οποία αποτελούν μικρό μέρος ενός ολόκληρου

γονιδίου. Τα *ESTs* είναι μικρά τμήματα, τα οποία προκύπτουν από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του 3' ή 5' άκρου τυχαίων cDNAs (συνήθως έχουν μήκος 200-500 bp) (Εικ.10). Τα *ESTs* χρησιμοποιούνται ως “ετικέτες-tags” για να ανιχνεύσουν γονίδια, μέσω συμπληρωματικότητας, στο γενωμικό DNA. Η επιτυχία της ανίχνευσης εξαρτάται από το μέγεθος του *EST* και την παρουσία ιντρονίων στο αντίστοιχο γονίδιο (Okubo et al, 1992).



Εικόνα 10: Η πορεία της δημιουργίας ενός *EST*.

Οι ακολουθίες *EST* είναι εξαιρετικά πολύτιμες για τον προσδιορισμό νέων γονιδίων. Οι ακολουθίες αυτές που λαμβάνονται από τυχαία επιλογή κλώνων cDNA προσφέρουν μια στατιστική εικόνα του επιπέδου και της πολυπλοκότητας της έκφρασης των γονιδίων του ιστού από τον οποίο προέρχονται. Το γεγονός αυτό παρέχει τη δυνατότητα μελέτης της επιρροής των περιβαλλοντικών παραγόντων στην έκφραση των γονιδίων του συγκεκριμένου ιστού (Okubo et al, 1992). Οι αποκτηθείσες ακολουθίες γονιδίων μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά στη φυσική χαρτογράφηση των οργανισμών με τον προσδιορισμό της χρωμοσωμικής θέσης των γονιδίων. Επιπλέον, η ανάλυσή τους μπορεί να συμβάλλει στην κατανόηση των ορίων μεταξύ ιντρονίων και εξονίων, καθώς και στη πρόβλεψη των μεταγραφόμενων περιοχών του γονιδιώματος. Επίσης, η σύγκριση των *ESTs* σε διαφορετικούς οργανισμούς μπορεί να χρησιμοποιηθεί αφενός στην αποκάλυψη μεταλλάξεων στα γονίδια, διευκολύνοντας τις εξελικτικές μελέτες, και αφετέρου στην κλωνοποίηση των εν λόγω γονιδίων, ξεπερνώντας έτσι τα ταξινομικά όρια (Marra et al, 1998). Η χρησιμοποίηση των *ESTs* εμπεριέχει ακόμη διάφορα πρακτικά πλεονεκτήματα δεδομένου ότι οι ακολουθίες τους μπορούν να παραχθούν γρήγορα και ανέξοδα και δεν είναι απαραίτητο να ελεγχθούν για τυχόν λάθη της ακολουθίας τους επειδή τα λάθη δεν αποτρέπουν τον προσδιορισμό του γονιδίου από το οποίο προήλθε το *EST*.

ΣΚΟΠΟΣ

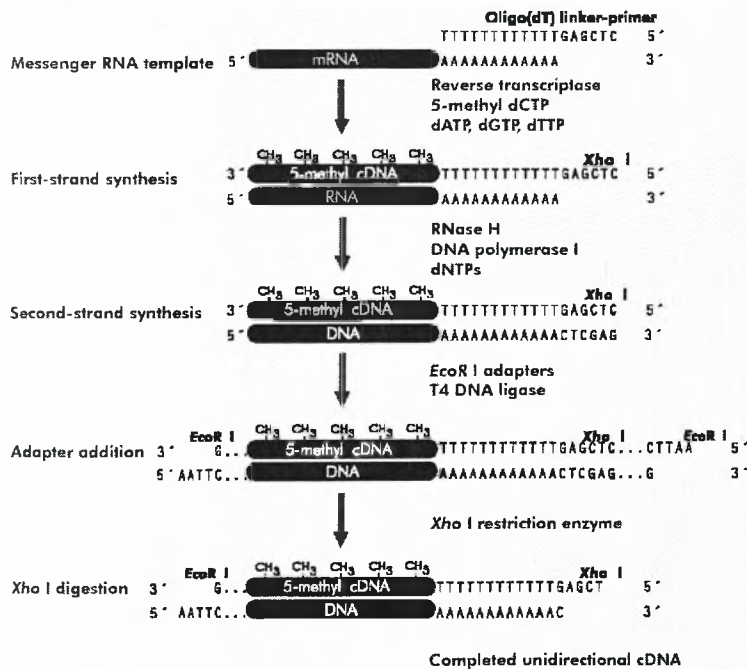
Η παρούσα εργασία αποσκοπεί στη συλλογή ενός αρκετά αριθμού EST (expressed sequence tags) μαρτύρων, οι οποίοι προέρχονται από cDNA κλώνους και ως εκ τούτου υποδηλώνουν τη θέση γονιδίων, και στο καθορισμό της πρωτοταγούς δομής των κλώνων αυτών, από μία μοναδική ανάγνωση έτσι ώστε να διακριθεί η τυχόν ομοιότητά τους με γνωστά γονίδια της βάσης δεδομένων. Οι πληροφορίες που θα αποκομίσουμε θα είναι σημαντικές όχι μόνο διότι θα μας δώσουν τη δυνατότητα φυσικής χαρτογράφησης του γονιδιώματος σε μετέπειτα ερευνητική δραστηριότητα, μέσω του καθορισμού της θέσης των συλλεχθέντων cDNA κλώνων στους βραχίονες των πολυταινικών χρωμοσωμάτων, αλλά και γιατί θα αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για περαιτέρω γενετικές ή μοριακές αναλύσεις.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. cDNA ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ

Η cDNA βιβλιοθήκη του δάκου, *Bactrocera oleae*, ήταν προσφορά του εργαστηρίου της κ. Κομιτοπούλου του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών. Η βιβλιοθήκη προέρχεται από mRNA αρσενικού ενήλικου ατόμου και έχει κατασκευαστεί με χρήση του ZAP Express cDNA Synthesis kit της εταιρείας Stratagene.

Το απομονωμένο mRNA του εντόμου χρησιμοποιείται ως εκμαγείο από την αντίστροφη μεταγραφή ώστε να συνθέσει το cDNA, με εκκινητή μία αλληλουχία, η οποία εμπεριέχει έναν συνδέτη Τ-βάσεων (oligo(dT)-linker) και ένα σημείο αναγνώρισης κοπής του περιοριστικού ενζύμου XhoI. Η σύνδεση του εκκινητή με το mRNA πραγματοποιείται λόγω της συμπληρωματικότητας της πολύ-Α ουράς του mRNA με τις Τ βάσεις του συνδέτη, ενώ το μείγμα των νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιείται για την επιμήκυνση της αλυσίδας περιέχει 5' μεθυλιωμένα dCTP, ώστε να προστατευθεί το DNA από τη δράση του ενζύμου XhoI. Η σύνθεση της



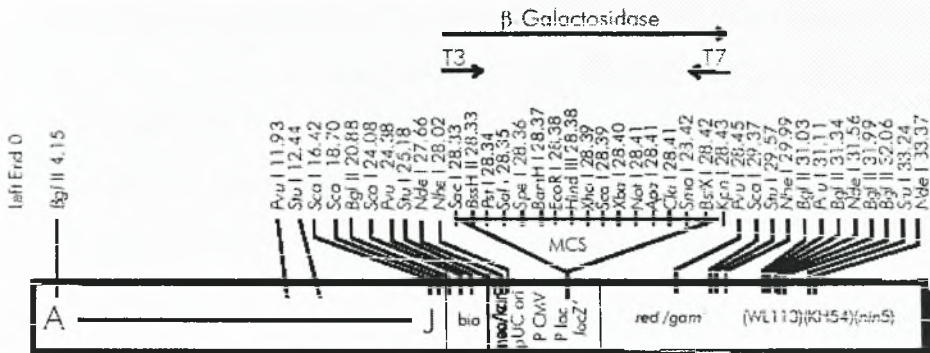
Εικόνα 11 : Πορεία σύνθεσης του cDNA

δεύτερης αλυσίδας πραγματοποιείται από τη DNA πολυμεράση I με εκμαγείο την πρώτη αλυσίδα που συντέθηκε. Ως εκκινητές χρησιμοποιούνται μικρά τμήματα του αρχικού mRNA, τα οποία προκύπτουν από τη δράση του ένζυμου RNAase H. Τα άνισα άκρα των 2 αλυσίδων συμπληρώνονται με την προσθήκη προσαρμογέα EcoRI (EcoRI adapter).

Ακολουθεί πέψη με το ένζυμο XhoI ώστε να απομακρυνθεί ο προσαρμογέας EcoRI και το κατάλοιπο του συνδέτη από τα 3' άκρα του (Εικ.11).

Τα εναπομείναντα άκρα επιτρέπουν την κλωνοποίηση του ολοκληρωμένου cDNA στο φορέα λΖΑΡ με νοηματική κατεύθυνση (EcoRI – XhoI). Ο φορέας ΖΑΡ εμφανίζει 12

μοναδικές θέσεις περιοριστικών ενζύμων μεταξύ των οποίων μπορεί να εισαχθεί οποιοδήποτε τμήμα DNA μεγέθους 0-12kb (Εικ.12).



Εικόνα 12 : Ο χάρτης του φορέα λZAP

Τα ενθέματα τα οποία είναι κλωνοποιημένα στον φορέα λZAP μπορούν να εκτομηθούν από τους φάγους υπό τη μορφή pBK-CMV φαγεμιδικών φορέων έτσι ώστε να επιτραπεί ο χαρακτηρισμός των ενθεμάτων σε ένα πλασμιδιακό σύστημα.

* Τα πρωτόκολλα (παράγραφοι 2 - 5), στα οποία χρησιμοποιήθηκε ο λ φάγος, βασίστηκαν στο εγχειρίδιο της εταιρείας Stratagene, ZAP Express® cDNA Synthesis Kit and ZAP Express® cDNA Gigapack® III Gold Cloning Kit.

2.ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΟΥ ΣΤΕΛΕΧΟΥΣ XL1-Blue MRF'

Ξενιστής του φάγου λZAP είναι το βακτηριακό στέλεχος XL1-Blue MRF'. Ο γενότυπος του στελέχους αυτού είναι : $\Delta(mcrA)183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173$
 $endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1$
 $lac [F' proAB lacI^q \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$

Διαλύματα-Υλικά

Stock γλυκερόλης XL1-Blue MRF'	Μικροβιολογικός κρίκος
Θρεπτικό μέσο LB	Τρυβλίο LB/τετρακυκλίνη
Μαλιτόζη	Επωαστήρας
Διάλυμα MgSO ₄	Κωνική φιάλη των 250ml
Φυγόκεντρος	Φωτόμετρο
Σωλήνες 15ml (2059 polypropylene tubes)	

Θρεπτικό μέσο LB : Προστίθενται 5gr εκχύλισμα μαγιάς, 10gr bacto-tryptone, 10gr NaCl αναμειγνύονται σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH

στο 7.0 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H₂O. Ακολουθεί αποστείρωση.

Τρυβλία LB άγαρ/τετρακυκλίνη : 5gr εκχύλισμα μαγιάς, 10gr bacto-tryptone, 10gr NaCl, 20gr άγαρ αναμειγνύονται σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 7.0 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H₂O. Ακολουθεί αποστείρωση. Το αντιβιοτικό προστίθεται λίγο πριν την επίστρωση των τρυβλίων όταν η θερμοκρασία έχει μειωθεί στους 55°C.

Πορεία

- Με τη βοήθεια μικροβιολογικού κρίκου επιστρώνεται σε τρυβλίο LB-τετρακυκλίνης μικρή ποσότητα κυττάρων XL1-Blue MRF' από stock γλυκερόλης αποθηκευμένο στους - 80°C.
- Το τρυβλίο επωάζεται στους 37°C για 12 ώρες.
- Σε κωνική φιάλη των 250ml που περιέχει 10ml θρεπτικού μέσου εμπλουτισμένου με 10mM MgSO₄ και 0.2% μαλτόζη ενοφθαλμίζεται ποσότητα μοναδικής αποικίας από το τρυβλίο. Η μαλτόζη προάγει την έκφραση των υποδοχέων λ φάγων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη των κυττάρων ξενιστών τους.
- Η καλλιέργεια επωάζεται είτε στους 30°C για 12 ώρες είτε στους 37°C για 4-6 ώρες.
- Τα κύτταρα συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 2.000 rpm για 10 λεπτά.
- Το υπερκείμενο υγρό απομακρύνεται και το ίζημα αναδιαλύεται ήπια σε 1ml διαλύματος 10mM MgSO₄.
- Σε σωλήνες 15ml (2059 polypropylene tubes) μεταφέρονται 200μl του παραπάνω εναιωρήματος και αραιώνεται με κατάλληλο όγκο διαλύματος 10mM MgSO₄ , έτσι ώστε με φωτομέτρηση σε μήκος κύματος 600nm, να έχει οπτική απορρόφηση (OD) περίπου 0.5. Το μαγνήσιο βοηθά στη προσκόλληση των φάγων στα κύτταρα.

3. ΤΙΤΛΟΔΟΤΗΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΣΤΡΩΣΗ ΜΟΛΥΣΜΕΝΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ XL1-Blue MRF' ΜΕ ΦΑΓΟΥΣ

Η τιτλοδότηση, η εύρεση δηλαδή του αριθμού των πλακών που δημιουργούνται από ποσότητα φάγων 1ml [plaque forming units per milliliter (pfu/ml)], πραγματοποιείται σύμφωνα με τη σχέση :

$$\left[\frac{\text{Αριθμός πλακών (pfu)} \times \text{συντελεστής αραίωσης}}{\text{Όγκος που επιστρώθηκε (μl)}} \right] \times 1000 \mu\text{l} / \text{ml}$$

Όπου όγκος που επιστρώθηκε (σε μl) αναφέρεται ο όγκος του διαλύματος φάγων που προστέθηκε στα κύτταρα.

Διαλύματα–Υλικά

cDNA βιβλιοθήκη

επωαστήρας

κύτταρα XL1-Blue MRF'

NZY top agar

ρυθμιστικό διάλυμα SM

Τρυβλία NZY άγαρ

σωληνάκια τύπου erpendorf

Ρυθμιστικό διάλυμα SM : 5.8gr NaCl, 2.0gr MgSO₄ • 7H₂O, 50ml 1M Tris-HCl (pH 7.5), 5.0 ml 2% (w/v) ζελατίνη αναμειγνύονται σε τελικό όγκο 1000ml.

Τρυβλία NZY άγαρ : 5gr NaCl, 2gr MgSO₄ • 7H₂O, 5gr εκχύλισμα μαγιάς, 10grNZ amine (casein hydrolysate), 15gr άγαρ αναμειγνύονται σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 7.5 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H₂O. Ακολουθεί αποστείρωση.

Θρεπτικό μέσο NZY top agar : 5gr NaCl, 2gr MgSO₄ • 7H₂O, 5gr εκχύλισμα μαγιάς, 10gr NZ amine (casein hydrolysate), 0.7% (w/v) αγαρόζη αναμειγνύονται σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 7.5 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H₂O. Ακολουθεί αποστείρωση.

Πορεία

- Παρασκευάζονται διάφορες αραιώσεις της βιβλιοθήκης προσθέτοντας 2μl από την αρχική βιβλιοθήκη σε 98μl ρυθμιστικού διαλύματος SM (10^{-2}) και κατόπιν 2μl από την αραιώση αυτή σε 98μl SM buffer (10^{-4}).
- Σε σωληνάκια τύπου erpendorf αναμειγνύονται 1μl από κάθε αραιώση με 200μl εναιωρήματος XL1-Blue MRF' ($OD_{600}=0.5$).
- Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 15 λεπτά.
- Το μείγμα από κάθε erpendorf προστίθεται σε 3ml NZY top agar ($\sim 47^{\circ}\text{C}$), το οποίο επιχύνεται σε τρυβλία NZY άγαρ.
- Τα τρυβλία, αφού στερεοποιηθούν, επωάζονται στους 37°C για 12 ώρες.

* Η λύση των βακτηριακών κυττάρων από τους φάγους έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση διαυγών πλακών στο τρυβλίο.

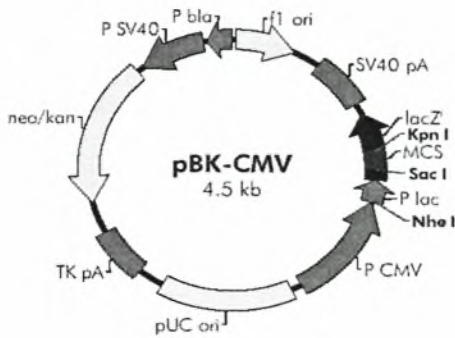
4. IN VIVO ΕΚΤΟΜΗ ΕΝΘΕΜΑΤΟΣ ΑΠΟ ΦΟΡΕΑ λΖΑΡ

Ο φορέας λΖΑΡ έχει σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπει την εύκολη και αποδοτική in vivo εκτομή και επανακυκλοποίηση οποιουδήποτε ενθέματος περιέχεται εντός του φορέα, ώστε να σχηματιστεί ένα φαγεμίδιο (phagemid), το οποίο θα περιέχει το κλωνοποιημένο ένθεμα. Η in vivo εκτομή εξαρτάται από την παρουσία συγκεκριμένων αλληλουχιών DNA στο γένωμα του λ φάγου καθώς και διάφορων πρωτεϊνών που προέρχονται από το βοηθό (helper) βακτηριοφάγο (M13). Οι αλληλουχίες αυτές διακρίνονται σε αλληλουχία έναρξης και αλληλουχία τερματισμού, οι οποίες βρίσκονται εκατέρωθεν του κλωνοποιημένου ενθέματος. Οι πρωτεΐνες του βοηθού φάγου αναγνωρίζουν την περιοχή έναρξης που βρίσκεται στο λ φορέα, και αφού «κόψουν» τη μία από τις δύο αλυσίδες του DNA, αρχίζουν την αντιγραφή της περιοχής που βρίσκεται καθοδικά της έναρξης. Η αντιγραφή συνεχίζει έως τη περιοχή τερματισμού με αποτέλεσμα να αντιγράφεται και το κλωνοποιημένο ένθεμα. Το μονόκλωνο μόριο DNA που παράγεται, δηλαδή το DNA βρίσκεται ανάμεσα στις αλληλουχίες έναρξης-τερματισμού, κυκλοποιείται με τη βοήθεια μίας πρωτεΐνης του βοηθού φάγου. Το φαγεμίδιο που προκύπτει στη

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

περίπτωση του λ ZAP είναι το ρBK-CMV (Εικ. 13), το οποίο διαθέτει το ένθεμα μας, μία λειτουργική περιοχή

ρBK-CMV Vector Map



μας, μία λειτουργική περιοχή έναρξης της αντιγραφής, όπως αυτή συναντάται στους φάγους, καθώς και ένα σήμα πακεταρίσμάτος του.

Εικόνα 13 : Χάρτης του φαγεμιδίου ρBK-CMV

Διαλύματα – Υλικά

Κύτταρα XL1- Blue

Κύτταρα XL0LR

λ φάγος

Βοηθός φάγος

Θρεπτικό μέσο LB

Διάλυμα MgSO₄

Μαλτόζη

Τρυβλία LB-καναμυκίνη

Κωνική φιάλη 50ml

Φυγόκεντρος

επωαστήρας

Υδατόλουτρο

Βοηθός φάγος : η τιτλοδότηση πραγματοποιείται όπως περιγράφεται στη παράγραφο 3 με τη μόνη διαφορά η τιμή του OD των κυττάρων πρέπει να ισούται με 1.

Κύτταρα XL0LR : προετοιμάζονται ακριβώς όπως τα κύτταρα MRF' στη παράγραφο 2.

Θρεπτικό μέσο LB : όπως αναφέρεται στη παράγραφο 2.

Τρυβλία LB άναρ/ καναμυκίνη : όπως αναφέρεται στη παράγραφο 2.

Πορεία

- Σε κωνική φιάλη των 50ml αναμειγνύονται 250μl εναιωρήματος κυττάρων XL1-Blue MRF' [OD₆₀₀=1 (8x10⁸ κύτταρα/ml)] με 3.3μl λ φάγου και 1μl βοηθού φάγου (οι συγκεκριμένες ποσότητες προκύπτουν με βάση τη τιτλοδότηση που πραγματοποιήθηκε στο πείραμα μας). Γενικά ο λόγος της ποσότητας των κυττάρων και του λ φάγου που αναμειγνύονται πρέπει να είναι 10:1, ενώ αντίθετα ο λόγος μεταξύ των κυττάρων και του βοηθού φάγου 1:10. Η ποσότητα του λ φάγου θα πρέπει να είναι 10-100 φορές περισσότερη από το μέγεθος της αρχικής

βιβλιοθήκης ώστε να εξασφαλιστεί η στατιστική αντιπροσώπευση των κλώνων στα φαγεμίδια. Τα 3.3μl λ φάγου περιείχαν $\sim 10^5$ φαγοσωματίδια, ενώ το 1μl βοηθού φάγου $\sim 10^7$ φαγοσωματίδια.

- Το μείγμα επωάζεται στους 37°C για 15 λεπτά ώστε να προσκολληθούν οι φάγοι στα κύτταρα.
- Προστίθενται 20ml θρεπτικού μέσου LB εμπλουτισμένου με 10mM MgSO₄ και 20% μαλτόζη και ακολουθεί επώαση υπό ανάδευση στους 37°C για 2.5-3 ώρες. Επώαση για περισσότερο χρονικό διάστημα ίσως μεταβάλλει την αντιπροσώπευση των κλώνων.
- Το μείγμα θερμαίνεται στους 65-70°C για 20 λεπτά ώστε να λυθούν τα σωματίδια των φάγων και τα κύτταρα, ενώ το φαγεμίδιο επιβιώνει.
- Φυγοκέντρηση στις 1000 rpm για 10 λεπτά για να καθιζήσουν τα νεκρά κύτταρα και φάγοι.
- Το υπερκείμενο υγρό στο οποίο περιέχονται τα φαγεμίδια μεταφέρεται σε καινούργια κωνική φιάλη.
- Ποσότητα 200μl εναιωρήματος κυττάρων XL0LR (OD₆₀₀=1) αναμειγνύονται με 1μl του υπερκειμένου σε σωληνάκι τύπου erpendorf και επωάζονται στους 37°C για 15 λεπτά. Με αυτό τον τρόπο πραγματοποιείται τιτλοδότηση των φαγεμιδίων.
- Ποσότητα 100μl του μίγματος επιστρώνεται σε τρυβλίο LB-καναμυκίνης (50μg/ml) και επωάζεται ολονύκτια στους 37°C.

* Οι αποικίες, οι οποίες αναπτύσσονται, περιέχουν το δίκλωνο φαγεμίδιο pBK-CMV με το κλωνοποιημένο ένθεμα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απομόνωση του πλασμιδιακού τους DNA.

5.ΕΚΛΟΥΣΗ ΣΩΜΑΤΙΔΙΩΝ ΦΑΓΟΥ

Πορεία

- Με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας Pasteur εκτέμνονται από τα τρυβλία διάφορες πλάκες φάγων και μεταφέρονται σε σωληνάκια τύπου erpendorf. Οι πλάκες δεν πρέπει να γειτνιάζουν με άλλες ώστε να μην

υπάρχει μόλυνση. Κάθε πλάκα περιέχει και ένα κλωνοποιημένο ένθεμα.

- Προστίθεται 500ml ρυθμιστικού διαλύματος SM.
- Τα δείγματα είτε διατηρούνται σε θερμοκρασία δωματίου για 1-2 ώρες είτε στους 4°C για 12 ώρες, ώστε να διαχυθούν τα σωματίδια του φάγου.

*Τα εκλούμενα σωματίδια του φάγου μπορούν να ενισχυθούν με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.

Ρυθμιστικό διάλυμα SM : όπως αναφέρεται στη παράγραφο 3.

6. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΑΠΟ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα βακτήρια μπορούν να υποστούν λύση με ένα μεγάλο αριθμό μεθόδων, οι οποίες περιλαμβάνουν επεξεργασία με ιοντικά ή μη απορρυπαντικά, με οργανικά διαλύματα, με αλκάλι, θερμότητα ή ενζυμικά (λυσοζύμη, πρωτεϊνάση K). Η επιλογή μεταξύ αυτών των μεθόδων καθορίζεται από τρεις παράγοντες: το μέγεθος του πλασμιδίου, το στέλεχος του *E.coli* και την τεχνική καθαρισμού του πλασμιδιακού DNA που θα ακολουθηθεί. Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η αλκαλική λύση, η οποία αποδίδει πλασμίδιο υψηλής καθαρότητας κατάλληλου για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η μέθοδος συνίσταται στην ελεγχόμενη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, παρουσία NaOH και SDS, την κατακρήμνιση αφενός των μεμβρανών με το προσδεμένο βακτηριακό DNA και αφετέρου μετουσιωμένων πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων με οξικό κάλιο, και την κατακρήμνιση του πλασμιδιακού με αιθανόλη (Sambrook et al., 1989).

Διαλύματα – Υλικά

Μετασχηματισμένα βακτηριακά κύτταρα

Διαλύματα I, II, III

Αιθανόλη 70% και 100%

Πάγος

Μικροφυγόκεντρος

Μικροφυγοκεντρικά σωληνάκια των 1.5ml (eppendorfs)

Vortex

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Αυτόματες μικροπιπέτες με ακροφύσια των 200μl και 1000μl

Πανγκρεατική RNAάση (20μg/ml),
ελεύθερη DNAάσης

Διάλυμα I: 50mM γλυκόζη, 25mM Tris-HCl (pH 8.0), 10mM EDTA (pH 8.0)

Διάλυμα II: 0.2 N NaOH, 1% SDS

Διάλυμα III: 11.5ml CH₃COOH, 60ml 5M CH₃COOK, 28.5ml H₂O

TE (pH 8.0): 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)

Πορεία

- Τα βακτηριακά κύτταρα μεταφέρονται σε σωληνάκι τύπου erpendorf και συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 2 min.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα αναδιαλύεται, με τη βοήθεια vortex, σε 100μl παγωμένου διαλύματος I έως ότου δεν υπάρχουν συσσωματώματα. Το EDTA που εμπεριέχεται στο διάλυμα δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα (Ca⁺², Mg⁺²) τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών.
- Προστίθενται 200μl από πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα II. Το μίγμα αναδεύεται ήπια για να μη θρυμματιστεί το χρωμοσωμικό DNA και τοποθετείται στον πάγο για λιγότερο από 5 λεπτά ώστε να αποφεύγεται η μη αναστρέψιμη μετουσίωση του πλασμιδίου. Το απορρυπαντικό SDS (θειικό δωδεκύλιο) λύνει τη κυτταρική μεμβράνη και αποδιατάσει τις πρωτεΐνες. Στο τελευταίο καθώς και στη διάσπαση των φωσφορικών δεσμών του RNA βοηθάει το υψηλό pH (>12) που οφείλεται στη παρουσία του υδροξειδίου του θείου. Το NaOH συμμετέχει στη καταστροφή των πρωτεϊνών, λόγω της ικανότητάς του να καταστρέφει τους δεσμούς υδρογόνου και Van der Waals.
- Προστίθενται 150μl παγωμένου διαλύματος III, το οποίο εξουδετερώνει τις αλκαλικές συνθήκες που δημιουργήθηκαν από το υδροξείδιο του θείου, ακολουθεί ανάμιξη με vortex για 3-4 sec και το μείγμα τοποθετείται στο πάγο για λιγότερο από 10 λεπτά. Το κάλιο προκαλεί τη κατακρήμνιση του SDS όπως και των πρωτεϊνών και υπολειμμάτων της μεμβράνης που είναι συνδεδεμένα σε αυτό. Το χρωμοσωμικό DNA

είναι ενωμένο σε αρκετά σημεία της κυτταρικής μεμβράνης κι επομένως κατακρημνίζεται και αυτό.

- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 12.000 rpm για 5 λεπτά, η οποία προκαλεί και τη κατακρήμνιση επιπλέον χρωμοσωμικού DNA. Το υπερκείμενο, στο οποίο παραμένει διαλυμένο το πλασμιδιακό DNA, μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι erpendorf.
- Προστίθενται 2 όγκοι αιθανόλης 100% (900μl) ώστε να αφαλατώσουμε και να επανακτήσουμε τα νουκλειικά οξέα και αφού παραμείνει για 2-3 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου, φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 5 λεπτά.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό, προστίθεται στο ίζημα ένας όγκος αιθανόλης 70% (500μl) και φυγοκεντρείται στις 12.000 rpm για 5 λεπτά.
- Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό. Το ίζημα, το οποίο αποτελεί το πλασμιδιακό DNA, ξηραίνεται και αναδιαλύεται σε 20μl TE που περιέχει πανγκρεατική RNAάση (20μg/ml), ελεύθερη DNAάσης.
- Το δείγμα αποθηκεύεται στους -20oC.

* Τα δείγματα μας πέπτονται με ενδονουκλεάσες περιορισμού για να διαπιστωθεί η ύπαρξη ενθέματος.

7. ΠΈΨΗ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΥ DNA ΜΕ ENZYMA ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

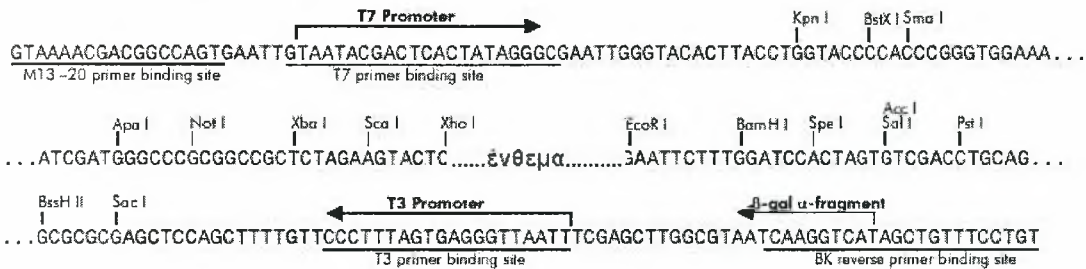
Πολλά βακτήρια παράγουν ένζυμα τα οποία τα προστατεύουν από τους φάγους που εισβάλλουν στο εσωτερικό τους με την αποικοδόμηση των μορίων DNA των φάγων. Τα ένζυμα αυτά ονομάζονται ενδονουκλεάσες περιορισμού και η δράση τους εστιάζεται στη διάσπαση φωσφοδιεστερικών δεσμών που περιβάλλονται από εξειδικευμένες αλληλουχίες βάσεων, δημιουργώντας έτσι τμήματα γενετικού υλικού με τυφλά ή προεξέχοντα άκρα ανάλογα με την αλληλουχία που αναγνωρίζουν. Η δράση του κάθε ενζύμου εξαρτάται από την επιλογή του ρυθμιστικού διαλύματος, τα οποία διαφέρουν κυρίως στη συγκέντρωση NaCl που περιέχουν, ενώ το ποσό του ενζύμου που θα χρησιμοποιηθεί εξαρτάται από την ενεργότητα του ενζύμου και την

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

ποσότητα τού προς πέψη DNA. Ως μονάδα (unit) ενζύμου ορίζεται συνήθως το ποσό του ενζύμου (σε αντίδραση 20μl) που απαιτείται για την πέψη 1μg DNA (40kb) σε μία ώρα στην απαιτούμενη θερμοκρασία (Sambrook et al., 1989).

Οι ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν για τη πέψη του πλασμιδιακού DNA και την εξαγωγή του ενθέματός μας είναι το EcoRI και το XhoI που αναγνωρίζουν τις αλληλουχίες 5'...G↓AATTC...3' και 5'...T↓CTAGA...3', αντίστοιχα. Οι συγκεκριμένες αλληλουχίες βρίσκονται μόνο σε δύο σημεία μέσα στον πολυσυνδέτη, εκατέρωθεν του ενθέματός μας, αλλά δε γνωρίζουμε αν υπάρχουν και μέσα σε αυτό (Εικ.14).

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



Εικόνα 14 : Το κάθε ένθεμα εισάγεται στον πολυσυνδέτη μεταξύ των ενζύμων EcoRI και XhoI

Διαλύματα – Υλικά

Απομονωμένο πλασμίδιο	Σωληνάκια τύπου erppendorf
Ένζυμο EcoRI Fermentas (10U/μl)	Επωαστήρας
Ένζυμο XbaI Fermentas (10U/μl)	Αυτόματες μικροπιπέτες με ακροφύσια των 20μl
Ρυθμιστικό διάλυμα Tango 10X	
dd H ₂ O	

Πορεία

- Ο τελικός όγκος της αντίδρασης είναι 15μl, η ποσότητα του DNA και των ενζύμων που θα χρησιμοποιηθούν για τη κάθε μία αντίδραση είναι 3μl και 0.2μl (από το καθένα) αντίστοιχα.
- Το DNA του κάθε δείγματος τοποθετείται σε ένα σωληνάκι erppendorf και διατηρείται σε πάγο

- Προστίθενται 8.6ml dd H₂O, 3ml ρυθμιστικό διάλυμα και τελευταία τα δύο ένζυμα.
- Το μίγμα επωάζεται για 1 ώρα στους 37°C.

* Τα προϊόντα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης για τον έλεγχο του διαχωρισμού των προϊόντων.

8. ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ DNA ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης είναι μία μέθοδος διαχωρισμού και εικονισμού κομματιών DNA, τα οποία προήλθαν από πέψη του DNA με ένζυμα περιορισμού. Τα κομμάτια διαχωρίζονται λόγω του φορτίου και του μεγέθους τους, αναγκάζοντάς τα να κινηθούν μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται παρέχοντας ηλεκτρικό ρεύμα (voltage) σε ένα ηλεκτρολυτικό διάλυμα (buffer). Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα των μορίων είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού τους βάρους και εξαρτάται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης, δηλαδή από το μέγεθος των πόρων που σχηματίζουν τα μόρια μεταξύ τους. Έτσι για τμήματα DNA μεγέθους από 0.5-5kb χρησιμοποιείται gel 1% αγαρόζης, για μέγεθος 0.1-0.5 kb 1.3% αγαρόζης, για κομμάτια μεγαλύτερα από 5 kb 0.8 αγαρόζη όπως και για άκοπα πλασμίδια (Sambrook et al., 1989).

Διαλύματα – Υλικά

Δείγματα DNA που έχουν υποστεί πέψη

Αγαρόζη

Φούρνος μικροκυμάτων

Διάλυμα TBE Buffer 0.5X

Πιάτο ηλεκτροφόρησης

Βρωμιούχου αιθιδιο

Χτενάκια

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Μάρτυρας (DNA ladder)

Αυτόματες μικροπιπέτες με ακροφύσια

Κωνική φιάλη των 250

των 20ml

Διάλυμα TBE 0.5X : 54gr Tris-base, 27.5gr βορικό οξύ, 20ml EDTA 0.5M αναμιγνύονται σε 800ml απιονισμένου νερού. Ρυθμίζεται το pH στο 8.0 και συμπληρώνεται το διάλυμα σε τελικό όγκο 1000ml με απιονισμένο H₂O.

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων : 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% xylene cyanol FF, 30% γλυκερόλη.

Πορεία

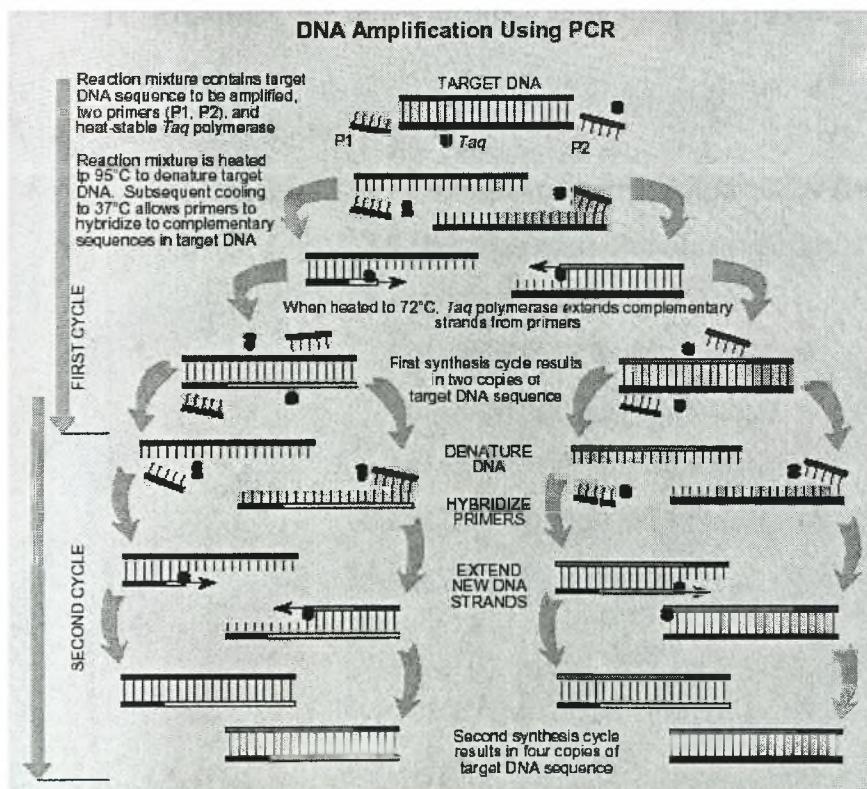
- Σε 100ml διαλύματος TBE 0.5X (εντός κωνικής φιάλης) προστίθεται 1gr αγαρόζης έτσι ώστε να παρασκευαστεί gel αγαρόζης 1%.
- Το διάλυμα θερμαίνεται σε φούρνο μικροκυμάτων ώσπου να τηχθεί η αγαρόζη και το διάλυμα να γίνει τελείως διαυγές.
- Το διάλυμα αφήνεται να κρυώσει περίπου στους 55°C και προστίθεται 2ml βρωμιούχου αιθιδίου. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια χρωστική, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων που βρίσκονται στο κέντρο της έλικας του DNA. Ένα μόριο χρωστικής συνδέεται σε μία βάση.
- Τα χτενάκια τοποθετούνται στο καλούπι-εκμαγείο ηλεκτροφορήσεως και στη συνέχεια μεταφέρεται σε αυτό το διάλυμα της τηγμένης αγαρόζης, το οποίο αφήνεται να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 20 λεπτά.
- Τα χτενάκια απομακρύνονται όταν μορφοποιηθεί το διάλυμα και το καλούπι-εκμαγείο τοποθετείται στην ηλεκτροφορητική συσκευή, η οποία είναι πληρωμένη με διάλυμα TBE 0.5X τόσο ώστε να επικαλύπτει το gel.
- Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων (1μl ανά 6μl δείγματος). Το συγκεκριμένο διάλυμα προσθέτει χρώμα στο δείγμα και αυξάνει την πυκνότητά του λόγω της γλυκερόλης, ώστε να φορτωθεί ευκολότερα στο πηγαδάκι. Επιπλέον, στις συνθήκες ηλεκτροφορήσεως το διάλυμα είναι αρνητικά φορτισμένο και επομένως κινείται προς την ίδια κατεύθυνση με το DNA. Αυτό επιτρέπει τον έλεγχο της προόδου της ηλεκτροφόρησης.
- Τα δείγματα και ο μάρτυρας φορτώνονται στα πηγαδάκια και ηλεκτροφορούνται σε σταθερή τάση 100V για 40 περίπου λεπτά. Ο μάρτυρας μας διευκολύνει στον υπολογισμό της ποσότητας και του μεγέθους των διάφορων ζωνών.
- Η εμφάνιση των ζωνών (=τμήματα DNA) πραγματοποιείται με την έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία. Η UV ακτινοβολία, η οποία

απορροφάται είτε από το DNA στα 260nm και μεταβιβάζεται στο βρωμιούχο αιθίδιο είτε από την ίδια τη χρωστική στα 300nm και 360nm, εκπέμπεται στα 590nm στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα να είναι ορατά τα διάφορα τμήματα του DNA ως ζώνες.

* Εάν διαπιστωθεί ότι τα πλασμίδια μας περιέχουν το ένθεμα ακολουθεί ο προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής τους.

9. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Η PCR είναι μία μέθοδος που παρέχει τη δυνατότητα εκλεκτικού πολλαπλασιασμού ενός τμήματος DNA, το οποίο ορίζεται από ένα ζεύγος εκκινήτων (primers) για το 5' και το 3' άκρο, με τη δράση μιας ειδικής θερμοανθεκτικής DNA πολυμεράσης. Η αντίδραση PCR γίνεται εξολοκλήρου in vitro και απαιτεί επιπλέον διάλυμα ελευθέρων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζινουκλεοτιδίων (dNTPs) για την επέκταση των θυγατρικών αλυσίδων καθώς και διάλυμα ιόντων Mg^{+2} , τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης (Εικ. 15) (Casey, 1992).



Εικόνα 15 : Σχηματική αναπαράσταση της PCR.

Πορεία αντίδρασης

- Το δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβοζινουκλεοτίδια, τα δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (primers) και την πολυμεράση.
- Το δείγμα θερμαίνεται στους 94-95°C για να αποδιαταχθεί το DNA (denaturation).
- Το δείγμα ψύχεται στους 55-65°C (ανάλογα με την αλληλουχία των εκκινητών) για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA (annealing). Η πρόσδεση των εκκινητών γίνεται σε θερμοκρασία περίπου 5°C πιο χαμηλά από τις θερμοκρασίες τήξης (T_m) των ολιγονουκλεοτιδίων.
- Ακολουθεί πολυμερισμός από την DNA πολυμεράση στους 72°C ώστε να σχηματιστεί η συμπληρωματική αλυσίδα ως προς την αλυσίδα μήτρα. Οι DNA πολυμεράσες απομονώνονται από θερμόφιλα βακτήρια, όπως το είδος *Thermus aquaticus* (Taq), ή από Αρχαιοβακτήρια που επίσης επιβιώνουν σε υψηλές θερμοκρασίες (90°C).
- Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για αρκετούς κύκλους έως ότου συντεθούν δίκλινα μόρια DNA, αντίγραφα της αλληλουχίας στόχου. Η αντίδραση είναι εκθετική. Ένα μόριο DNA δίνει μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης 2^{30} (περίπου 10^9) μόρια DNA.

Συνθήκες και αντιδραστήρια PCR

Η αντίδραση περιέχει : 2μl εκλούμενων φαγοσωματιδίων (παράγραφος 5)

2.5 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου 10X (Promega)

1.5μl διάλυμα $MgCl_2$ (25Mm)

2μl dNTPs (2.5mM το καθένα)

1μl εκκινητής T3 (10pmol/μl)

1μl εκκινητής T7 (10pmol/μl)

0.2μl Taq πολυμεράση 5u/μl (Promega)

14.8μl ddH₂O

τελικός όγκος : 25μl

Πρόγραμμα PCR

Αρχική αποδιάταξη	:	94°C	για	4min	→	1 κύκλος
Αποδιάταξη DNA	:	94°C	για	45sec	}	34 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	:	48°C	για	1min		
Επιμήκυνση αλυσίδων	:	72°C	για	2min		
Τελική επιμήκυνση	:	72°C	για	10min	→	1 κύκλος

Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμικό ανακυκλωτή Mastercycler® gradient.

* Τα δείγματα διαχωρίζονται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

10. ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΜΟΡΙΩΝ DNA ΑΠΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

Η ανάκτηση μορίων DNA μετά από ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιήθηκε με χρήση του kit Nucleospin extract της εταιρείας Macherey Nagel. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίζεται στο εγχειρίδιο της κατασκευάστριας εταιρείας.

Διαλύματα-Υλικά

Σωληνάκια τύπου erpendorf

Φυγόκεντρος

Υδατόλουτρο

Αυτόματες μικροπιπέτες με ακροφύσια

Ζυγός

των 200μl και 1000μl

Διάλυμα NE : 5mM Tris-HCl, pH 8.5.

Διαλύματα NT και NT3 : Η ακριβής σύσταση των διαλυμάτων δεν δίνεται από την εταιρεία.

Πορεία

- Η επιθυμητή ζώνη που αντιστοιχεί στο κλωνοποιημένο ένθεμα αποκόπτεται από το πήκτωμα, μεταφέρεται σε σωληνάκι erpendorf και προσδιορίζεται το βάρος του.
- Προστίθενται 200μl διαλύματος NT ανά 100mg πηκτώματος.
- Το μείγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 50°C μέχρις ότου αποδιαταχθεί πλήρως η αγαρόζη (περίπου 10 λεπτά).

- Το διάλυμα φορτώνεται σε ειδική στήλη που τοποθετείται σε σωληνάκι συλλογής και φυγοκεντρείται στις 11.000rpm για 1min.
- Απομακρύνεται η διαλυμένη αгарόζη από το σωλήνα συλλογής και προστίθενται στη στήλη 600μl αλκοολούχου διαλύματος NT3. Το DNA υπό όξινες συνθήκες δεσμεύεται στη στήλη.
- Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 11.000rpm για 1 λεπτό και επιπλέον 2 λεπτά, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η αιθανόλη.
- Το DNA εκλούεται κάτω από χαμηλής ισχύος ιοντικές συνθήκες και ελαφρώς αλκαλικό pH με την προσθήκη στη στήλη 50μl διαλύματος έκλουσης NE.
- Η στήλη παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 1 λεπτό και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 12.000rpm για 2 λεπτά.

* Το DNA μπορεί να αποσταλεί για ανάλυση της πρωτοδιάταξης των κλωνοποιημένων ενθεμάτων.

11. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΟΔΙΑΤΑΞΗΣ ΤΟΥ DNA

Ο καθορισμός της πρωτοταγούς δομής του DNA πραγματοποιείται με τη δεοξυμέθοδο του Sanger, η οποία πήρε το όνομα της από τον άνθρωπο που την επινόησε, τον F.Sanger. Η μέθοδος βασίζεται στην ενζυμική σύνθεση σημασμένου DNA η οποία τερματίζει με τη χρήση διδεοξυολιγονουκλεοτιδίων. Χρησιμοποιώντας ως μήτρα μονόκλωνο DNA συντίθεται μία αλυσίδα DNA από μία DNA πολυμεράση *in vitro*. Η σύνθεση της αλυσίδας αρχίζει από το 3' άκρο ενός εκκινήτη και σταματά με την ενσωμάτωση ενός διδεοξυνουκλεοτιδίου. Τα διδεοξυνουκλεοτίδια (ddNTPs) είναι ανάλογα των νουκλεοτιδίων στα οποία η 3-OH ομάδα έχει αντικατασταθεί με H και έτσι δε μπορεί να δημιουργηθεί νέος φωσφοδιεστερικός δεσμός με το επόμενο νουκλεοτίδιο που θα πάει να ενσωματωθεί στην αλυσίδα. Γίνονται 4 ξεχωριστές αντιδράσεις, αντίστοιχα για κάθε βάση, στις οποίες υπάρχει κάθε φορά ένα διαφορετικό ddNTP. Η αναλογία διδεοξυνουκλεοτιδίων προς κανονικά νουκλεοτίδια διαμορφώνεται έτσι ώστε να εξασφαλιστεί σωστή συσσωμάτωσή τους στις αυξανόμενες

αλυσίδες. Τα προϊόντα των αντιδράσεων αναλύονται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου από όπου προκύπτει και η αλληλουχία των μορίων DNA (Casey, 1992).

Η αλληλούχιση των διάφορων ενθεμάτων που απομονώθηκαν πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen, η οποία εδρεύει στην Κορέα. Για την αντίδραση της αλληλούχισης απαιτούνται 1000ng DNA από κάθε δείγμα. Η ποσοτικοποίηση των δειγμάτων έχει γίνει από ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Υπολογίζεται η ποσότητα που απαιτείται από κάθε δείγμα και τοποθετείται σε σωληνάκια τύπου erpendorf. Τα δείγματα αποστέλλονται στην εταιρεία.

12. ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Οι αλληλουχίες των δειγμάτων επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα Omiga και έγινε σύγκριση των αλληλουχιών με γνωστές αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος Blast.

13. ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΠΟΛΥΤΑΙΝΙΚΩΝ ΧΡΩΜΟΣΩΜΙΚΩΝ

ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ

Τα παρασκευάσματα πολυταινικών χρωμοσωμάτων προήλθαν από τους σιελογόνους αδένες τρίτου σταδίου προνυμφών, 8 ημερών, ακολουθώντας τη μέθοδο που περιγράφεται από τη Manragani-Tsipidou et al (1992) με ορισμένες τροποποιήσεις. Το συγκεκριμένο προνυμφικό στάδιο προτιμάται διότι οι σιελογόνοι αδένες εντοπίζονται ευκολότερα. Οι προνύμφες αναπτύχθηκαν στο εργαστήριο Εντομολογίας του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Διαλύματα – Υλικά

Διάλυμα Ringer

Διάλυμα οξικού οξέος 45%

Καλυπτρίδα

Αντικειμενοφόρος πλάκα

Διάλυμα ορσεΐνης-οξικού

Στερεοσκόπιο

Μικροσκόπιο

Διάλυμα Ringer : 6.5gr NaCl, 0.14gr KCl, 0.2gr NaKCO₃, 0.12gr CaCl₂, 0.01gr NaH₂PO₄ (pH 6.8) αναμειγνύονται σε τελικό όγκο 1000ml.

Διάλυμα ορσεΐνης-οξικού : 0.5% (w/v) προστίθενται σε 45% διαλύματος οξικού οξέος.

Πορεία

- Επάνω σε μία αντικειμενοφόρο πλάκα εξάγονται οι σιελογόνοι αδένες σε διάλυμα Ringer. Το διάλυμα Ringer χρησιμοποιείται λόγω του ότι είναι ισοτονικό και παρεμποδίζει τα ρήξη των κυτταρικών μεμβρανών.
- Απομακρύνεται το διάλυμα Ringer και προστίθεται στην αντικειμενοφόρο πλάκα, που έχει θερμανθεί (2-3 περάσματα πάνω από λύχνο Bunsen), διάλυμα ορσεΐνης-οξικού οξέος για περίπου 20 λεπτά, αποφεύγοντας τη ξήρανση του παρασκευάσματος. Η ορσεΐνη είναι η χρωστική η οποία ευθύνεται για το κόκκινο χαρακτηριστικό χρώμα των χρωμοσωμάτων κατά την μικροσκοπική παρατήρηση.
- Απομακρύνεται η χρωστική και προστίθεται διάλυμα οξικού οξέος 45% για 2 λεπτά. Το συγκεκριμένο βήμα επαναλαμβάνεται 2-3 φορές, έτσι ώστε να απομακρυνθεί πλήρως η πλεονάζουσα χρωστική.
- Επάνω από το παρασκεύασμα, το οποίο βρίσκεται σε μία σταγόνα διαλύματος οξικού οξέος 45%, τοποθετείται μία καλυπτρίδα και ακολουθεί ελαφρό κτύπημα, έτσι ώστε να σπάσουν τα κύτταρα και οι πυρήνες και να απλωθούν οι χρωμοσωματικοί βραχίονες.

* Τα παρασκευάσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν απευθείας για μικροσκοπική παρατήρηση είτε να διατηρηθούν στους 4°C.

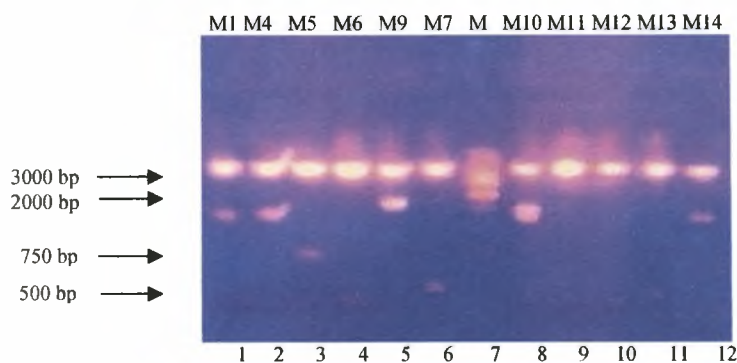
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1. Συλλογή ενθεμάτων

Η cDNA βιβλιοθήκη του δάκου *Bactrocera oleae* επεξεργάστηκε με δύο διαφορετικές μεθόδους ώστε να απομονωθούν και στη συνέχεια να μελετηθούν τα κλωνοποιημένα ενθέματα.

1.1 Απομόνωση φαγεμιδίου

Αρχικά με τη μέθοδο της *in vivo* εκτομής των ενθεμάτων από το φάγο λΖΑΡ, επιτεύχθηκε η εξαγωγή ορισμένων κλώνων υπό τη μορφή φαγεμιδίων σε κύτταρα ΧLORL. Η καλλιέργεια των κυττάρων αυτών, η απομόνωση των φαγεμιδίων και η πέψη τους με τα ένζυμα EcoRI και XhoI, των οποίων οι θέσεις κοπής βρίσκονται εκατέρωθεν του κάθε ενθέματος (εικ.14) μας έδωσε την Εικόνα 16.



Εικόνα 16 : Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αραρόζης απομονωμένων φαγεμιδίων μετά από την πέψη τους με τα περιοριστικά ένζυμα EcoRI και XhoI. Στους διαδρόμους 1-6 και 8-12 ηλεκτροφορήθηκαν τα προϊόντα της πέψης ενώ στο διάδρομο 7 βρίσκεται ο μάρτυρας. Τα βέλη υποδεικνύουν τα μεγέθη των ζωνών του μάρτυρα.

Η έντονη ζώνη, με μέγεθος ~4.5kb, που εμφανίζεται σε όλα τα δείγματα μας αντιστοιχεί στο φορέα pBK-CMV, ενώ η ύπαρξη των υπολοίπων υποδεικνύει την παρουσία κλωνοποιημένου ενθέματος στα φαγεμίδια, όπου αυτή εμφανίζεται. Στα φαγεμίδια M11 και M12 δεν ανιχνεύθηκε ένθεμα, ενώ όλα τα υπόλοιπα παρουσίασαν ένθεμα με μέγεθος που κυμαίνεται περίπου από 350bp (M6) έως 1500bp (M9). Τα φαγεμίδια επομένως τα οποία περιέχουν ένθεμα και στα οποία ακολούθησε ανάλυση της πρωτοδιάταξης τους είναι τα M1,M4,M5,M6,M7,M9,M10,M13 και M14.

Επειδή η απόδοση της *in vivo* εκτομής ήταν χαμηλή, τα φαγεμίδια δηλαδή που μπορέσαμε να εξάγουμε δεν υπερβήκαν τα 11 (εικ.16), επεξεργαστήκαμε τη

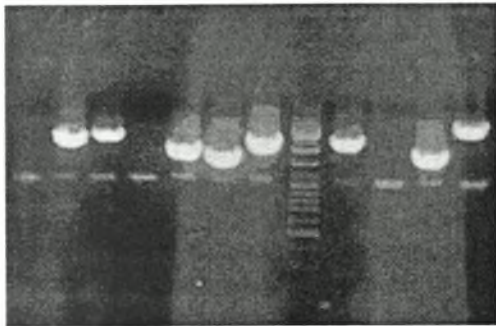
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

βιβλιοθήκη με μία ακόμη μέθοδο, απομονώνοντας DNA φάγων και ενισχύοντας με PCR την αλληλουχία των ενθεμάτων, έτσι ώστε να καταφέρουμε να συλλέξουμε περισσότερους κλώνους.

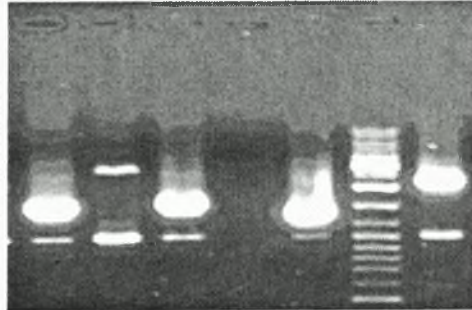
1.2 Ενίσχυση με PCR των ενθεμάτων

Μετά από επίσρωση μολυσμένων κυττάρων με βακτηριοφάγους συλλέχθηκαν 80 φάγοι. Στη συνέχεια ακολούθησε PCR ενίσχυση της αλληλουχίας των ενθεμάτων με εκκινητές τις αλληλουχίες των υποκινητών T3 και T7 που εμπρικλείουν το ένθεμα στον φορέα λZAP (εικ.14). Το αποτέλεσμα της PCR ενίσχυσης εμφανίζεται στις Εικόνες 17,18,19.

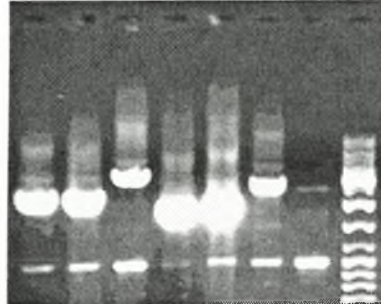
76 77 78 79 80 81 82 M 83 84 85 86



26 27 28 29 30 M 31



64 65 66 67 68 69 70 M



Εικόνες 17, 18, 19 : Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης προϊόντων PCR, η οποία πραγματοποιήθηκε με σκοπό την ενίσχυση των ενθεμάτων. Ο διάδρομος που συμβολίζεται με το γράμμα M αντιστοιχεί στο μάρτυρα. Η ζώνη που είναι κοινή σε όλα τα δείγματα αντιστοιχεί στη ζώνη των 1031bp του μάρτυρα. Οι επόμενες ζώνες του μάρτυρα που βρίσκονται πάνω από τις 1031bp αντιστοιχούν κατά σειρά στις 1200bp, 1500bp, 2000bp (έντονη), 2500bp και 3000bp (έντονη).

Οι έντονες ζώνες αντιστοιχούν στα διάφορα ενθέματα, ενώ η παρουσία της ζώνης των 1000bp σε όλα τα δείγματα αντιστοιχεί σε κάποιο μη ειδικό προϊόν. Ακόμη από την εικόνα 18 γίνεται εμφανές ότι δεν επετεύχθη ενίσχυση όλων των δειγμάτων (π.χ δείγμα:29) δε μας έδωσαν αποτελέσματα. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται σε προσθήκη μικρής ποσότητας DNA στην αντίδραση PCR. Η εκτομή των πλακών από τα τρυβλία δε μας εξασφαλίζει την «απομόνωση» ίσης ποσότητας DNA για όλα τα δείγματα διότι το μέγεθος τους διαφέρει, με αποτέλεσμα το DNA που προσθέταμε για την ενίσχυση του να ήταν ανεπαρκές. Ακόμη παρατηρήσαμε

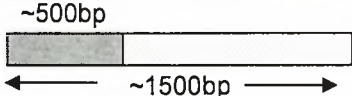
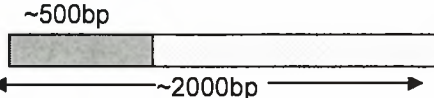
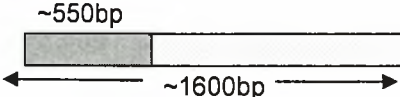
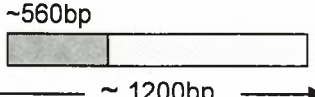
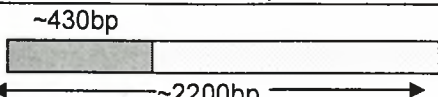
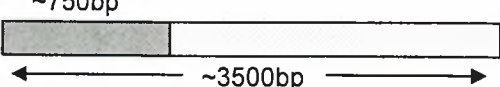
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

διαφορετικά αποτελέσματα και όσον αφορά τον τρόπο απομόνωσης. Πλάκες οι οποίες παρέμειναν σε ρυθμιστικό διάλυμα SM στους 4°C για 12 ώρες, επί το πλείστον μας έδωσαν την επιθυμητή ζώνη του ενθέματος. Αντίθετα πλάκες οι οποίες παρέμειναν σε SM για 1-2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου παρουσίασαν χαμηλότερα ποσοστά επιτυχίας. Ακόμη η ύπαρξη της ζώνης των 1000bp σε ορισμένα δείγματα χωρίς την αντίστοιχη του ενθέματος, ίσως να υποδηλώνει τη μη ύπαρξη ενθέματος σε αυτά τα δείγματα.

2. Ανάλυση της πρωτοδιάταξης των συλλεχθέντων ενθεμάτων

Συνολικά, εννέα φαγεμίδια από την πρώτη μέθοδο της in vivo εκτομής και 56 PCR προϊόντα από τη δεύτερη μέθοδο εστάλησαν στην εταιρεία Macrogen για τον καθορισμό της πρωτοταγούς τους αλληλουχίας. Μέχρι στιγμής η Macrogen απέστειλε επιτυχή προσδιορισμό για 24 δείγματα. Οι αλληλουχίες των δειγμάτων επεξεργάστηκαν στο πρόγραμμα Omiga, ενώ μέσα από την ιστοσελίδα του National Center for Biotechnology Information (NCBI) και του προγράμματος BLAST (tblastx) μας δόθηκε η δυνατότητα για αναζήτηση και σύγκριση των αλληλουχιών μας με ήδη γνωστές αποθηκευμένες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων.

Τα αποτελέσματα της αναζήτησης μας εμφανίζονται στον Πίνακα 1.

Ένθεμα	Μέγεθος	Ομοιότητα
26		LD28808p (<i>Drosophila melanogaster</i>) E value : $1e^{-24}$
31		SD01502p (<i>Drosophila melanogaster</i>) E value : $4e^{-15}$
51		Cytochrome c oxidase subunit I (<i>Bactrocera oleae</i>) E value : $2e^{-71}$
57		Cathepsin D precursor (<i>Drosophila melanogaster</i>) E value : $1e^{-25}$
65		Gamma-glutamylcysteine synthetase (D.m) E value : $3e^{-64}$
66		Polyprotein (sacbrood virus) E value : $2e^{-12}$

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

68		Pineapple eye (<i>Drosophila melanogaster</i>) E value : $7e^{-37}$
75		Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Ceratitis capitata</i>) E value : $2e^{-79}$
81		Cytochrome c oxidase subunit I (<i>Bactrocera oleae</i>) E value : $5e^{-66}$
82		Glaikit protein (<i>Drosophila melanogaster</i>) E value : $1e^{-07}$
85		Cytochrome c oxidase subunit I (<i>Bactrocera oleae</i>) E value : $8e^{-57}$
M9		Decahistidyl-kinesin light chain (expression vector pPK121) E value : $7e^{-90}$
M4		16S rRNA (mitochondrion, <i>Bactrocera oleae</i>) E value : 0.0
M14		16S rRNA (mitochondrion, <i>Bactrocera oleae</i>) E value : e^{-163}

Πίνακας 1 : Συγκεντρική παρουσίαση των αποτελεσμάτων της αναζήτησης ομοιότητας των ενθεμάτων μας με αποθηκευμένες αλληλουχίες σε τράπεζες δεδομένων. Στη πρώτη στήλη εμφανίζεται το ένθεμα, στη δεύτερη το μέγεθος του ενώ με τη γκρι περιοχή το μέγεθος της περιοχής που έχει υποστεί αλληλούχηση και στη τρίτη στήλη τα αποτελέσματα της σύγκρισης των αλληλουχιών στη βάση δεδομένων που εμφανίζουν την μικρότερη e-value. Τα υπόλοιπα 10 ενθέματα δεν αναφέρονται λόγω του ότι δεν εμφάνισαν σημαντική ομοιότητα.

Αξίζει να αναφερθούν δύο λόγια για τη λειτουργία των πρωτεϊνών που εμφανίζουν ομοιότητα με τους διάφορους απομονωμένους κλώνους :

Ένθεμα 75 : Το ένζυμο αφυδρογονάση της 3-φωσφορικής γλυκερόλης (GPDH) είναι ένα από τα αλληλοεξαρτώμενα γλυκολυτικά ένζυμα, τα οποία καταλύουν συνεχόμενες αντιδράσεις κατά μήκος του γλυκολυτικού μονοπατιού. Το μονοπάτι αυτό είναι υπεύθυνο για τη πτήση του εντόμου καθώς παρέχει στους θωρακικούς μύες την απαραίτητη ενέργεια. Ο ρόλος του συγκεκριμένου ενζύμου είναι ιδιαίτερα κρίσιμος, καθώς η απουσία του συνεπάγεται τη δυσλειτουργικότητα των υπολοίπων με επακόλουθο τη μη δυνατότητα πτήσης (Sullivan et al, 2003).

Ένθεμα 68 : Στη Δροσόφιλα και σε άλλους οργανισμούς, η ανάπτυξη των ενήλικων ατόμων από τα αυγά σχετίζεται με την εξειδίκευση των διάφορων διαιρούμενων κυτταρικών τύπων και το αυξανόμενο αριθμό κυττάρων και μέγεθος σώματος.

Πολλές ενήλικες δομές προέρχονται από τους λεγόμενους εμβρυονικούς δίσκους, τα εμβρυονικά κύτταρα δηλαδή, τα οποία πολλαπλασιάζονται και αυξάνονται κατά το στάδιο της προνύμφης χωρίς όμως να διαφοροποιούνται έως τη στιγμή της μεταμόρφωσης, όπου αντικαθιστούν τις προνυμφικές δομές από ενήλικες μέσα στο βομβύκιο. Από έρευνες διαπιστώθηκε ότι το γονίδιο *ripeapple eye* είναι απαραίτητο για την επιβίωση των κυττάρων των εμβρυονικών δίσκων και κατά συνέπεια της μορφολογίας του εντόμου καθώς άτομα με μεταλλάξεις στο γονίδιο *pie* παρατηρήθηκε υψηλός ρυθμός απόπτωσης των εμβρυονικών δίσκων (Whei Shi et al, 2003).

Ένθεμα 57 : Η καθεψίνη D επιδεικνύει δράση πρωτεάσης ασπαρτικού οξέος, διασπώντας τις πρωτεΐνες των τροφών αρχικά σε μικρότερα πεπτίδια και έπειτα στα αντίστοιχα αμινοξέα τους. Ακόμη, η λειτουργία της έγκειται στη ταχεία αποδόμηση των πρωτεϊνών με βραχύ χρόνο ζωής καθώς και την αναγνώριση και εξάλειψη των πρωτεϊνών που έχουν υποστεί βλάβη ή έχουν διπλωθεί με λανθασμένο τρόπο (Lawrence and Kounda, 2002).

Ένθεμα 65 : Η γ-γλουταμιλοκουστεινική συνθετάση (GCS) καταλύει ένα κρίσιμο, περιορισμένου ρυθμού βήμα στη σύνθεση της γλουταθειόνης καθώς αναστέλλεται από τη υψηλή συγκέντρωση της γλουταθειόνης. Η γλουταθειόνη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε πολλές βιολογικές λειτουργίες όπως στη σύνθεση πρωτεϊνών και του DNA, στην αποτοξίνωση των ξενοβιοτικών ουσιών και ελεύθερων ριζών καθώς και σε πολλές αναγωγικές αντιδράσεις (Saunders and McLellan, 2000).

Ένθεμα 66 : Ο ιός *sacbrood* (SBV) είναι ένας RNA ιός, ο οποίος προκαλεί θανάσιμη μόλυνση στις λάρβες των μελισσών. Λάρβες οι οποίες έχουν προσβληθεί από το συγκεκριμένο ιό αποτυγχάνουν να βομβυκιωθούν, αλλάζουν απόχρωση από λευκές σε ωχρό κίτρινο και τελικά πεθαίνουν (Ghosh RC et al, 1999).

Ένθεμα 82 : Το γονίδιο *glaiKit* στο στάδιο της προ-γαστροποίησης του εμβρύου εντοπίζεται σε όλες τις περιοχές και σε όλα τα στάδια, αναδεικνύοντας μητρική προέλευση του γονιδίου. Καθώς όμως μεγαλώνει το έμβρυο η έκφρασή του περιορίζεται σε ορισμένες περιοχές έως ότου περιοριστεί στους νευροβλάστες στους οποίους έγκειται και η δράση του διαχωρίζοντας τους σε στρώματα (Dunlop et al., 2000).

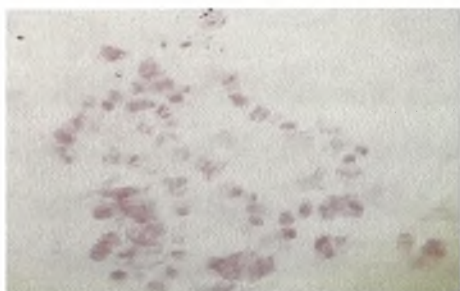
Ενθέματα 51, 81, 85 : Η κυτοχρωμική οξειδάση είναι το τελευταίο ένζυμο της αναπνευστικής αλυσίδας, το οποίο συναντάται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και στα βακτήρια. Ρόλος του ενζύμου είναι αρχικά η ισχυρή πρόσδεση του O_2 , έως ότου εξασφαλιστούν και τα τέσσερα ηλεκτρόνια που απαιτούνται για τη μετατροπή του σε δύο μόρια H_2O , και ακολούθως η παροχή των ηλεκτρονίων αυτών στο O_2 , ώστε να αναχθεί σε H_2O (Alberts et al., 1998).

Ένθεμα M9 : Οι κινησίνες είναι κινητήριες πρωτεΐνες που κινούνται κατά μήκος κυτταροπλασματικών μικροσωληνίσκων μεταφέροντας μερικά συστατικά του κυττάρου, όπως ένα κυστίδιο ή οργανίδιο. Έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στη *Δροσόφιλα* έδειξαν ότι η κινησίνη II απαιτείται για τη μεταφορά της ακετυλοτρανσφεράσης της χολίνης μεταξύ των νευρώνων (Ray et al., 1999).

Ενθέματα 26 και 31 : Για τις αντίστοιχες πρωτεΐνες των ενθεμάτων αυτών, παρ' ότι εμφανίζουν μεγάλη ομοιότητα με αλληλουχίες στη βάση δεδομένων, δεν προκύπτει κάποια γνωστή λειτουργία.

3. Πολυταινικά χρωμοσώματα

Τα πολυταινικά χρωμοσώματα, στα οποία πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση, προήλθαν από τους σιελογόνους αδένες τρίτου σταδίου προνυμφών. Η παρασκευή τους περιγράφεται στη παράγραφο 13 των Υλικών και Μεθόδων ενώ η ανάλυση τους στηρίχθηκε στο άρθρο της Mavragani (Mavragani et al, 1992). Παρά το γεγονός ότι τα πολυταινικά χρωμοσώματα του δάκου είναι μέτριας ποιότητας, αντίθετα με τα χρωμοσώματα της *Δροσόφιλας*, καταφέραμε να φωτογραφίσουμε ορισμένα παρασκευάσματα, στα οποία ο χαρακτηρισμός των χρωμοσωμάτων ήταν εφικτός, όπως οι παρακάτω (Εικ.20) :



A



B



C

Στο παρασκεύασμα A της εικόνας 20 παρουσιάζεται ένας ανοιγμένος πυρήνας, στον οποίο φαίνονται οι δέκα χρωμοσωμικοί βραχίονες. Το παρασκεύασμα B αντιστοιχεί στον δεξιό βραχίονα του τρίτου χρωμοσώματος του δάκου, ενώ στο παρασκεύασμα Γ εμφανίζεται ο αριστερός βραχίονας του τρίτου χρωμοσώματος.

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας επιτεύχθηκε η απομόνωση 80 τυχαίων cDNA κλώνων από βιβλιοθήκη του δάκου σε φορέα λΖΑΡ. Οι απομονώσεις πραγματοποιήθηκαν με 2 μεθόδους από τις οποίες η μέθοδος της *in vivo* εκτομής δεν μας έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα, διότι ενώ αναμέναμε ένα πλήθος φαγεμιδίων στη πραγματικότητα λάβαμε μόνο 11, και στους δύο εκ των οποίων δεν ανιχνεύθηκε ένθεμα. Το γεγονός ότι η απόδοσή της δεν ήταν υψηλή ίσως να οφείλεται σε λανθασμένο υπολογισμό της ποσότητας των κυττάρων που έπρεπε να προστεθούν με αποτέλεσμα να μην αντιπροσωπεύτηκε σωστά η βιβλιοθήκη. Η παρασκευή τους είχε προηγηθεί μερικές ημέρες κι ίσως η απόδοση τους μειώθηκε. Όσον αφορά τη δεύτερη μέθοδο της απ' ευθείας PCR ενίσχυσης των ενθεμάτων από τους φάγους, η ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της ενίσχυσης ανέδειξε 69 κλώνους. Από αυτούς, οι 56 κλώνοι περιείχαν ενθέματα που το μήκος τους κυμαινόταν από 350bp έως 4000bp, ενώ στους εναπομείναντες 13 δεν ανιχνεύθηκε ένθεμα. Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του 5' άκρου των ενθεμάτων αυτών δεν ήταν ικανοποιητικός για όλα τα δείγματα, γεγονός που αποδόθηκε από την εταιρεία αλληλούχισης (Macrogen) στη μικρή ποσότητα του DNA και συνεπώς στη δική μας υπερεκτίμηση της ποσότητας του DNA που περιείχαν οι ζώνες των διάφορων ενθεμάτων κατά τον ηλεκτροφορητικό τους διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης. Ενδεικτικά, από τους 65 κλώνους που στάλθηκαν, ικανοποιητική αλληλούχιση για ανάλυση λάβαμε μόνο για τους 24. Συγκρίνοντας την επαγόμενη αμινοξική ακολουθία των κλώνων αυτών με ήδη γνωστές αποθηκευμένες αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων διαπιστώθηκε ότι τουλάχιστον 37.5% των κλώνων (9) έχουν στατιστικά σημαντική ομοιότητα με γνωστούς γονιδιακούς τόπους σε βάσεις δεδομένων, ενώ 10 κλώνοι (42%) δεν εμφάνισαν ομοιότητα (πολύ υψηλό *e value*). Επιπλέον 3 κλώνοι (12.5%) ήταν μετάγραφα του μιτοχονδριακού γονιδίου της κυτοχρωματικής *c* οξειδάσης I (COI), ενώ ακόμη 2 κλώνοι (8%) παρουσίαζαν ομοιότητα με το μιτοχονδριακό 16S rRNA. Το γεγονός αυτό μπορεί να δικαιολογηθεί εφόσον το 16S rRNA είναι πολυαδενυλιωμένο και συνεπώς είναι αναμενόμενο να περιέχεται στη cDNA βιβλιοθήκη. Αντίθετα, όσο αφορά τους κλώνους της κυτοχρωματικής *c* οξειδάσης I (COI) είναι ανερμηνεύσιμο το γεγονός ότι περιέχονται σε μία cDNA βιβλιοθήκη. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από άλλους

ερευνητές όπου πάνω από 40% των τυχαίων cDNA κλώνων αποδείχθηκε ότι αντιπροσώπευαν μιτοχονδριακές αλληλουχίες (Li et al., 1997).

Από τα αποτελέσματα της αναζήτησης ομοιότητας των αλληλουχιών σε τράπεζες δεδομένων, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ομοιότητα του ενθέματος 66 με μία πολυπρωτεΐνη του ιού *sacbrood* καθώς και του ενθέματος 57 με την καθεψίνη D της Δροσόφιλας. Ο ιός *sacbrood* είναι ένας RNA ιός και έτσι είναι πιθανόν το γενετικό του υλικό να έχει απομονωθεί με το mRNA του δάκου κατά τη δημιουργία της cDNA βιβλιοθήκης. Δεν μπορούμε όμως να αποκλείσουμε και το ενδεχόμενο ο ιός να έχει ενσωματωθεί στο γονιδίωμα του εντόμου μας με οριζόντια μεταφορά. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να αποτελέσει σημαντικό εργαλείο για τη μεταφορά ξένου γενετικού υλικού στο δάκο. Θα μπορούσε επίσης να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση φυλογενετικών σχέσεων του είδους, όπως έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν το στοιχείο P ή το *mariner* στη *Drosophila* (Maruyama et Hartl, 1991; Clark et Kidwell, 1997). Όπως και να έχει το ζήτημα όμως, περαιτέρω μελέτη του ιού αυτού θα ήταν ενδιαφέρουσα, στο βαθμό μάλιστα που ελάχιστα είναι γνωστά για ιούς που προσβάλλουν το έντομο αυτό.

Όσον αφορά τη καθεψίνη D, γνωρίζοντας την αλληλουχία της αντίστοιχης πρωτεΐνης στο δάκο θα μπορούσαμε να αναπτύξουμε νέες μεθόδους καταπολέμησής του, δημιουργώντας αναστολείς του ενζύμου. Η δημιουργία, με μεθόδους της γενετικής μηχανικής, διαγονιδιακών ελαιόδεντρων τα οποία θα περιείχαν αναστολείς της καθεψίνης D, θα οδηγούσε σε μείωση των πληθυσμών του εντόμου. Αυτό θα επιτυγχάνονταν διότι καθώς ο δάκος θα τρέφονταν από τον ελαιόκαρπο, θα παρεμποδιζόταν η δράση της συγκεκριμένης πρωτεΐνης. Η αναστολή αυτή θα είχε ως συνέπεια τη μείωση της ποσότητας των πρωτεϊνών της τροφής που θα μπορούσαν να αποδομηθούν. Έτσι, η συνεχής μηχανική επαφή της τροφής με τα επιθηλιακά κύτταρα του στομάχου θα οδηγούσαν στη συνεχή διέγερσή τους με αποτέλεσμα την αύξηση της έκκρισης των πεπτικών ενζύμων. Η αναστολή, όμως, της καθεψίνης θα οδηγούσε σε έλλειψη των αμινοξέων που, υπό κανονικές συνθήκες, ο οργανισμός προμηθεύεται από τη δράση της. Το έντομο τελικά θα γινόταν αδύναμο, θα είχε καθυστερημένη ανάπτυξη και τελικά θα επερχόταν ο θάνατός του.

Τέλος, θα πρέπει να επισημάνουμε ότι στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας οι πληροφορίες που αποκομίσαμε συνεισφέρουν σε δύο κύριους τομείς. Πρώτον, οι cDNA κλώνοι που μερικά χαρακτηρίσαμε είναι από τις ελάχιστες

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

αλληλουχίες του εντόμου αυτού που υπάρχουν στη διεθνή βιβλιογραφία. Η ομοιότητά τους με γονίδια γνωστής λειτουργίας μας δίνει ενδιαφέρουσες προοπτικές για πιθανές χρήσεις των αντίστοιχων γονιδίων του δάκου σε διάφορες μελέτες όπως αναφέρεται παραπάνω. Και δεύτερον, υπάρχει τώρα η δυνατότητα φυσικής χαρτογράφησης του γονιδιώματος του δάκου, μέσω του καθορισμού της θέσης των συλλεχθέντων cDNA κλώνων στους βραχίονες των πολυταινικών χρωμοσωμάτων, έτσι ώστε να αποτελέσουν χρήσιμα εργαλεία για περαιτέρω γενετικές ή μοριακές αναλύσεις.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K. and Walter P. Essential Cell Biology, An introduction to the Molecular Biology of the Cell. *Garland Publishing*, (1998).
2. Ashburner M. Mapping insect genomes. In: *Insect Molecular Science*, eds. J.M. Crampton and P. Eggleston. Academic Press, pp: 51-71 (1992).
3. Bueno P. and Jones O. Alternative methods for controlling the olive fruit fly involving semiochemicals. *IOBC wprs Bulletin* 25 (2002).
4. Casey D. "Primer on Molecular Genetics" *DOE Human Genome 1991-92 Program Report* (1992).
5. Clark JB et Kidwell MG. A phylogenetic perspective on P transposable element evolution in *Drosophila*. *PNA's*, 94, 11428-33 (1997).
6. Dunlop J, Corominas M. and Serras F. The novel gene *glaiKit*, is expressed during neurogenesis in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Mechanisms of Development*, 96, 133-136 (2000).
7. Economopoulos P. and Loukas M. ADH allele frequency changes in olive fruit flies shift from olives to artificial larval food and vice versa, effect of temperature. *Entomol. Exp. Appl.* 40, 215-221 (1986).
8. Economopoulos P, Avtzis N, Zervas G, Tsitsipis J, Haniotakis G, Tsiropoulos G and Manoukas A. *Z. angew. Ent.*, 83, 201-215 (1977).
9. Επιμελητήριο Μεσσηνίας, RIPE Καινοτόμες Ενέργειες (ΕΤΠΑ 2000-2006), 2003.
10. Frizzi G., Springhetti A. Prime ricerche citogenetiche sul "*Dacus oleae* Gmel". *Ric. Sci.* 23: 1613-1620 (1953).
11. Ghosh RC, Ball BV, Willcocks MM and Carter MJ. The nucleotide sequence of sacbrood virus of the honey bee: an insect picorna-like virus. *J. Gen Virol*, 80, 1541-9 (1999).
12. IAEA (1998). Genetic engineering technology for the improvement of the sterile insect technique. Proceedings of a final Research Co-ordination Meeting organised by the joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture. Viena, 21-25 November, 1994.
13. Katsoyannos P. Olive pests and their control in the Near East. *FAO Paper* (1992).
14. Krimbas C.B. A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Trypetidae): the salivary gland and mitotic chromosomes. *Caryologia* 16: 371-376 (1963).
15. Lawrence P. and Koundal K.R. Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects. *Electronic Journal of Biotechnology*, 5 (2002).
16. Li S, Liu N, Zadworny D. and Kuhnlein. Genetic variability in white Leghorns revealed by chicken liver Expressed Sequence Tags. *Poultry Science*, 77, 134-139 (1998).
17. Loukeris T.G., Livadaras I., Arcà B., Zabalou S., Savakis C. Gene transfer into the medfly, *Ceratitis capitata*, with a *Drosophila hydei* transposable element. *Science* 270: 2002-2005 (1995).
18. Macgregor H. and Varley J. Working with animal chromosomes. *John Wiley and Sons Ltd* (1983).
19. Maruama K. et Hartl DL. Evolution of the transposable element mariner in *Drosophila* species. *Genetics*, 128, 319-329 (1991).
20. Mavragani-Tsipidou P., Karamanlidou G., Zacharopoulou A., Koliais S., Kastritsis C. Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genome* 35: 373-378 (1992).

21. Mazomenos B.E. *Dacus oleae*. In: World crop pests. Vol.3B. Edited by A.S. Robinson and G. Hooper. *Elsevier Science Publishers B.V.*, Amsterdam .pp: 169-177 (1989).
22. Meats A. Abiotic mortality factors -temperature. In: World crop pests. Vol.3B. Edited by A.S. Robinson and G Hooper. *Elsevier Science Publishers B.V.*, Amsterdam .pp: 229-238 (1989).
23. Patrino-Georgoulas M., Souliotis B.L., Dimitriadis G.J. A study on the developmental appearance of serum proteins and its m RNA in the insect *Dacus oleae*. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B: 179-188 (1987).
24. Ray K, Perez S, Yang Z, Xu J, Ritchings B, Steller H. and Goldstein L. Kinesin II is required for Axonal Transport of Choline Acetyltransferase in *Drosophila*. *The Journal of Cell Biology*, 147, 507-518 (1999).
24. Rice R. Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. *KAC Plant Protection Quarterly* 10 (3) (2000).
25. Robinson A.S. and A. Zacharopoulou Review of Session VI, Genetics/Biochemistry. In: Fruit Fly Pests. A word assessment of their biology and management. Eds. B.A. McPheron and G.J. Steck. St. Lucie Press, FL, USA. pp: 199-203 (1996).
26. Robinson S.A. Mutations and their use in insect control. *Mutation Research* 511, 113-132 (2002).
27. Romoser S.W. and Stoffolano G.J. The science of entomology. *4th edition McGraw-Hill* (1998).
28. Saccone G., Peluso I., Artiaco D., Giordano E., Bopp D., Polito L.C. The *Ceratitis capitata* homologue of the *Drosophila* sex-determining gene *Sex-lethal* is structurally conserved, but not sex-specifically regulated. *Development* 125: 1495-1500 (1998).
29. Sambrook J, Fritsch E.F. and Maniatis T. Molecular cloning A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989).
30. Saunders R. and McLennan L. Molecular cloning of *Drosophila* γ -glutamylcysteine synthetase by functional complementation of yeast mutatn. *FEBS Letters*, 467, 337-340 (2000).
31. Souliotis V.L., Dimitriadis G.J. Identification and molecular analysis of the cuticle protein genes of *Dacus oleae*. *Insect. Biochem.* 19: 499-507 (1989).
32. Souliotis V.L., Patrino-Georgoula M., Zongza V., Dimitriadis G.J. The urea-soluble low molecular weight cuticle proteins from the different stages of *Dacus oleae*. *Cell Differentiation and Development* 31:23-29 (1990).
33. Speed T.P. and Zhao H. Chromosome Maps Handbook of Statistical Genetics, 2nd Edition, John Wiley and Sons Ltd (2003).
34. Sullivan D.T., MacIntyre R., Fuda N., Fiori J, Barrila J. and Ramizel L. Analysis of glycolytic enzyme co-localization in *Drosophila* flight muscle. *The Journal of Experimental Biology* 206, 2031-2038 (2003).
35. Shi W., Stampas A., Zapata C. and Baker N. The *pineapple eye* Gene Is Required for Survival of *Drosophila* Imaginal Disc Cells. *Genetics* 165, 1869-1879 (2003).
36. Thymianou S., Mavroidis M., Kokolakis G., Komitopoulou K., Zacharopoulou A., Mintzas A.C. Cloning and characterization of a cDNA encoding a male-specific serum protein of the mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, with sequence similarity to odourant-binding proteins. *Insect Molec Biol* 7(4): 345-353 (1998).
37. Tzanakakis M.E. Small-scale rearing: *Dacus oleae*. In: Fruit flies. Their biology, natural enemies and control. (Eds. A. Robinson and G. Hooper) World Crop Pests, *ELSEVIER*, Amsterdam 3(B): 105-118 (1989).

38. Willhoeft U., Franz G. Identification of the sex determining region of the *Ceratitis capitata* Y chromosome by deletion mapping. *Genetics* 144: 737-745 (1996).
39. Zacharopoulou A., Frisardi M., Savakis C., Robinson A.S., Tolia P., Konsolaki M., Komitopoulou K., Kafatos F.C. (1992). The genome of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*: Localization of molecular markers by in situ hybridization to salivary glands polytene chromosomes. *Chromosoma* 101: 448-455.
40. Zambetaki A., Kleanthous K., Mavragani-Tsipidou P. Cytogenetic analysis of malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). *Genome* 38: 1070-1081 (1995).
41. Zambetaki A., Zacharopoulou A., Scouras Z.G., Mavragani-Tsipidou P. 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 (1999).
42. Zambetaki, A., P. Mavragani-Tsipidou & Z.G. Scouras. Heat shock response of *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) genes and proteins. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 93: 648-652 (2000).
43. Zouros E., Loukas M. Biochemical and colonization genetics of *Dacus oleae*. In: *World crop pests. Vol 3B.* Edited by A.S. Robinson and G. Hooper. *Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.* pp: 75-87 (1989).
44. Zwiebel L.J., Saccone G., Zacharopoulou A., Besansky N.J., Favia G., Collins F.H., Louis C., Kafatos F.C. The white gene of *Ceratitis capitata*: A phenotypic marker for germline transformation. *Science* 270: 2005-2008 (1995).