

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

«ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΔΑΚΟΥ, ΤΟΥ  
ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ»

ΜΑΪΟΥ ΣΟΦΙΑ

ΛΑΡΙΣΑ  
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2005

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

«ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΔΑΚΟΥ, ΤΟΥ  
ΚΥΡΙΟΤΕΡΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ»

ΜΑΪΟΥ ΣΟΦΙΑ

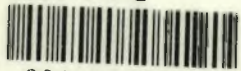
ΛΑΡΙΣΑ  
ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2005



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

Αριθ. Εισ.: 4660/1  
Ημερ. Εισ.: 13-10-2005  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2005  
ΜΑΪ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087880

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. Εισαγωγή.....	4
1.1. Ο δάκος.....	4
1.1.A. Περιγραφή.....	4
1.1.B. Ξενιστές.....	5
1.1.Γ. Κύκλος ζωής.....	6
1.1.Δ. Προκαλούμενη καταστροφή και αντιμετώπιση.....	7
1.2. Εισβολή στην Καλιφόρνια.....	9
1.3. Γενετικοί δείκτες.....	11
1.3.A. PCR-RFLPs.....	12
1.3.B. RAPDs και AFLPs.....	13
1.3.Γ. VNTRs.....	13
1.3.Δ. Το μιτοχονδριακό DNA.....	14
1.3.E. Το ριβοσωμικό DNA (rDNA).....	17
1.4. Παραδείγματα μελέτης της εισβολής, προσαρμογής και εξάπλωσης ενός είδους σε μια νέα χώρα με τη χρήση γενετικών δεικτών... Σκοπός της εργασίας.....	18 20
2. Μέθοδοι και Υλικά.....	21
2.1. Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από δάκο.....	21
2.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR).....	22
2.3. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.....	24
2.4. Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	26
2.5. Αντίδραση σύνδεσης μορίων (ligation).....	27
2.6. Μετασχηματισμός ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα <i>Esherichia coli</i> .....	28
2.7. Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων <i>Esherichia coli</i> .....	30
2.8. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια....	31
2.9. Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες.....	33
2.10. Υβριδοποίηση κατά Southern.....	33
2.10.A. Μεταφορά του DNA και σταθεροποίησή του από το πήκτωμα σε μεμβράνη.....	34
2.10.B. Σήμανση ανιχνευτή.....	35

2.10.Γ. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή.....	36
2.10.Δ. Εμφάνιση σήματος.....	37
2.11. Ανάλυση αλληλουχίας του DNA.....	39
2.12. Ανάλυση αποτελεσμάτων.....	39
3. Αποτελέσματα.....	40
3.1. Ενίσχυση με PCR τμημάτων mtDNA και rDNA.....	40
3.2. Έλεγχος προϊόντων PCR με υβριδοποίηση κατά Southern.....	43
3.3. Σύγκριση των αλληλουχιών.....	44
4. Συζήτηση.....	51
5. Βιβλιογραφία.....	53

# 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

## 1.1 Ο δάκος

Ο δάκος, *Bactrocera oleae* (Gmel) είναι το κυριότερο παράσιτο της ελιάς στις μεσογειακές χώρες. Η οικονομική ζημιά που προκαλείται από αυτό το παράσιτο εκτιμάται ότι φτάνει πάνω από 15% της συγκομιδής των ελιών [2]. Η πρώτη εμφάνισή του καταγράφεται τον 3<sup>ο</sup> αιώνα π.Χ. στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου και επίσης βρίσκεται στην Αφρική και τη Μέση Ανατολή, ενώ πρόσφατα εντοπίστηκε (1998) και στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α. Είναι γενικά αποδεκτό από τους ερευνητές ότι το έντομο αυτό μπορεί να επιζήσει και να αναπτυχθεί σε κάθε περιοχή του κόσμου, όπου υπάρχουν ελαιόδεντρα.

Ο δάκος της ελιάς ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των Δίπτερων, μέλη της οποίας είναι η Μεσογειακή μύγα, *Ceratitis capitata*, η Ασιατική μύγα φρούτων, *Bactrocera dorsalis*, η Μεξικάνικη μύγα φρούτων, *Anastrepha ludens* και άλλες ποικίλες μύγες φρούτων που προκαλούν σημαντικές οικονομικές καταστροφές [22]. Οι μύγες των φρούτων εναποθέτουν τα αυγά τους στον καρπό, στον οποίο στη συνέχεια αναπτύσσονται οι προνύμφες και τον καταστρέφουν.

### A. Περιγραφή



Η ενήλικη μύγα έχει μήκος 4-5 mm με μεγάλα κοκκινωπά μάτια και μικρές κεραίες. Ο θώρακας έχει χρώμα σκούρο καφέ με 2-4 γκριζες ή μαύρες διαμήκειες λωρίδες. Η κοιλιά είναι καφετιά με σκοτεινότερα τα τμήματα των περιοχών στις πλευρές (αυτός ο χαρακτήρας είναι αρκετά μεταβλητός). Τα φτερά του δάκου είναι διαφανή εκτός

Εικόνα 1. Ενήλικο θηλυκό άτομο δάκου από μια μικρή ευδιάκριτη μαύρη κουκίδα στις

άκρες. Οι φλέβες των φτερών είναι επίσης μαύρες. Τα θηλυκά έχουν ένα σημείο στην άκρη της κοιλίας, τον ωοαποθετήρα (ovipositor) (Εικόνα 1).



προνύμφες είναι άσπρο-κίτρινες χωρίς πόδια με ένα σημάδι στο ένα άκρο (κεφάλι) [8] (Εικόνα 2).

Εικόνα 2. Προνύμφη του δάκου

## Β. Ξενιστές

Τα φρούτα του γένους *Olea* είναι οι μόνοι γνωστοί φυσικοί ξενιστές για το δάκο. Πολλές ποικιλίες των εδώδιμων ελιών (*O. europaea*) μπορούν να μολυνθούν (Εικόνα 3).

Γενικά, ποικιλίες ελιών με μεγαλύτερα μεγέθη και με υψηλότερη περιεκτικότητα σε ύδωρ (ποικιλίες επιτραπέζιων ελιών) προτιμώνται περισσότερο από τη θηλυκή μύγα για ωοαποθέτηση από τις ποικιλίες με μικρές ελιές και χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ύδωρ (ποικιλίες λαδιού). Στην Ελλάδα, η μικρότερη



Εικόνα 3. Ελαιόδεντρο

ποικιλία λαδιού, Κορονηϊκή, είναι λιγότερο ευαίσθητη στην προσβολή από δάκο από ότι είναι η μεγαλύτερη ποικιλία Tsounati επιτραπέζιων ελιών. Αυτά τα φρούτα επιτρέπουν την καλύτερη επιβίωση και παράγουν τους μεγαλύτερους αριθμούς προνυμφών. Εντούτοις, ακόμη και ποικιλίες ελιών μικρότερου υψομέτρου είναι άριστοι ξενιστές για το δάκο. Εκτός από τις καλλιεργημένες ελιές, η μύγα της ελιάς είναι γνωστό ότι επιτίθεται και σε διάφορα είδη άγριων ελιών. Προσβολή σε αυτά τα άγρια είδη ελιών έχει επιτρέψει στη μύγα να διαδοθεί από την ανατολική ακτή της Μεσογείου μέχρι την κεντρική και νότια Αφρική όπου υπήρχαν άγρια είδη ελιάς μαζί με μερικές

φυτείες καλλιεργησίμων ελιών. Όπως παρατηρείται από μια σειρά ξενιστών, ο δάκος έχει συγκεκριμένες θρεπτικές απαιτήσεις. Έχει αποδειχθεί ότι ο οργανισμός *Pseudomonas savastanoi*, ο αιτιολογικός παράγοντας της ασθένειας των ελιών είναι ένα συμβιωτικό βακτήριο που απαιτείται στο έντερο των προνυμφών και των ενήλικων ατόμων του δάκου. Οι μύγες της ελιάς μπορούν να εκτραφούν τεχνητά αλλά με μεγαλύτερη δυσκολία από άλλα Tephritidae [4].

Παρόλο που ο δάκος προτιμά τα δροσερά και παράκτια κλίματα, εντούτοις βρίσκεται και σε ζεστές και ξηρές περιοχές σε Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Μεξικό και Καλιφόρνια. Οι ιδανικές θερμοκρασίες για την ανάπτυξή του είναι μεταξύ 10° και 26° C. Υψηλές θερμοκρασίες της τάξεως 40° - 45° C είναι καταστρεπτικές για τα ενήλικα έντομα και τις προνύμφες μέσα στον καρπό. Ωστόσο, οι μύγες της ελιάς είναι αρκετά κινητικές και έτσι έχουν την ικανότητα να αναζητούν δροσερότερες περιοχές. Έρευνες για τη μετακίνηση των μυγών δείχνουν μια διακύμανση από 180 m όταν υπάρχει ξενιστής, ως 4 km για την αναζήτηση ξενιστή [8].

### Γ. Κύκλος ζωής

Ο δάκος της ελιάς συμπληρώνει τρεις, το πολύ πέντε βιολογικούς κύκλους το

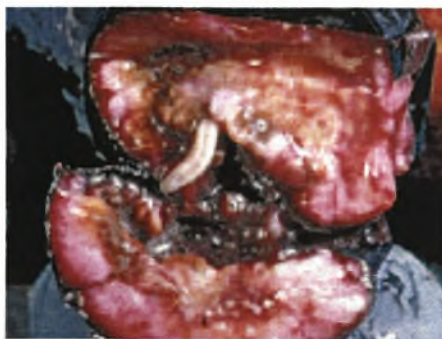


Εικόνα 4. Αυγό δάκου

χρόνο ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Το χειμώνα επιζεί είτε ως ενήλικο άτομο είτε ως νύμφη (βομβύκιο) στο χώμα ή σε πεσμένα φρούτα. Οι πληθυσμοί των ενήλικων ατόμων μειώνονται σε χαμηλά επίπεδα προς το τέλος του χειμώνα. Ωστόσο, την άνοιξη προκύπτουν νέα ενήλικα άτομα από τις νύμφες. Από αυτά, τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους μέσα στα φρούτα που έχουν μείνει στα δέντρα από την προηγούμενη χρονιά (Εικόνα 4).

Οι προνύμφες τρέφονται από τον ελαιόκαρπο και μεταμορφώνονται σε νύμφες σε μια περιοχή του καρπού, ακριβώς κάτω από την εξωτερική

χρόνο ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Το χειμώνα επιζεί είτε ως ενήλικο άτομο είτε ως νύμφη (βομβύκιο) στο χώμα ή σε πεσμένα φρούτα. Οι πληθυσμοί των ενήλικων ατόμων μειώνονται σε χαμηλά επίπεδα προς το τέλος του χειμώνα. Ωστόσο,



Εικόνα 5. Προνύμφη δάκου μέσα σε ελαιόκαρπο.



μεμβράνη (Εικόνες 5 & 6). Η πρώτη γενιά ενηλίκων εμφανίζεται την άνοιξη. Η δεύτερη γενιά εμφανίζεται στα μέσα του καλοκαιριού. Στο διάστημα του καλοκαιριού οι μύγες της ελιάς μπορεί να συμπληρώσουν μια γενιά μέσα σε 30-35 μέρες όταν οι συνθήκες είναι 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, ανάλογα με τη θερμοκρασία και τη διαθέσιμη τροφή.



Εικόνα 6. Νύμφη δάκου

Ένα θηλυκό μπορεί να εναποθέσει 50-400 αυγά κατά τη διάρκεια της ζωής του. Επιπλέον γενιές είναι δυνατό να παραχθούν μετά το καλοκαίρι μέχρι και το Δεκέμβριο, αν υπάρχει βέβαια διαθέσιμη τροφή. Οι περισσότερες προνύμφες της τελευταίας γενιάς εγκαταλείπουν τον καρπό για να μεταμορφωθούν σε βομβύκια στο έδαφος. Οι ελιές που αφήνονται στα δέντρα μετά τη συγκομιδή μπορούν να παράγουν μεγάλους πληθυσμούς δάκου μετά το τέλος του καλοκαιριού ως την αρχή της άνοιξης [8].

#### Δ. Προκαλούμενη καταστροφή και αντιμετώπιση

Η καταστροφή του ελαιόκαρπου προκαλείται από τα ενήλικα έντομα και τις προνύμφες. Όπως ειπώθηκε προηγουμένως, η καταστροφή οφείλεται στην



εναπόθεση των αυγών στην επιφάνεια του καρπού από το θηλυκό ενήλικο άτομο. Από τα αυγά προκύπτουν μικρές προνύμφες, δύσκολα ορατές με γυμνό μάτι. Οι προνύμφες τρέφονται από τον καρπό της ελιάς και μεγαλώνουν,

οδηγώντας σε πρόωρη πτώση των φρούτων. Προκαλούν επίσης την καταστροφή του σαρκώδους τμήματος του καρπού οδηγώντας έτσι σε επιπλέον μόλυνση του καρπού με την είσοδο

βακτηρίων και μηκύτων. Οι οργανισμοί αυτοί αποσυνθέτουν τον καρπό και αυξάνουν την οξύτητα του παραγόμενου λαδιού ελαττώνοντας έτσι την ποιότητά του (Εικόνα 6). Ακόμα, η εναπόθεση αυγών από το θηλυκό μειώνει την αξία της επιτραπέζιας ελιάς καθιστώντας την μη εμπορεύσιμη [8].

Η ζημία που προκαλείται στην παραγωγή επιτραπέζιας ελιάς θα πρέπει να κυμαίνεται σε επίπεδα κάτω από 1%, ενώ για τις ελιές που προορίζονται για την παραγωγή λαδιού μπορεί να είναι παραπάνω, γύρω στο 5-10% [8]. Οι οικονομικές ζημιές στις σοδειές επιτραπέζιας ελιάς εκτιμάται ότι είναι πολύ υψηλές, φτάνουν το 100% όταν οι μολύνσεις είναι ανεξέλεγκτες. Οι οικονομικές απώλειες όσο αναφορά το λάδι κυμαίνονται επίσης σε υψηλά επίπεδα 80-100%, συμπεριλαμβάνοντας πτώση των καρπών, καταστροφή του σαρκώδους τμήματος του καρπού και αύξηση της οξύτητας του λαδιού [4]. Ένα παράδειγμα της διαφορετικής επίδρασης του δάκου στην παραγωγή ελιάς και λαδιού στις χώρες της Μεσογείου φαίνεται στον πίνακα 1.

*Πίνακας 1. Οικονομική καταστροφή προκαλούμενη από το δάκο της ελιάς στην παραγωγή ελαιολάδου κυρίως*

Ισπανία	1982	5%
Ιταλία	1962	25%
Ελλάδα	1962	30-35%
Ισραήλ	1962	20-60%
Κύπρος	1962	15-20%
Γιουγκοσλαβία	1982	20-40%
Αίθιοπ	1980	27-72% (avg. 50%)
	1981	7-14%
Πορτογαλία	1994-96	4-8% Ελιές 17-19% Λάδι

Η μεγάλη σημασία της ελαιοπαραγωγής στις μεσογειακές χώρες κάνει επιτακτική την ανάγκη για καταπολέμηση του δάκου της ελιάς. Η κυριότερη μέθοδος που χρησιμοποιείται παραπάνω από 20 χρόνια βασίζεται σε χρήση εντομοκτόνων, συγκεκριμένα οργανοφωσφορικών. Οι εφαρμογές αυτών των εντομοκτόνων είναι είτε προληπτικοί ψεκασμοί είτε ψεκασμοί κάλυψης. Επειδή όμως η μακροχρόνια χρήση εντομοκτόνων οδηγεί σε διαταραχές της ισορροπίας του οικοσυστήματος, ο άνθρωπος οδηγήθηκε στην αναζήτηση εναλλακτικών τρόπων αντιμετώπισης του δάκου.

Ικανοποιητικά αποτελέσματα έχει δείξει η μέθοδος παγίδευσης των εντόμων (αρσενικών και θηλυκών) σε κολλώδεις παγίδες που περιέχουν

φερομόνη και αμμωνιακό άλας (τροφικό ελκυστικό). Οι παγίδες McPhail χρησιμοποιούνται εκτενώς στην Ευρώπη, πρωταρχικά για την παρακολούθηση των πληθυσμών του δάκου, αλλά και για μαζική παγίδευση. Είναι κατασκευασμένες από γυαλί ή πλαστικό και περιέχουν ένα διάλυμα αμμωνιακών αλάτων ως ελκυστικό δόλωμα (Εικόνα 7). Τα έντομα εισέρχονται στην παγίδα και καλύπτονται από το διάλυμα [3].



Εικόνα 7: Δακοπαγίδα

## 1.2 Εισβολή στην Καλιφόρνια



Η οργανωμένη καλλιέργεια της ελιάς στην κεντρική και νότια Καλιφόρνια άρχισε στα τέλη του 1800. Παρά τις προσπάθειες ελέγχου των εντόμων στην πολιτεία της Καλιφόρνιας, ο δάκος της ελιάς ανιχνεύθηκε στην Νότια Καλιφόρνια το 1998. Το πρώτο έντομο παγιδεύτηκε σε μια παγίδα τύπου McPhail η χρήση της οποίας προοριζόταν για την παγίδευση άλλων συγγενών εντόμων, όπως η μεξικάνικη μύγα

Blue: 1998 | Yellow: 1999 | Orange: 2000 | Green: 2001 | Purple: 2002 φρούτων [5]. Από το 2001

Εικόνα 8. Χρονική εμφάνιση του δάκου σε περιοχές της Καλιφόρνιας

ανιχνεύεται σε όλη την πολιτεία της Καλιφόρνιας συμπεριλαμβανομένου και της Tulare County που αντιπροσωπεύει το 54% της Καλιφόρνιας σε εκτάσεις

ελαιόδεντρων. Ο δάκος της ελιάς μέσα σε δύο χρόνια έχει εμφανιστεί πλέον και στις βόρειες χώρες παραγωγής ελιάς, Glenn, Tehama, και Butte, καθώς και στις παράκτιες περιοχές που παράγουν ελαιόλαδο (Εικόνα 8). Στη νότια San Joaquin Valley κάποιες μετρήσεις που έγιναν την άνοιξη του 2002 με τη βοήθεια παγίδων έδειξαν ότι οι πληθυσμοί δάκου τριπλασιάστηκαν σε σχέση με το 2001 [12]. Δεν είναι γνωστός ο τρόπος που έχει εισβάλει ο δάκος στην Καλιφόρνια, ούτε η περιοχή από την οποία προήλθε.

Οι ελαιοπαραγωγοί που καλλιεργούν ποικιλίες ελιάς «αντέχουν» να έχουν μόλυνση περίπου 10%, ενώ εκείνοι που καλλιεργούν μαύρες ελιές (επιτραπέζιες) δεν «αντέχουν» καθόλου ζημιά. Το ενδεχόμενο υπερβολικών οικονομικών απωλειών στον τομέα της παραγωγής ελιάς στην Καλιφόρνια είναι μεγάλο διότι η πλειοψηφία των ποικιλιών που καλλιεργούνται είναι επιτραπέζιες ελιές παρά ελιές που χρησιμοποιούνται για να παραχθεί ελαιόλαδο [4].

Η αντιμετώπιση του δάκου της ελιάς στην Καλιφόρνια με χημικά μέσα δε φαίνεται να είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική και αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη για εναλλακτικές μεθόδους καταπολέμησής του. Ξεκίνησαν κάποιες μελέτες το 2002 έτσι ώστε να εκτιμηθούν πλήρως οι χημικοί έλεγχοι για το δάκο και να αποφασιστούν ποια εντομοκτόνα επιδρούν λιγότερο σε άλλα παράσιτα της ελιάς. Αυτή τη στιγμή η μαζική παγίδευση είναι η μόνη διαθέσιμη επιλογή για τους καλλιεργητές, αλλά αυτή η μέθοδος απαιτεί αρκετά εντατική εργασία και δεν είναι πλήρως αποτελεσματική [1]. Ο πιθανός ρόλος των φυσικών και βιολογικών μεθόδων ελέγχου του πληθυσμού του δάκου δεν είναι ακόμη γνωστός.

Στις μεσογειακές χώρες ο δάκος της ελιάς έχει μακρά ιστορία γιατί έχει ερευνηθεί εκτενώς η βιολογία και η οικολογία του. Για να χρησιμοποιήσουν αυτά τα δεδομένα αποτελεσματικά, οι ελαιοπαραγωγοί της Καλιφόρνιας θα πρέπει να αποκτήσουν ειδικές γνώσεις σε σχέση με την εποχιακή εμφάνιση και τη γεωγραφική κατανομή του δάκου στην πολιτεία της Καλιφόρνιας. Γίνεται μια προσπάθεια να εκτιμηθούν και να συγκριθούν έντομα με διαφορετικούς τύπους δολωμάτων και έτσι να αναπτυχθούν πιθανές στρατηγικές αντιμετώπισης των παρασίτων στις περιοχές εμπορικής παραγωγής [1, 5].

Ωστόσο, για τον έλεγχο του πληθυσμού του δάκου είναι απαραίτητη η κατανόηση του πληθυσμιακού δυναμικού, θα πρέπει δηλαδή να είναι γνωστό ποια αλληλόμορφα προσαρμόζονται σε συγκεκριμένες συνθήκες, ποια επικρατούν και ποια εξαφανίζονται. Ακόμη, είναι θεμελιώδης η κατανόηση της προέλευσης των εισβαλλόντων ατόμων δάκου, καθώς και οι δίαυλοι μεταφοράς τους. Οι δίαυλοι μεταφοράς μπορεί να σχετίζονται με το εμπόριο (μέσω φορτίου φρούτων), με μεμονωμένους ταξιδιώτες. Οι παραπάνω λόγοι οδήγησαν τους ερευνητές να στραφούν στην πληθυσμιακή ανάλυση του δάκου, χρησιμοποιώντας γενετικούς δείκτες.

### 1.3 Γενετικοί δείκτες

Μέχρι πρότινος, οι πληθυσμιακές μελέτες σχετίζονταν με ενζυμικούς πολυμορφισμούς (π.χ. αλλοένζυμα) ανάμεσα σε πληθυσμούς ή είδη. Τα τελευταία χρόνια όμως αναπτύχθηκαν τεχνικές ικανές να αναλύσουν τμήματα DNA και να δώσουν σημαντικές πληροφορίες. Η πιο σπουδαία τεχνική που ανακαλύφθηκε τα τελευταία 20 χρόνια είναι η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Η PCR επιτρέπει τον ενζυμικό πολλαπλασιασμό *in vitro* επιλεγμένων αλληλουχιών από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος. Τα πολλαπλά αντίγραφα που προκύπτουν από την αντίδραση συνήθως αποτελούν βάση για άλλες τεχνικές. Πλέον, για τις πληθυσμιακές μελέτες χρησιμοποιούνται δείκτες που ανιχνεύουν ποικιλομορφία που βασίζεται στο DNA ανάμεσα σε είδη, πληθυσμούς ή άτομα. Αυτοί οι δείκτες ονομάζονται μοριακοί ή γενετικοί δείκτες.

Οι γενετικοί δείκτες παρουσιάζουν πλεονεκτήματα σε σχέση με τους πρωτεϊνικούς. Κατ' αρχήν, όλοι οι γενετικοί δείκτες αντανakλούν διαφορές στις αλληλουχίες του DNA. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει δυνατότητα εύρεσης μεγαλύτερης ποικιλομορφίας. Με το πέρασμα από το DNA στην πρωτεΐνη χάνεται μεγάλο ποσοστό ποικιλομορφίας διότι οι αλλαγές των αμινοξέων δεν ανιχνεύονται πάντα. Αυτό συμβαίνει γιατί κάποιες μεταλλάξεις του γενετικού υλικού οδηγούν σε συνώνυμο αμινοξύ. Επίσης, οι πρωτεϊνικοί δείκτες δεν είναι ουδέτεροι αφού μπορεί κάποιος γονιδιακοί τόποι να υπόκεινται σε φυσική

επιλογή. Ακόμη, μειονεκτήματα των ενζυμικών δεικτών είναι η απαίτηση μεγάλης ποσότητας ιστών καθώς και η αστάθεια των ενζύμων. Διάφοροι γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι τα RFLPs, RAPDs, AFLPs, VNTRs, mtDNA, rDNA που αναλύονται παρακάτω.

#### A. PCR-RFLPs

Χρησιμοποιώντας ένζυμα περιορισμού σε συγκεκριμένα τμήματα DNA τα οποία έχουν ενισχυθεί με PCR μπορεί να ανιχνευθούν διαφορές στην αλληλουχία του DNA ανάμεσα σε είδη, πληθυσμούς ή άτομα. Η τεχνική αυτή είναι γνωστή ως πολυμορφισμοί μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (restriction fragment length polymorphisms) ή RFLPs. Αν μια μετάλλαξη δημιουργήσει ή εξαφανίσει μια θέση κοπής για το ένζυμο περιορισμού που χρησιμοποιήθηκε στην αντίδραση πέψης, η μετάλλαξη θα ανιχνευθεί από τη διαφορά μήκους των τμημάτων που προκύπτουν μετά την πέψη. Τα τμήματα που προκύπτουν μετά την πέψη ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης για να συγκριθούν τα μήκη τους [18].

#### B. RAPDs και AFLPs

Παρόμοιες τεχνικές με τα RFLPs είναι οι randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) και amplified fragment length polymorphism (AFLP) που επίσης βασίζονται στην PCR. Οι δύο αυτές τεχνικές έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούνται πληροφορίες για την αλληλουχία DNA που μελετάται.

Η τεχνική RAPD είναι απλή, επιλέγονται τυχαία δεκαμερή ολιγονουκλεοτίδια και χρησιμοποιούνται ως εκκινητές. Υπάρχουν περίπου ένα εκατομμύριο πιθανές δεκαμερείς αλληλουχίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Διαφορές ανάμεσα σε άτομα διακρίνονται από μεταλλάξεις σε περιοχές όπου προσδένονται οι εκκινητές και καταλήγουν σε παρουσία ή απουσία μιας ζώνης από το gel. Οι ετεροζυγώτες δεν ανιχνεύονται γιατί δεν ξεχωρίζουν από τους ομοζυγώτες. Στην ανάλυση RAPD είναι σύνηθες να χρησιμοποιούνται πολλοί διαφορετικοί εκκινητές για να παράγονται αρκετές πολυμορφικές ζώνες. Οι RAPDs μπορούν να ανιχνεύσουν ποικιλομορφία σε διάφορα ταξινομικά επίπεδα αφού η μέθοδος έχει την ικανότητα να παράγει ζώνες χαρακτηριστικές ανάμεσα σε είδη, ανάμεσα σε πληθυσμούς μέσα στο

είδος ή ανάμεσα σε άτομα μέσα σε έναν πληθυσμό. Συνεπώς, η ανάλυση RAPD είναι πιθανώς μια τεχνική πολλαπλών εφαρμογών, αλλά έχει προβλήματα αξιοπιστίας και μόλυνσης. Το πρότυπο ζωνών που προκύπτει, βασίζεται στο αρχικό DNA που ενισχύθηκε με PCR και μερικές φορές οι ζώνες που εμφανίζονται, προέρχονται από παράσιτα ή συμβιωτικά βακτήρια [29].

Για την ανάλυση AFLP, αρχικά, το δείγμα DNA τέμνεται με δύο ένζυμα περιορισμού που παράγουν διαφορετικά, επικαλυπτόμενα (κολλώδη) άκρα. Δίκλωνοι συνδέτες, μικρές αλληλουχίες DNA με συμβατά κολλώδη άκρα συντίθενται *in vitro* και στη συνέχεια ενώνονται στα τμήματα DNA. Ακολουθούν αντιδράσεις PCR με εκκινητές ομόλογους με τις αλληλουχίες των συνδετών, με επιπλέον λίγα (1-3 συνήθως), τυχαία προστιθέμενα νουκλεοτίδια στο 3' άκρο. Αυτή η διαδικασία καταλήγει σε μια μικρή αλλά σημαντική τυχαία αναλογία του αρχικού τμήματος DNA με τους δύο διαφορετικούς συνδέτες προσκολλημένους. Όπως και στις τεχνικές που αναφέρθηκαν προηγουμένως, τα τμήματα DNA που προκύπτουν αναγνωρίζονται ως ζώνες μετά από ηλεκτροφόρηση σε gel αγαρόζης. Τα AFLPs είναι φανερά πιο περίπλοκη μέθοδος από τα RAPDs, αλλά δίνουν πρότυπα ζωνών που αναπαράγονται εύκολα [30].

### Γ. VNTRs

Συνήθως, το μεγαλύτερο μέρος του DNA ενός ευκαρυωτικού οργανισμού αποτελείται από μη κωδικοποιούσες περιοχές και έτσι δεν υπόκειται σε ισχυρή επιλογή. Σε αυτά τα τμήματα του DNA που δεν κωδικοποιούνται περιέχονται επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες που μπορεί να είναι μικρού ή και μεγαλύτερου μεγέθους. Όταν το μήκος της επαναλαμβανόμενης μονάδας είναι μικρότερο από 10 ζεύγη βάσεων χρησιμοποιείται ο όρος μικροδορυφόρος και όταν είναι 10-100 ζεύγη βάσεων ο όρος μινιδορυφόρος [19]. Αυτοί οι τύποι αλληλουχιών ονομάζονται εν σειρά επαναλήψεις ποικίλου αριθμού (variable number of tandem repeats) ή VNTRs. Η λειτουργία αυτών των αλληλουχιών παραμένει άγνωστη, αλλά ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μονάδων μέσα σε ένα τέτοιο στοιχείο (και επομένως το συνολικό μήκος του στοιχείου) συχνά διαφέρει από ένα ομόλογο χρωμόσωμα σε άλλο. Συνεπώς οποιοδήποτε περιοριστικό ένζυμο τέμνει έξω από την εν

σειρά επανάληψη, θα δημιουργήσει ένα τμήμα του οποίου το μήκος θα αντικατοπτρίζει το μέγεθος του VNTR. Το χαρακτηριστικό που κάνει αυτούς τους πολυμορφισμούς ιδιαίτερα χρήσιμους είναι ότι ένας μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων είναι πιθανός, επειδή το συνολικό μέγεθος της επανάληψης μπορεί να διαφέρει κατά ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών πιθανών μεγεθών, από χρωμόσωμα σε χρωμόσωμα. Το πολύπλοκο πρότυπο ζωνών που προκύπτει μετά από ανίχνευση με επαναλαμβανόμενο ανιχνευτή, παρουσιάζει ταυτόχρονα πολλαπλούς πολυμορφικούς γενετικούς τύπους και για αυτό είναι πολύ σπάνιο να βρεθεί απaráλλαχτο μεταξύ δύο ατόμων. Για VNTRs με μεγάλους αριθμούς αλληλομόρφων, η πιθανότητα δύο άσχετων μεταξύ τους ατόμων να φέρουν ίδια και τα δύο αλληλόμορφα είναι πολύ μικρή, συχνά μικρότερη από 1%. Για το λόγο αυτό η συγκεκριμένη ανάλυση ονομάζεται και «δακτυλικό αποτύπωμα» και έχει βρει εφαρμογή στον έλεγχο πατρότητας και την ιατροδικαστική [18].

#### Δ. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA)

Το μιτοχονδριακό DNA στα μετázωα είναι συνήθως ένα δίκλωνο κυκλικό μόριο η ποσότητα του οποίου είναι τις περισσότερες φορές λιγότερη από το 1% του συνολικού DNA του κυττάρου.

Το μέγεθός του κυμαίνεται από 15-20 kb και αποτελείται από 37 γονίδια.

Αυτά τα γονίδια κωδικοποιούν για 22 tRNA, 2 rRNA και 13 mRNA. Τα τελευταία μεταφράζονται σε πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων και την οξειδωτική φωσφορυλίωση. Από αυτές, τρεις είναι υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (CO I, II, και III), δύο

είναι υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ATPάση 6 και 8), μια είναι υπομονάδα του κυτοχρώματος b και επτά είναι υπομονάδες της NADH ρεδουκτάσης (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5 και 6) [21] (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Το μιτοχονδριακό DNA.



Το mtDNA των μεταζώων αποτελεί πρότυπο γενετικής οικονομίας στη φύση. Η δομή του είναι εξαιρετικά συμπαγής. Τα γονίδια του μιτοχονδρίου δεν περιέχουν ιντρόνια και επίσης απουσιάζουν οι μεσοδιαστημικές περιοχές ανάμεσα στα γονίδια. Σχεδόν όλη η πρωτοταγής νουκλεοτιδική αλληλουχία των μιτοχονδρίων καθορίζει τη δομή πρωτεϊνών ή μορίων RNA. Η διάταξη των γονιδίων στο mtDNA παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα ανάμεσα σε συγγενικά είδη [21]. Στη διατήρηση της γονιδιακής διάταξης συμβάλλει και η σχεδόν αποκλειστικά μητρική κληρονόμηση του, αλλά και η απουσία ανασυνδυασμού μεταξύ των μορίων του. Στο mtDNA υπάρχει μια μη κωδικοποιούσα περιοχή που σχετίζεται με τον έλεγχο της αντιγραφής και μεταγραφής του DNA και ονομάζεται περιοχή ελέγχου ή D-loop. Η περιοχή αυτή είναι πλούσια σε αδενίνη και θυμίνη και για αυτό είναι γνωστή και ως AT-rich περιοχή. Μπορεί να διαχωριστεί σε HVR-1 (υπερμεταβλητή περιοχή ελέγχου 1) και HVR-2 [9].

Η μελέτη του mtDNA έδειξε ότι εξελίσσεται ταχύτερα από το πυρηνικό DNA, με ρυθμό μεταλλαγμένης περίπου δεκαπλάσιο από το πυρηνικό [6]. Αυτό πιθανώς να συμβαίνει λόγω αδυναμίας της πολυμεράσης του mtDNA να επιδιορθώσει τα λάθη της. Ειδικά η περιοχή ελέγχου, παρουσιάζει υψηλότερο ρυθμό μετάλλαξης σε σχέση με την κωδικοποιούσα περιοχή του mtDNA.

Μεγάλος αριθμός εργασιών που χρησιμοποιούν το mtDNA ως εργαλείο για την εύρεση φυλογενετικών σχέσεων έχουν δημοσιευτεί. Το mtDNA έχει αρκετά χαρακτηριστικά που το καθιστούν ιδανικό μοριακό δείκτη για μελέτες πληθυσμιακής γενετικής και εξέλιξης. Έχει μικρό μέγεθος, απομονώνεται εύκολα και δεν παρουσιάζει ανασυνδυασμό. Επίσης, ο μητρικός τρόπος κληρονόμησης του και η απλοειδής του φύση που μειώνουν το δραστικό πληθυσμιακό του μέγεθος ( $N_e$ ) [6]. Αυτό σημαίνει ότι υπάρχει μεγάλη πιθανότητα εμφάνισης των σπάνιων αλληλομόρφων. Στο mtDNA συνυπάρχουν περιοχές με υψηλούς (D-loop) αλλά και με αργούς (γονίδια του rRNA) ρυθμούς μεταλλάξεων, που όλες όμως εξελίσσονται ταχύτερα από αυτές στο πυρηνικό DNA.

Παρόλα αυτά, ανάλογα με τις μελέτες και τους οργανισμούς στους οποίους χρησιμοποιείται το mtDNA ως γενετικός δείκτης, μπορεί να αποδειχθεί ιδανική επιλογή ή πονοκέφαλος. Πρόσφατα αποδείχθηκε η παρουσία μιτοχονδριακών ψευδογονιδίων στο πυρηνικό γονιδίωμα σε ένα ευρύ φάσμα οργανισμών, η

οποία είναι αθέμιτη για τις πληθυσμιακές μελέτες. Παρόλο που υπάρχουν μέθοδοι και τεχνικές που ελαττώνουν την παρέμβαση των ψευδογονιδίων του mtDNA στην προπαρασκευή δειγμάτων και την ανάλυση δεδομένων, έχουν περιορισμένη δύναμη επίλυσης του προβλήματος [7].

Εκτός από αυτό το πρόβλημα, το mtDNA παρουσιάζει από μόνο του κάποιους σημαντικούς περιορισμούς. Πρώτον, το δραστικό μέγεθος πληθυσμού του mtDNA είναι το  $\frac{1}{4}$  του πυρηνικού DNA, συνεπώς υπάρχει υψηλότερο ποσοστό απαισιοφής ενός αλληλομόρφου. Οι συνέπειες αυτού είναι η απλοποίηση των εξελικτικών σχέσεων από τα δεδομένα του mtDNA, η μειωμένη εκτίμηση της γενετικής ποικιλομορφίας από δείκτες mtDNA και η αυξημένη αμφιβολία στις γενεαλογικές αναλύσεις που μπορεί να προκύψει λόγω αυξημένης πιθανότητας χασμάτων στους μιτοχονδριακούς απλότυπους [7].

Δεύτερον, το mtDNA αντιπροσωπεύει έναν μονομορφικό δείκτη. Το mtDNA έχει χρησιμοποιηθεί ως γενετικός δείκτης εκτενώς και έχουν συλλεχθεί αρκετές πληροφορίες από τη χρήση του αυτή, όμως αυτά τα δεδομένα προκύπτουν από τη μητρογονική πλευρά της ιστορίας της εξέλιξης. Η μητροπλευρική εξέλιξη μπορεί να διαφέρει αρκετά από τη συνολική των πληθυσμών ή των ειδών. Συνεπώς, τα συμπεράσματα που εξάγονται για την ιστορία των πληθυσμών και των ειδών δεν είναι πάντα αληθή [7].

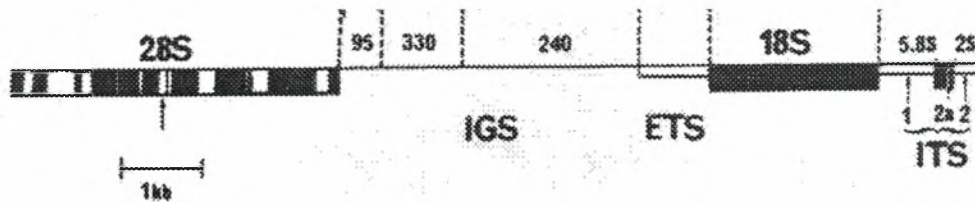
Όπως προαναφέρθηκε, το mtDNA έχει χρησιμοποιηθεί πολλές φορές σε φυλογενετικές αναλύσεις και πληθυσμιακές μελέτες. Όσον αφορά την οικογένεια Terphritidae των Διπτέρων έχουν χρησιμοποιηθεί αλληλουχίες DNA της μιτοχονδριακής κυτοχρωμικής οξειδάσης II για την φυλογενετική ανάλυση του γένους *Rhagoletis* [15]. Έχουν γίνει και κάποιες φυλογενετικές αναλύσεις ανάμεσα σε είδη *Bactrocera* βασιζόμενες σε αλληλουχίες mtDNA, που περιλαμβάνουν τμήματα των γονιδίων 16S rRNA και κυτοχρωμική οξειδάση II + tRNA<sub>Lys</sub> + tRNA<sub>Asp</sub> [14].

Επίσης, έχουν αλληλουχηθεί δύο απλότυποι του μιτοχονδριακού γονιδιώματος του δάκου (*Bactrocera oleae*). Τα δύο δείγματα δάκου από το Montecucco και την Paradela, προέρχονται το πρώτο από Ιταλία και το δεύτερο από Πορτογαλία. Οι δύο αλληλουχίες συγκρίθηκαν για να βρεθούν οι διαφορές μεταξύ των απλοτύπων. Βρέθηκε ότι διαφέρουν σε 31 σημειακές

αντικαταστάσεις, οι οποίες αντιπροσωπεύουν το 0.2% του μορίου. Από αυτές μόνο οι πέντε οδηγούν σε αλλαγή αμινοξέως [13].

### Ε. Το ριβοσωμικό DNA (rDNA)

Όπως είναι γνωστό, το ριβόσωμα είναι η μηχανή παρασκευής πρωτεϊνών του κυττάρου. Το ριβόσωμα είναι ένα μεγάλο σύμπλοκο που αποτελείται από πενήντα πρωτεΐνες περίπου, γνωστές ως ριβοσωμικές πρωτεΐνες και αρκετά μόρια RNA που ονομάζονται ριβοσωμικά RNA (rRNA). Το ριβόσωμα των ευκαρυωτικών οργανισμών αποτελείται από δύο υπομονάδες, μία μεγάλη και μία μικρή. Οι ριβοσωμικές πρωτεΐνες κωδικοποιούνται από το ριβοσωμικό DNA [20].



Εικόνα 10. Οργάνωση των γονιδίων του πυρηνικού rDNA

Το ριβοσωμικό DNA των Δίπτερων αποτελείται από τέσσερα γονίδια, τα 28S, 5.8S, 18S και 2S. Ανάμεσα στις κωδικοποιούσες περιοχές παρεμβάλλονται δύο μεσοδιαστημικές περιοχές, οι ITS1 και ITS2 [16] (Εικόνα 10). Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ριβοσωμικά γονίδια είναι αρκετά συντηρημένα μεταξύ διαφορετικών ειδών. Οι ενδιάμεσες περιοχές συσσωρεύουν μεταλλάξεις με γρηγορότερο ρυθμό από τις κωδικοποιούσες. Οπότε, όπως και στο μιτοχονδριακό DNA, συνυπάρχουν στο rDNA περιοχές με ταχείς (ITS1 και ITS2) αλλά και με αργούς (ριβοσωμικά γονίδια) ρυθμούς μεταλλάξεων. Αυτή η ιδιότητά του σε συνδυασμό με τη συντήρηση των ριβοσωμικών γονιδίων σε συγγενικά είδη καθιστούν το rDNA έναν εύχρηστο γενετικό δείκτη.

Γενικά, οι πολυμορφισμοί του πυρηνικού DNA που υπάρχουν εκτενώς στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς παρέχουν απεριόριστες δυνατότητες για μελέτη των μηχανισμών της εξέλιξης. Ωστόσο, κατά την εργασία με πυρηνικούς DNA δείκτες εμφανίζονται προκλήσεις σε κάθε στάδιο της μελέτης. Σε αυτές τις προκλήσεις συμπεριλαμβάνονται ο ανασυνδυασμός, η

επιλογή (μη ουδετερότητα) και η ετεροζυγωτία [7]. Αυτά τα προβλήματα δεν εμφανίζονται χρησιμοποιώντας τους μιτοχονδριακούς γενετικούς δείκτες, αποτελούν δηλαδή χαρακτηριστικό των πυρηνικών γενετικών δεικτών.

Έχουν δημοσιευτεί πολλές εργασίες που σχετίζονται με την ανάλυση πολυμορφισμών και βασίζονται στον πολυμορφισμό του rDNA. Για παράδειγμα, έχει χρησιμοποιηθεί ο πολυμορφισμός του 18S rRNA γονιδίου για να διακριθούν οι φλεβοτόμοι από την Ελλάδα και την Κύπρο χρησιμοποιώντας ένζυμα περιορισμού [24]. Επίσης, έχουν αναλυθεί οι φυλογενετικές σχέσεις των φλεβοτόμων βάσει της μικρής υπομονάδας του πυρηνικού rDNA [23].

#### *1.4 Παραδείγματα μελέτης της εισβολής, προσαρμογής και εξάπλωσης ενός είδους σε μια νέα χώρα με τη χρήση γενετικών δεικτών*

Η εισβολή και η εγκαθίδρυση εντόμων σε ένα νέο περιβάλλον, πέρα από το επιστημονικό ενδιαφέρον μπορεί να παρουσιάσει και μεγάλο υγειονομικό ή οικονομικό ενδιαφέρον. Ανάλογες εισβολές έχουν, για παράδειγμα, μελετηθεί αρκετά σε κάποια μέλη της οικογένειας Tephritidae, συγγενικά με το δάκο, όπως είναι η μεσογειακή μύγα (*Ceratitis capitata*), ένα από τα κυριότερα παράσιτα των καλλιεργειών.

Σε μια μελέτη σχετικά με την εισβολή της μεσογειακής μύγας στην Καλιφόρνια χρησιμοποιήθηκε συνδυασμός δύο γενετικών δεικτών, mtDNA και μικροδορυφόρων [28]. Ο συνδυασμός δύο γενετικών δεικτών δίνει στους ερευνητές τη δυνατότητα να διασταυρώνουν και να επαληθεύουν τα αποτελέσματά τους. Αν και οι δύο τεχνικές καταλήξουν στο ίδιο συμπέρασμα τα αποτελέσματα πιστοποιούνται. Χρησιμοποιώντας τους συγκεκριμένους γενετικούς δείκτες κατέληξαν στο γεγονός ότι συνέβησαν πολλαπλές εισβολές μεσογειακής μύγας από διάφορες πηγές στην Καλιφόρνια τα τελευταία χρόνια. Οι ερευνητές πιστεύουν ότι θα πρέπει να δοθεί προσοχή στις πιθανότερες οδούς εισόδου, όπως είναι τα φορτία φρούτων που προέρχονται

από εμπορικές δραστηριότητες. Μία άλλη έρευνα του Silva *et al.* [31] που βασίστηκε επίσης στο συνδυασμό αυτών των δύο γενετικών δεικτών εξήγησε την εισβολή της μεσογειακής μύγας στη Florida το 1997. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η πιθανότερη καταγωγή της μεσογειακής μύγας της Florida είναι η περιοχή της Μεσογείου, ενώ στο Miami φαίνεται να υπάρχει ένας άλλος απλότυπος με καταγωγή τη Νότια Αμερική.

Ο Bonizzoni *et al* [32] χρησιμοποιώντας ως γενετικό δείκτη μικροδορυφόρους σε μια έρευνα προσπάθησαν να απαντήσουν στο ερώτημα αν η μεσογειακή μύγα στην Καλιφόρνια προήλθε από ανεξάρτητες εισβολές ή από την εδραίωση ενός πληθυσμού. Κατέληξαν στο γεγονός ότι προήλθε από ανεξάρτητες εισβολές και υποστηρίχθηκε η άποψη ότι εδραιώθηκε ένας ενδημικός πληθυσμός, που πιθανόν να προέρχεται από τη Γουατεμάλα. Μία έρευνα του Bonizzoni *et al* [33] που βασίστηκε επίσης στους μικροδορυφόρους, προσπάθησε να δώσει απαντήσεις σχετικά με την εξάπλωση της μεσογειακής μύγας στην Αυστραλία. Τα αποτελέσματά τους έδειξαν ότι εξαπλώθηκε από την περιοχή Perth.

Εκτός από τους μικροδορυφόρους και το mtDNA έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι γενετικοί τύποι για την αντιμετώπιση παρόμοιων καταστάσεων. Ένα παράδειγμα είναι οι παραλλαγές πολλαπλών πυρηνικών ιντρονίων που χρησιμοποιήθηκαν σε πληθυσμιακές μελέτες που σχετίζονται με τη μεσογειακή μύγα καταλήγοντας στο γεγονός ότι οι πληθυσμοί της Καλιφόρνιας και της Χαβάης διατηρούν ευρεία γενετική ποικιλομορφία [34]. Ένα άλλο παράδειγμα είναι η χρήση του πρώτου ιντρονίου του γονιδίου που κωδικοποιεί ένα από τα ισοένζυμα της αλκοολικής δεϋδρογονάσης (ADH-1) της μεσογειακής μύγας, το οποίο είναι ιδιαίτερα πολυμορφικό όσον αφορά το μήκος του. Η φυλογενετική ανάλυση προτείνει ότι τα αλληλόμορφα με μικρό μήκος ιντρονίου αντιπροσωπεύουν την αρχαιότερη μορφή του ιντρονίου, ενώ τα αλληλόμορφα με μεγάλο μήκος είναι τα πιο πρόσφατα [35].

Ένα άλλο έντομο συγγενικό με το δάκο που μελετήθηκε είναι η μύγα της κολοκύθας, *Bactrocera depressa*. Η μύγα της κολοκύθας προσβάλλει καλλιέργειες στην Κορέα, την Ιαπωνία και την Ταϊβάν και τίθεται το ερώτημα αν η καταγωγή της χρονολογείται από την εποχή του Πλειόκαινου ή πρόκειται για πρόσφατη εισβολή. Η έρευνα του Mun *et al* [36] βασίστηκε σε μιτοχονδριακές αλληλουχίες του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I και

τριών πυρηνικών γονιδίων. Η γενετική ανάλυση έδειξε μια πολύ παλαιά απομόνωση των πληθυσμών της Κορέας και της Ιαπωνίας. Ακόμη, φαίνεται πιθανή μια πρόσφατη είσοδος ενός μιτοχονδριακού απλότυπου στη Γιοκοχάμα.

### *Σκοπός της Εργασίας*

Είναι άγνωστος ο τρόπος που έχει εισβάλει ο δάκος στην Καλιφόρνια, καθώς και η χώρα από την οποία προήλθε. Θεωρείται ότι έχει προέλθει από κάποια ευρωπαϊκή χώρα της Μεσογείου γιατί μέχρι πρότινος η λεκάνη της Μεσογείου ήταν η κύρια περιοχή καλλιέργειας του ελαιόδεντρου. Η εισβολή του δάκου στην Καλιφόρνια έχει όχι μόνο επιστημονικό αλλά και πρακτικό ενδιαφέρον. Αυτό αφορά τη θέσπιση ελέγχων για την αποφυγή τέτοιων εισβολών και την ασφαλέστερη μετακίνηση συγκεκριμένων προϊόντων. Από τα αποτελέσματα της ανάλυσης με βάση το mtDNA και το rDNA θα μπορέσουμε να αποφανθούμε για την καταγωγή του δάκου της Καλιφόρνιας.

Υπάρχει η ανάγκη για τον προσδιορισμό της καταγωγής του δάκου της Καλιφόρνιας για τον καλύτερο χαρακτηρισμό του. Ο σκοπός της παρούσας εργασίας λοιπόν επικεντρώνεται στη σύγκριση δειγμάτων δάκου από όσο το δυνατόν περισσότερες Ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου (Κύπρος, Ελλάδα, Ιταλία, Ισπανία, Πορτογαλία) με δείγματα από περιοχές της Καλιφόρνιας. Ο στόχος είναι να βρεθεί η πιο συγγενική γενετικά ευρωπαϊκή αλληλουχία του γονιδιώματος του δάκου με την αντίστοιχη του δάκου της Καλιφόρνιας. Για τις αναλύσεις των αλληλουχιών χρησιμοποιούνται ως γενετικοί δείκτες τμήματα του μιτοχονδριακού DNA και του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA.

## 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

### 2.1 Απομόνωση χρωμοσωμικού DNA από δάκο

Η απομόνωση του DNA είναι απαραίτητη προϋπόθεση για κάθε διεργασία μοριακής βιολογίας. Οι μέθοδοι απομόνωσης DNA έχουν ως βάση την ελευθέρωση του DNA σε διαλυτή μορφή μετά από ρήξη των κυτταρικών και υποκυτταρικών μεμβρανών οργανιδίων και το διαχωρισμό του DNA από άλλα μακρομόρια. Για την πλήρη απομάκρυνση των πρωτεϊνών από το DNA απαιτείται εκχύλιση με φαινόλη και χλωροφόρμιο, στη συνέχεια ακολουθεί κατακρήμνιση του DNA με αιθανόλη με την οποία επιτυγχάνεται η απομάκρυνση του άλατος από το δείγμα. Μετά το τέλος αυτής της διαδικασίας λαμβάνεται ως ίζημα καθαρό DNA, το οποίο επαναδιαλύεται σε απιονισμένο νερό [11].

#### **Υλικά-Διαλύματα**

Άτομα δάκου

Σωληνάκια erpendorf

Έμβολα ομογενοποίησης

Υδατόλουτρο

Παγόλουτρο

Φυγόκεντρος

Μικροπιπέτες με ακροφύσια των 1000μl, 200μl, 20μl

Φαινόλη pH: 7.5

Χλωροφόρμιο

Παγωμένη αιθανόλη 100% και 70%

Οξικό Κάλιο 8M

Διάλυμα ομογενοποίησης: 100mM NaCl, 200mM σουκρόζη, 100mM Tris pH=7.4, 50mM EDTA, 0.5% SDS

Διάλυμα επαναδιάλυσης DNA: TE/RNase 20μg/ml: 10 mM Tris, 1mM EDTA, 20 μg RNase

#### Διαδικασία

- ✓ Σε σωληνάκια erpendorf που περιέχουν τα έντομα προστίθενται 50μl διαλύματος ομογενοποίησης, ακολουθεί ομογενοποίηση με έμβολο και στη συνέχεια το έμβολο ξεπλένεται με 50μl διαλύματος ομογενοποίησης. Τα δείγματα φυγοκεντρώνται για 30 sec στις 13.200 στροφές/λεπτό.
- ✓ Τα δείγματα επωάζονται στο υδατόλουτρο για 30 λεπτά στους 65°C.

- ✓ Προστίθενται 15μl οξικού καλίου 8M ενώ τα σωληνάκια είναι ακόμη ζεστά.
- ✓ Τα δείγματα επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά, ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάκι.
- ✓ Προστίθενται 200μl απιονισμένο νερό, 150 μl φαινόλη και 150μl χλωροφόρμιο. Ακολουθεί καλή ανάδευση και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάκι.
- ✓ Ακολουθούν 2 εκχυλίσσεις με χλωροφόρμιο ώστε να καθαριστεί το DNA από υπολείμματα φαινόλης. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάκι.
- ✓ Προστίθενται 2,5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100%, οξικό νάτριο 0.3M και 0.5μl γλυκογόνο το οποίο βοηθά στην κατακρήμνιση του DNA ως ίζημα. Τα δείγματα αναδεύονται, παραμένουν για 5 λεπτά στους  $-20^{\circ}\text{C}$  και στη συνέχεια φυγοκεντρούνται για 15 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό.
- ✓ Αποχύνεται το υπερκείμενο και προστίθεται στο ίζημα μισός όγκος παγωμένης αιθανόλης 70%. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό.
- ✓ Απομακρύνεται το υπερκείμενο και αφού ξηραθεί το ίζημα που είναι το DNA, επαναδιαλύεται σε 50 μl απιονισμένο νερό.

## **2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)**

Η PCR είναι μια μέθοδος που παρέχει την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA, το οποίο ορίζεται από ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών (primers). Για την PCR απαιτούνται επιπλέον 5' τριφωσφορικά δεοξυριβοζινουκλεοτίδια (dNTPs), η θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (Taq πολυμεράση), καθώς και  $\text{Mg}^{+2}$  τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση της πολυμεράσης. Η διαδικασία ενίσχυσης του επιθυμητού τμήματος DNA γίνεται *in vitro*.

Αρχικά το δείγμα DNA αναμειγνύεται με τους εκκινητές και το διάλυμα των ελεύθερων dNTPs και θερμαίνεται στους  $94-95^{\circ}\text{C}$  έτσι ώστε να αποδιαταχθεί



το δίκλωνο DNA. Στη συνέχεια, το δείγμα ψύχεται στους 55-65°C (ανάλογα με τη σύσταση και το μήκος των εκκινητών) ώστε οι εκκινητές να προσδεθούν στο μονόκλωνο DNA. Η θερμοκρασία πρόσδεσης των εκκινητών που χρησιμοποιείται είναι περίπου 5°C χαμηλότερα από τις θερμοκρασίες τήξης (T<sub>m</sub>) των ολιγονουκλεοτιδίων. Ακολουθεί πολυμερισμός του τμήματος DNA που ορίζεται από τους εκκινητές από την DNA πολυμεράση. Η πολυμεράση που χρησιμοποιείται στην PCR απομονώνεται από το θερμοφίλο αρχαιοβακτήριο *Thermus aquaticus* (Ταq πολυμεράση) [26].

Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για περίπου 30-40 κύκλους. Η ποσότητα του DNA διπλασιάζεται σε κάθε κύκλο, έτσι στο τέλος των 30 κύκλων η αρχική αλληλουχία θα έχει πολλαπλασιαστεί 2<sup>30</sup> φορές.

#### Αντιδραστήρια PCR

Στο διάλυμα της αντίδρασης περιέχονται:

40 ng δείγμα DNA (~2μl)

2.5 μl ρυθμιστικό διάλυμα ενζύμου (buffer) 10X (Promega)

1.5μl διάλυμα MgCl<sub>2</sub> (25Mm)

2μl dNTPs (2.5mM το καθένα)

1μl Εκκινητής 1

1μl Εκκινητής 2

0.2μl Ταq πολυμεράση 5u/μl (Promega)

14.8μl ddH<sub>2</sub>O

25μl            Σύνολο

Ως ζεύγος εκκινητών χρησιμοποιήθηκαν οι 18S: TCCGTAGGTGAACCTGCGG, 28S-5': TCCTCCGCTTATTGATATGC που ενισχύουν τα τμήματα ITS1, 5.8S και ITS2 του ριβοσωμικού DNA, δηλαδή τα τμήματα ανάμεσα στα γονίδια 18S και 28S. Επίσης χρησιμοποιήθηκε το ζεύγος εκκινητών 5.8S-5': AAGAACGCAGCAAACCTGTGC και 28S-5' που ενισχύουν τα τμήματα 5.8S και ITS2 του ριβοσωμικού DNA. Για την ενίσχυση ενός τμήματος (~1.6kb) μιτοχονδριακού DNA χρησιμοποιήθηκαν οι εκκινητές K698: TACAATTTATCGCCTAAACTTCAGCC και Pat: TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA που ενισχύουν το γονίδιο της κυτοχρωμικής οξειδάσης I.

## Συνθήκες PCR

### 1. Εκκινητές 18S/28S:

Αρχική αποδιάταξη	:	94°C	για	4min	→	1 κύκλος
Αποδιάταξη DNA	:	94°C	για	30sec	}	30 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	:	48°C	για	30sec		
Επιμήκυνση αλυσίδων	:	72°C	για	45sec		
Τελική επιμήκυνση	:	72°C	για	7min	→	1 κύκλος

### 2. Εκκινητές 5.8S-5'/28S-5':

Αρχική αποδιάταξη	:	94°C	για	4min	→	1 κύκλος
Αποδιάταξη DNA	:	94°C	για	30sec	}	24 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	:	50°C	για	30sec		
Επιμήκυνση αλυσίδων	:	72°C	για	45sec		
Τελική επιμήκυνση	:	72°C	για	7min	→	1 κύκλος

### 3. Εκκινητές K698/Pat:

Αρχική αποδιάταξη	:	95°C	για	3min	→	1 κύκλος
Αποδιάταξη DNA	:	94°C	για	1min	}	35 κύκλοι
Υβριδισμός εκκινητών	:	43°C	για	1min		
Επιμήκυνση αλυσίδων	:	72°C	για	90sec		
Τελική επιμήκυνση	:	72°C	για	5min	→	1 κύκλος

Τα δείγματα ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%.

### 2.3 Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης 1%

Η ηλεκτροφόρηση μορίων DNA σε πήκτωμα αγαρόζης είναι μια μέθοδος διαχωρισμού τμημάτων DNA που προκύπτουν από πέψη με ένζυμα περιορισμού ή από PCR. Φορτώνοντας ένα μάρτυρα δίπλα από τα δείγματά μας μπορούμε να διακρίνουμε το μέγεθος των ζωνών DNA των δειγμάτων μας [25]. Κατά την παρασκευή του πηκτώματος προσθέτουμε στο διάλυμα βρωμιούχο αιθίδιο. Το βρωμιούχο αιθίδιο είναι μια χρωστική, η οποία

παρεμβάλλεται μεταξύ των βάσεων που βρίσκονται στο κέντρο της έλικας του DNA [27].

### **Υλικά – Διαλύματα**

Δείγματα DNA

Αγαρόζη

Διάλυμα TBE Buffer 0.5X

Βρωμιούχο αιθίδιο

Διάλυμα φόρτωσης δειγμάτων

Μάρτυρας (DNA ladder)

Κωνική φιάλη των 250 ml

Φούρνος μικροκυμάτων

Πιάτο ηλεκτροφόρησης

Χτενάκια

Συσκευή ηλεκτροφόρησης

Αυτόματες μικροπιπέτες με ακροφύσια των 20μl

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 H<sub>2</sub>O.

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

### **Διαδικασία**

- ✓ 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 χλιαρύνει και προστίθεται 2μl βρωμιούχου αιθιδίου.
- ✓ Το πιάτο ηλεκτροφόρησης τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης έτσι ώστε να μη διαφεύγει υγρό διάλυμα από το πιάτο (στεγανοποίηση). Τα χτενάκια τοποθετούνται στο πιάτο ηλεκτροφόρησης και στη συνέχεια προστίθεται σε αυτό το διάλυμα αγαρόζης, το οποίο αφήνεται να στερεοποιηθεί περίπου 20 min.
- ✓ Όταν το διάλυμα στερεοποιηθεί, τα χτενάκια απομακρύνονται και στη συνέχεια το πιάτο τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία πληρώνεται με διάλυμα TBE 0.5X ώστε να καλύπτει το gel.

- ✓ Στα δείγματα που πρόκειται να ηλεκτροφορηθούν προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα διαλύματος φόρτωσης δειγμάτων (1μl στα 6μl δείγματος). Το διάλυμα αυτό προσδίδει μπλε χρώμα στο δείγμα και αυξάνει την πυκνότητά του λόγω της γλυκερόλης, ώστε να φορτώνεται 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 τάση 100V. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης καθορίζεται από το μέγεθος των ζωνών DNA που αναμένουμε ότι θα περιέχονται στα δείγματα που ηλεκτροφορούνται.
- ✓ Η εμφάνιση των ζωνών DNA πραγματοποιείται με την έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία. Η UV ακτινοβολία, η οποία απορροφάται από το DNA στα 260nm και μεταβιβάζεται στο βρωμιούχο αιθίδιο, εκπέμπεται στα 590nm στην ερυθρο-πορτοκαλί περιοχή του ορατού φάσματος με αποτέλεσμα να είναι ορατά τα διάφορα τμήματα του DNA ως ζώνες.

Αν οι ζώνες DNA που παρατηρούνται στην UV ακτινοβολία είναι οι αναμενόμενες, κόβεται η ζώνη DNA από το gel και ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης DNA από gel.

#### **2.4 Απομόνωση DNA από πήκτωμα αγαρόζης**

Ο καθαρισμός μορίων DNA από πήκτωμα αγαρόζης πραγματοποιείται με χρήση του kit απομόνωσης DNA από gel, Qiagen.

#### **Υλικά-Διαλύματα**

Σωληνάκια eppendorf

Υδατόλουτρο

Ζυγός

Φυγόκεντρος

Vortex

Αυτόματες μικροπιπέτες με ακροφύσια των 200μl και 1000μl

Διάλυμα DF

Διάλυμα Wash

### Διαδικασία

- ✓ Η επιθυμητή ζώνη DNA που έχει κοπεί από το gel τοποθετείται σε σωληνάκι erpendorf, στη συνέχεια προσδιορίζεται το βάρος του (δίδεται προσοχή, ώστε το βάρος του τμήματος gel να είναι <300mg).
- ✓ Προστίθενται 500μl DF διαλύματος και το μείγμα θερμαίνεται σε υδατόλουτρο στους 55°C, ώσπου να τηχθεί το gel (5-10 λεπτά).
- ✓ Προστίθενται 800μl του μείγματος σε ειδική στήλη που τοποθετείται σε σωλήνα συλλογής και το μείγμα φυγοκεντρείται 1 λεπτό στις 13.200 στροφές/λεπτό.
- ✓ Απομακρύνεται το διάλυμα από το σωλήνα συλλογής και προστίθενται 500μl διάλυμα Wash, στο οποίο έχει προστεθεί αιθανόλη ακολουθεί φυγοκέντρηση 1 λεπτό στις 13.200 στροφές/λεπτό.
- ✓ Απομακρύνεται το διάλυμα από το σωλήνα συλλογής και ακολουθεί φυγοκέντρηση 2 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό.
- ✓ Το DNA εκλούεται κάτω από χαμηλής ισχύος ιοντικές συνθήκες και ελαφρώς αλκαλικό pH με την προσθήκη στη στήλη 30μl απιονισμένου νερού.
- ✓ Μετά την προσθήκη 15μl νερού στη στήλη αφήνεται 2 λεπτά για να απορροφηθεί αυτό και φυγοκεντρείται 2 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό
- ✓ Επαναλαμβάνεται το τελευταίο βήμα.

### 2.5 Αντίδραση σύνδεσης μορίων (Ligation)

Η μέθοδος του ligation δίνει τη δυνατότητα εισαγωγής του επιθυμητού τμήματος DNA, σε έναν πλασμιδιακό φορέα γνωστής αλληλουχίας [25]. Το επιθυμητό τμήμα DNA έχει προηγουμένως πολλαπλασιαστεί σε πολλά

αντίγραφα με τη μέθοδο της PCR. Πριν τη διαδικασία του ligation το DNA που έχει καθαριστεί από πήκτωμα αγαρόζης ποσοτικοποιείται για να υπολογιστεί στη συνέχεια ο όγκος που απαιτείται για την αντίδραση ligation. Ο υπολογισμός της ποσότητας (σε ng) του DNA γίνεται από τον τύπο:

$$\frac{25ng \otimes xkbDNA}{3ngφορέα} \otimes \frac{3}{1}$$

### **Αντιδραστήρια**

Στο διάλυμα της αντίδρασης περιέχονται:

Δείγμα DNA

Φορέας pGem T-easy: 0.5μl

T4 DNA λιγάση: 1μl

ddH<sub>2</sub>O

Σύνολο: 10μl

Τα αντιδραστήρια προστίθενται σε σωληνάκια erpendorf και στη συνέχεια τα δείγματα επωάζονται ολονύκτια στους 16°C.

### **2.6 Μετασχηματισμός ανασυνδυασμένων πλασμιδίων σε δεκτικά κύτταρα *Escherichia coli***

Τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια που προκύπτουν μετά την αντίδραση ligation εισάγονται σε βακτηριακά κύτταρα ώστε να ελεγχθεί ποια πλασμίδια εισήγαγαν το επιθυμητό τμήμα DNA [25].

#### **Υλικά-Διαλύματα**

Μείγμα αντίδρασης ligation

Υδατόλουτρο

Πάγος

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Φυγόκεντρος

Σωληνάκια erpendorf

Αυτόματες μικροπιπέτες

Επωαστήρας

Επωαστήρας με αναδευτήρα

Αιθανόλη

Διάλυμα x-gal

Διάλυμα IPTG

Διάλυμα δεκτικών κυττάρων *Escherichia coli*

Θρεπτικό μέσο SOC: Σε 800ml απιονισμένου νερού προστίθενται 20g bacto-tryptone, 5g εκχύλισμα bacto-yeast, 0.5g NaCl και αναδεύονται. Στη συνέχεια προστίθενται 10ml KCl 250mM, 5ml MgCl<sub>2</sub> 2M και συμπληρώνεται το διάλυμα με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 1000ml. Ακολουθεί αποστείρωση του διαλύματος και στη συνέχεια προστίθενται 20ml γλυκόζης.

Τριβλία LB άγαρ/αμπικιλίνη: Σε 800ml απιονισμένου νερού προστίθενται 30g LB άγαρ, 5g NaCl και αναδεύονται. Συμπληρώνεται το διάλυμα με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 1000ml και ακολουθεί αποστείρωση. Προστίθεται 1 ml αντιβιοτικού λίγο πριν την επίστρωση των τριβλίων όταν η θερμοκρασία έχει μειωθεί στους 55°C.

#### Διαδικασία:

- ✓ Σε 200μl κυτάρων *Escherichia coli* προστίθεται η μισή ποσότητα της αντίδρασης ligation (5μl) και στη συνέχεια το δείγμα επωάζεται στον πάγο για 30 λεπτά.
- ✓ Το δείγμα μεταφέρεται για 90 sec στο υδατόλουτρο στους 42°C και στη συνέχεια για 2 λεπτά στον πάγο. Το στάδιο αυτό ονομάζεται θερμικό σοκ και καθιστά τα κύτταρα ικανά (δεκτικά) να ενσωματώσουν το πλασμίδιο.
- ✓ Σε δοκιμαστικό σωλήνα που έχουν προστεθεί 800μl θρεπτικό μέσο SOC προστίθεται το δείγμα. Ακολουθεί επώαση για 60 λεπτά σε επωαστήρα στους 37°C, με ανάδευση στις 180 στροφές/λεπτό.
- ✓ Από το 1 ml τα 200μl τοποθετούνται σε σωληνάκι erpendorf και τα υπόλοιπα 800μl σε άλλο. Το σωληνάκι με τα 800μl φυγοκεντρείται, αφαιρούνται 600μl και αναδιαλύεται το ίζημα.
- ✓ Το περιεχόμενο των σωληνίων erpendorf επιστρώνεται σε τριβλία. Σε κάθε τριβλίο προστίθενται επίσης 30μl x-gal και 3μl IPTG. Ο πλασμιδιακός φορέας περιλαμβάνει το γονίδιο της β-γαλακτοσιδάσης, το οποίο όταν εκφραστεί διασπάται x-gal το οποίο προσδίδει στην αποικία μπλε χρώμα. Αν ένα τμήμα DNA εισέλθει στο φορέα, το αναγνωστικό πλαίσιο του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης διακόπτεται, το γονίδιο δεν εκφράζεται, δε διασπάται x-gal και οι αποικίες που παρατηρούνται θα έχουν άσπρο χρώμα. Αυτό είναι χρήσιμο στην

παρατήρηση και επιλογή από τα τριβλία των αποικιών των βακτηρίων που ενσωμάτωσαν ανασυνδυασμένους φορείς, που είναι οι άσπρες.

- ✓ Τα τριβλία αφήνονται 30 λεπτά να στεγνώσουν και στη συνέχεια τοποθετούνται σε επωαστήρα ολονύκτια στους 37°C.

## 2.7 Υγρή καλλιέργεια βακτηρίων *Escherichia coli*

Κατά τη διαδικασία αυτή επιλέγονται άσπρες αποικίες από τα τριβλία LB άγαρ/αμπικιλίνη που επιστρώθηκαν με βακτηριακά κύτταρα *Escherichia coli*. Τα βακτήρια αυτά υπάρχει μεγάλη πιθανότητα να ενσωμάτωσαν το επιθυμητό τμήμα DNA.

### **Υλικά-Διαλύματα**

Δοκιμαστικοί σωλήνες

Οδοντογλυφίδες

Πιπέττα των 5 ml

Φούσκα

Επωαστήρας με αναδευτήρα

Τριβλία μα άσπρες και μπλε αποικίες

Θρεπτικό μέσο LB/αμπικιλίνη: Σε 800ml απιονισμένου νερού προστίθενται 15g LB Broth (10g casein peptone και 5g εκχύλισμα μαγιάς) και 5g NaCl. Ακολουθεί ανάδευση και συμπληρώνεται το διάλυμα με απιονισμένο νερό σε τελικό όγκο 1000ml. Στη συνέχεια το διάλυμα αποστειρώνεται. Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος πέσει στους 55°C προστίθεται 1 ml αμπικιλίνης.

### Διαδικασία:

- ✓ Προστίθενται 2.5 ml θρεπτικό μέσο LB/αμπικιλίνη σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα.
- ✓ Λαμβάνονται με οδοντογλυφίδες άσπρες αποικίες από τα τριβλία και τοποθετούνται στους σωλήνες που περιέχουν το θρεπτικό μέσο (1 οδοντογλυφίδα σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα).
- ✓ Οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνται στον επωαστήρα ολονύκτια στους 37°C με ανάδευση στις 220 στροφές/λεπτό.



## 2.8 Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακή καλλιέργεια

Η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε είναι η αλκαλική λύση, η οποία αποδίδει πλασμίδιο υψηλής καθαρότητας κατάλληλο για τον προσδιορισμό της πρωτοταγούς δομής της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Η μέθοδος σχετίζεται με την 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 [25]. Τέλος το πλασμιδιακό DNA κατακρημνίζεται με αιθανόλη.

### **Υλικά-Διαλύματα**

Μετασηματισμένα βακτηριακά κύτταρα

Παγωμένη αιθανόλη 70% και 100%

Πάγος

Φυγόκεντρος

Σωληνάκια erpendorf

Vortex

Αυτόματες μικροπιπέτες με ακροφύσια των 200μl και 1000μl

Διάλυμα οξικού καλίου (pH 4.8)

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

Διάλυμα λύσης : 0.2 N NaOH, 1% SDS

Διάλυμα επαναδιάλυσης DNA: TE/RNase 20μg/ml: 10 mM Tris, 1mM EDTA, 20 μg RNase

### Διαδικασία:

- ✓ Σε σωληνάκι erpendorf μεταφέρεται 1.5 ml κορεσμένης βακτηριακής καλλιέργειας. Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό. Απομακρύνεται το υπερκείμενο υγρό και το ίζημα κρατείται σε πάγο.
- ✓ Το ίζημα αναδιαλύεται σε 100μl παγωμένου διαλύματος GET με τη βοήθεια vortex. Το EDTA που εμπεριέχεται στο διάλυμα δεσμεύει τα δισθενή κατιόντα ( $\text{Ca}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ) τα οποία είναι απαραίτητα για τη δράση των νουκλεασών. Το σωληνάκι με το δείγμα αφήνεται 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- ✓ Προστίθενται 200μl από πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα λύσης. Το μείγμα αναδεύεται ήπια για να μη θρυμματιστεί το DNA και τοποθετείται στον πάγο για λιγότερο από 5 λεπτά ώστε να αποφεύγεται

η μετουσίωση του πλασμιδίου. Το SDS λύνει τη κυτταρική μεμβράνη και αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες. Σε αυτό καθώς και στη διάσπαση των φωσφορικών δεσμών του RNA βοηθάει το υψηλό pH (>12) που οφείλεται στη παρουσία του υδροξειδίου του θείου. Το NaOH, επίσης συστατικό του διαλύματος λύσης, συμμετέχει στη καταστροφή των πρωτεϊνών, λόγω της ικανότητάς του να καταστρέφει τους δεσμούς υδρογόνου και Van der Waals.

- ✓ Προστίθενται 150μl παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου (pH 4.8), ακολουθεί ανάμειξη με ήπιο vortex. Το δείγμα τοποθετείται στον πάγο για 10 λεπτά. Το διάλυμα οξικού καλίου σταματά τη λύση που προκλήθηκε από το SDS. Το κάλιο προκαλεί τη κατακρήμνιση του SDS όπως και των πρωτεϊνών και υπολειμμάτων της μεμβράνης που είναι συνδεδεμένα σε αυτό. Μέρος του χρωμοσωμικού DNA είναι ενωμένο σε σημεία της κυτταρικής μεμβράνης κι επομένως κατακρημνίζεται και αυτό.
- ✓ Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό. Το υπερκείμενο, το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA, μεταφέρεται σε καινούριο σωληνάκι erpendorf. Το ίζημα που παρατηρείται μετά τη φυγοκέντρηση είναι χρωμοσωμικό DNA.
- ✓ Προστίθενται 2-2.5 όγκοι παγωμένης αιθανόλης 100% (1 ml). Ακολουθεί ανάμειξη με vortex και το δείγμα παραμένει σε θερμοκρασία δωματίου για 2-3 λεπτά. Με την προσθήκη αιθανόλης το DNA καθαρίζεται (αφαλατώνεται) και επανακτάται ως ίζημα μετά από φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό.
- ✓ Το υπερκείμενο απομακρύνεται και στο ίζημα προστίθεται 1 όγκος (500μl) παγωμένης αιθανόλης 70%. Το δείγμα ανακατεύεται ήπια και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 13.200 στροφές/λεπτό.
- ✓ Αποχύνεται το υπερκείμενο και το ίζημα αφήνεται για να ξηραθεί. Στη συνέχεια το ίζημα, που αποτελεί το πλασμιδιακό DNA, επαναδιαλύεται σε 100μl TE/RNase.

## 2.9 Πέψη πλασμιδιακού DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες

Τα ένζυμα περιοριστικές ενδονουκλεάσες παράγονται από βακτήρια. Τα ένζυμα αυτά προστατεύουν τα βακτήρια από φάγους που εισβάλλουν στο εσωτερικό τους με την αποικοδόμηση των μορίων DNA των φάγων. Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού διασπούν φωσφοδιεστερικούς δεσμούς σε συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων δημιουργώντας έτσι τμήματα DNA με τυφλά ή προεξέχοντα άκρα ανάλογα με την αλληλουχία που αναγνωρίζουν [25]. Οι ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν για τη πέψη του πλασμιδιακού DNA είναι η *EcoRI*, η οποία κόβει τον πλασμιδιακό φορέα σε 2 σημεία εκατέρωθεν του ενθέματός μας. Χρησιμοποιήθηκε επίσης και η *PvuII* που και αυτή κόβει το πλασμίδιο σε 2 σημεία. Είναι άγνωστο αν αυτά τα ένζυμα έχουν θέση κοπής μέσα στο ένθεμά μας.

### **Αντιδραστήρια**

Η αντίδραση περιέχει:

Πλασμιδιακό DNA: 2μl

Ένζυμο (*EcoRI* ή *PvuII*): 0.2μl

Ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) 10X: 1.5μl

dd H<sub>2</sub>O: 11.3μl

Σύνολο: 15μl

Τα δείγματα επωάζονται για 1 ώρα στους 37°C. Στη συνέχεια ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης, έτσι ώστε να ελεγχθεί αν τα πλασμίδια περιέχουν το ένθεμά μας.

## 2.10 Υβριδοποίηση κατά Southern

Η μέθοδος υβριδοποίησης κατά Southern χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί αν ενισχυμένα τμήματα DNA με τη μέθοδο της PCR με ζεύγος εκκινητών τους 18S/28S από δάκο των περιοχών Solano και Yolo είναι ριβοσωμικό DNA.

Η διαδικασία περιλαμβάνει 4 φάσεις:

- A. Μεταφορά του DNA και σταθεροποίησή του από το πήκτωμα σε μεμβράνη.
- B. Σήμανση ανιχνευτή.

Γ. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή.

Δ. Εμφάνιση σήματος.

A. Μεταφορά του DNA και σταθεροποίησή του από το πήκτωμα σε μεμβράνη.

**Υλικά-Διαλύματα**

Πήκτωμα αγαρόζης

Χαρτί Whatman

Μεμβράνη

Χαρτοπετσέτες

Απιονισμένο νερό

Αναδευτήρας

Πιπέτες pasteur

Διάλυμα αποδιάταξης: 1.5M NaCl, 0.5M NaOH

Διάλυμα εξουδετέρωσης: 1M Tris (pH 7.4), 1.5M NaCl

Διάλυμα SSC 6X

Διάλυμα SSC 10X

Διαδικασία:

- ✓ Το gel τοποθετείται σε δοχείο στο οποίο προστίθεται διάλυμα αποδιάταξης. Τοποθετείται στον αναδευτήρα για 15 λεπτά προσέχοντας το gel να καλύπτεται από το διάλυμα κατά τη ανάδευση.
- ✓ Αφού απομακρυνθεί το διάλυμα αποδιάταξης επαναλαμβάνεται το προηγούμενο βήμα.
- ✓ Αποχύνεται το διάλυμα αποδιάταξης και το gel ξεπλένεται με απιονισμένο νερό.
- ✓ Προστίθεται διάλυμα εξουδετέρωσης στο δοχείο. Τοποθετείται στον αναδευτήρα για 20 λεπτά προσέχοντας το gel να καλύπτεται από το διάλυμα κατά τη ανάδευση. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.
- ✓ Αποχύνεται το διάλυμα εξουδετέρωσης και το gel ξεπλένεται με απιονισμένο νερό. Στη συνέχεια, προστίθεται διάλυμα SSC 6X για 2-5 λεπτά.
- ✓ Κόβεται η μεμβράνη με διαστάσεις αυτές του gel. Στη συνέχεια διαβρέχεται με απιονισμένο νερό και μετά με διάλυμα SSC 6X.
- ✓ Το gel τοποθετείται σε επίπεδη επιφάνεια ανάποδα (τα πηγαδάκια να είναι προς τα κάτω). Πάνω από το gel τοποθετείται η μεμβράνη.

- ✓ Στις ίδιες διαστάσεις με αυτές τις μεμβράνης κόβονται 4 χαρτιά Whatman, από τα οποία τα 2 διαβρέχονται με διάλυμα SSC 6X. Πρώτα τοποθετούνται πάνω από τη μεμβράνη τα βρεγμένα κομμάτια και μετά τα άλλα 2 στεγνά.
- ✓ Κόβονται χαρτοπετσέτες σε διαστάσεις 0.5 cm μικρότερες από της μεμβράνης και τοποθετούνται πάνω από τα χαρτιά Whatman.
- ✓ Στην επιφάνεια που είναι τοποθετημένο το gel προστίθεται με πιπέτα Pasteur διάλυμα SSC 10X (buffer μεταφοράς), παραμένει ολονύκτια ώστε να μεταφερθεί το DNA από το gel στη μεμβράνη. Πάνω από τις χαρτοπετσέτες τοποθετείται κάποιο βάρος ώστε να πιέζονται.

### B. Σήμανση ανιχνευτή.

Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το τμήμα DNA που ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR με εκκινητές τους 18S/28S από δάκο Πηλίου. Το τμήμα αυτό έχει μέγεθος περίπου 1.4 kb.

Η σήμανση έγινε με αντίδραση «τυχαίας εκκίνησης», όπου αποδιαταγμένο DNA αναμειγνύεται με τυχαία εξαμερή νουκλεοτιδίων στους 37°C, την Klenow DNA πολυμεράση και δεοξυριβονουκλεοτίδια, παρουσία αλάτων και ρυθμιστικού διαλύματος που βοηθούν τη δράση της πολυμεράσης. Τα εξαμερή λειτουργούν ως εκκινητές για την DNA πολυμεράση, η οποία δημιουργεί νέες αλυσίδες έχοντας ως εκμαγείο το αποδιαταγμένο DNA. Αν ένα από τα νουκλεοτίδια φέρει κάποιο σήμα, η αλυσίδα που θα δημιουργηθεί θα είναι σημασμένη. Ως σήμα χρησιμοποιήθηκαν μόρια βιοτίνης προσκολλημένα σε dATPs.

### **Υλικά-Διαλύματα**

Σωληνάκια erpendorf  
Γυάλινο ποτήρι ζέσεως  
Θερμαντική πλάκα  
Επωαστήρας

### **Αντιδραστήρια**

DNA από δάκο Πηλίου  
Hexa-buffer 5X  
dd H<sub>2</sub>O  
dNTPs-dATPs

bio-dATPs

Klenow DNA πολυμεράση

#### Διαδικασία:

- ✓ Σε σωληνάκι erpendorf προστίθενται 300 ng/μl DNA (~3.5μl), hexa-buffer 5X 10μl και 26.1μl dd H<sub>2</sub>O. Το σωληνάκι τοποθετείται σε γυάλινο ποτήρι βρασμού που περιέχει νερό. Αφήνεται να βράσει για 10 λεπτά, ώστε να αποδιαταχθεί.
- ✓ Μετά το βρασμό, στο erpendorf προστίθενται dNTPs-dATPs 5μl, bio-dATPs 4.4μl και Klenow DNA πολυμεράση 1μl. Ο συνολικός όγκος αντιδραστηρίων στο σωληνάκι είναι 50μl.
- ✓ Το δείγμα επωάζεται ολονύκτια στους 37°C.

#### Γ. Υβριδοποίηση του DNA της μεμβράνης με το σημασμένο ανιχνευτή.

##### **Υλικά-Διαλύματα**

Μεμβράνη

Σωλήνας υβριδοποίησης

Γυάλινο ποτήρι ζέσεως

Θερμαντική πλάκα

Επωαστήρας υβριδοποίησης

DNA σπέρματος σολομού (ssDNA)

Ανιχνευτής

Διάλυμα υβριδοποίησης: 5X Denhards, 0.5% SDS, 6X SSC

##### **Προϋβριδοποίηση**

Στο στάδιο της προϋβριδοποίησης, το DNA σπέρματος σολομού που χρησιμοποιείται συνδέεται μη ειδικά σε μη ομόλογες περιοχές της μεμβράνης εμποδίζοντας τη μετέπειτα σύνδεση του ανιχνευτή σε μη ομόλογες αλληλουχίες.

#### Διαδικασία:

- ✓ Τοποθετείται η μεμβράνη στο σωλήνα υβριδοποίησης ώστε η επιφάνεια της μεμβράνης που φέρει το DNA να είναι προς το εσωτερικό του σωλήνα.

- ✓ Στο σωλήνα υβριδοποίησης προστίθενται 0.2 ml διαλύματος υβριδοποίησης για κάθε cm<sup>2</sup> μεμβράνης και 10μg/ml διαλύματος υβριδοποίησης ssDNA. Πριν προστεθεί το ssDNA βράζεται για 10 λεπτά ώστε να γίνει μονόκλωνο.
- ✓ Ο σωλήνας τοποθετείται στον επωαστήρα υβριδοποίησης στους 68°C για μία ώρα.

## Υβριδοποίηση

### Διαδικασία:

- ✓ Ο ανιχνευτής αφήνεται να βράσει για 10 λεπτά αφού τοποθετηθεί σε γυάλινο ποτήρι βρασμού που περιέχει νερό, ώστε να γίνει μονόκλωνος.
- ✓ Αφαιρείται μικρή ποσότητα διαλύματος υβριδισμού, προσέχοντας να καλύπτεται ακόμα η μεμβράνη από το εναπομείνον διάλυμα.
- ✓ Προστίθεται ο ανιχνευτής και στη συνέχεια ο σωλήνας τοποθετείται στον επωαστήρα υβριδοποίησης στους 68°C ολονύκτια.

### Δ. Εμφάνιση σήματος.

Η ανίχνευση του σήματος βασίζεται στην ικανότητα ισχυρής σύνδεσης της βιοτίνης με τη στρεπταβιδίνη.

### **Υλικά-Διαλύματα**

Δοχείο τοποθέτησης της μεμβράνης

Μεμβράνη

Σωλήνας falcon των 50 ml

Αναδευτήρας

Επωαστήρας με αναδευτήρα

Αντίσωμα (στρεπταβιδίνη)

Υδατόλουτρο

Διάλυμα πλύσης 1: 2X SSC, 0.1% SDS

Διάλυμα πλύσης 2: 0.2X SSC, 0.1% SDS

Διάλυμα A: 100mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7.5

Διάλυμα B: Διάλυμα A, 1% διάλυμα blocking

Διάλυμα C: 100mM Tris, 100mM NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9.5

NBT: Nitro-Blue-Tetrazolium-Cloride

BCIP: 5Bromo-4Cloro-3Indolyl-Phosphatate

DMF: N,N Dimethyl-Formamide

### Πλύσεις

Τα διαλύματα πλύσης 1 και 2 απομακρύνουν τον ανιχνευτή που είναι συνδεδεμένος μη ειδικά στη μεμβράνη.

- ✓ Ο ανιχνευτής συλλέγεται σε σωλήνα falcon των 50 ml και φυλάγεται στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Η μεμβράνη τοποθετείται σε δοχείο. Προστίθεται διάλυμα πλύσης 1 προσέχοντας να καλύψει τη μεμβράνη. Τοποθετείται στον αναδευτήρα για 5 λεπτά και στη συνέχεια το διάλυμα αποχύνεται. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.
- ✓ Προστίθεται διάλυμα πλύσης 2 και το δοχείο τοποθετείται στον επωαστήρα με αναδευτήρα στους  $68^{\circ}\text{C}$  για 15 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα αποχύνεται. Το βήμα αυτό επαναλαμβάνεται.

### Διαδικασία εμφάνισης σήματος:

- ✓ Στο δοχείο προστίθεται διάλυμα A και τοποθετείται στον αναδευτήρα για 1 λεπτό. Στη συνέχεια το διάλυμα αποχύνεται και προστίθεται διάλυμα B. Το δοχείο τοποθετείται στον αναδευτήρα για 30 λεπτά.
- ✓ Το διάλυμα B αποχύνεται και στη συνέχεια προστίθεται διάλυμα B με αντίσωμα σε αναλογία 5ml αντισώματος/10 ml διαλύματος. Το δοχείο τοποθετείται στον αναδευτήρα για 30 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα B με αντίσωμα συλλέγεται σε σωλήνα falcon των 50 ml και φυλάγεται στους  $4^{\circ}\text{C}$ .
- ✓ Προστίθεται διάλυμα A για 15 λεπτά με ανάδευση. Το διάλυμα αποχύνεται και στη συνέχεια προστίθεται ξανά διάλυμα A για 15 λεπτά με ανάδευση.
- ✓ Το διάλυμα A αποχύνεται και προστίθεται διάλυμα C για 2 λεπτά. Το διάλυμα C παρασκευάζεται λίγα λεπτά πριν χρησιμοποιηθεί.
- ✓ Παρασκευάζεται το διάλυμα ανίχνευσης σήματος (10 ml διάλυμα C, 50ml NBT, 37.5ml BCIP). Το διάλυμα αναμειγνύεται καλά και



προστίθεται στη μεμβράνη, η οποία έχει τοποθετηθεί σε τριβλίο προσέχοντας η επιφάνεια που φέρει το DNA να είναι προς τα επάνω.

- ✓ Ελέγχεται συχνά για εμφάνιση σήματος. Μετά την εμφάνιση σήματος για να σταματήσει η αντίδραση η μεμβράνη ξεπλένεται με νερό.
- ✓ Αν η αντίδραση προχωρήσει αρκετά για να γίνει το σήμα ευδιάκριτο η μεμβράνη αποχρωματίζεται τοποθετώντας τη σε DMF για 10 λεπτά στους 50°C.

### **2.11 Ανάλυση αλληλουχίας του DNA**

Ο καθορισμός της πρωτοταγούς δομής του DNA πραγματοποιείται με ενζυμική μέθοδο. Κατά τη μέθοδο αυτή το DNA που πρόκειται να αναλυθεί χρησιμοποιείται ως εκμαγείο για την *in vitro* σύνθεση από DNA πολυμεράση, σημασμένου DNA η οποία τερματίζει με τη χρήση διδεοξυνουκλεοτιδίων. 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.

Ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των διάφορων τμημάτων DNA από κάθε περιοχή που απομονώθηκαν, πραγματοποιήθηκε από την εταιρεία Macrogen, η οποία εδρεύει στην Κορέα. Για την αντίδραση του καθορισμού της αλληλουχίας απαιτούνται 1000ng DNA από κάθε δείγμα. Υπολογίζεται η ποσότητα που απαιτείται από κάθε δείγμα μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης και τοποθετείται σε σωληνάκια erpendorf. Τα δείγματα αποστέλλονται στην εταιρεία.

### **2.12 Ανάλυση αποτελεσμάτων**

Οι αλληλουχίες των τμημάτων DNA που εστάλησαν από την εταιρεία, επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Omega 2.0 (Oxford Molecular Ltd) και έγινε σύγκριση των αλληλουχιών με γνωστές αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος Blast. Η ομοπαράθεση των αλληλουχιών, ο πίνακας των γενετικών αποστάσεων και η δημιουργία του δενδρογράμματος έγιναν με τη βοήθεια του προγράμματος Mega version 3.0 [37].

### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

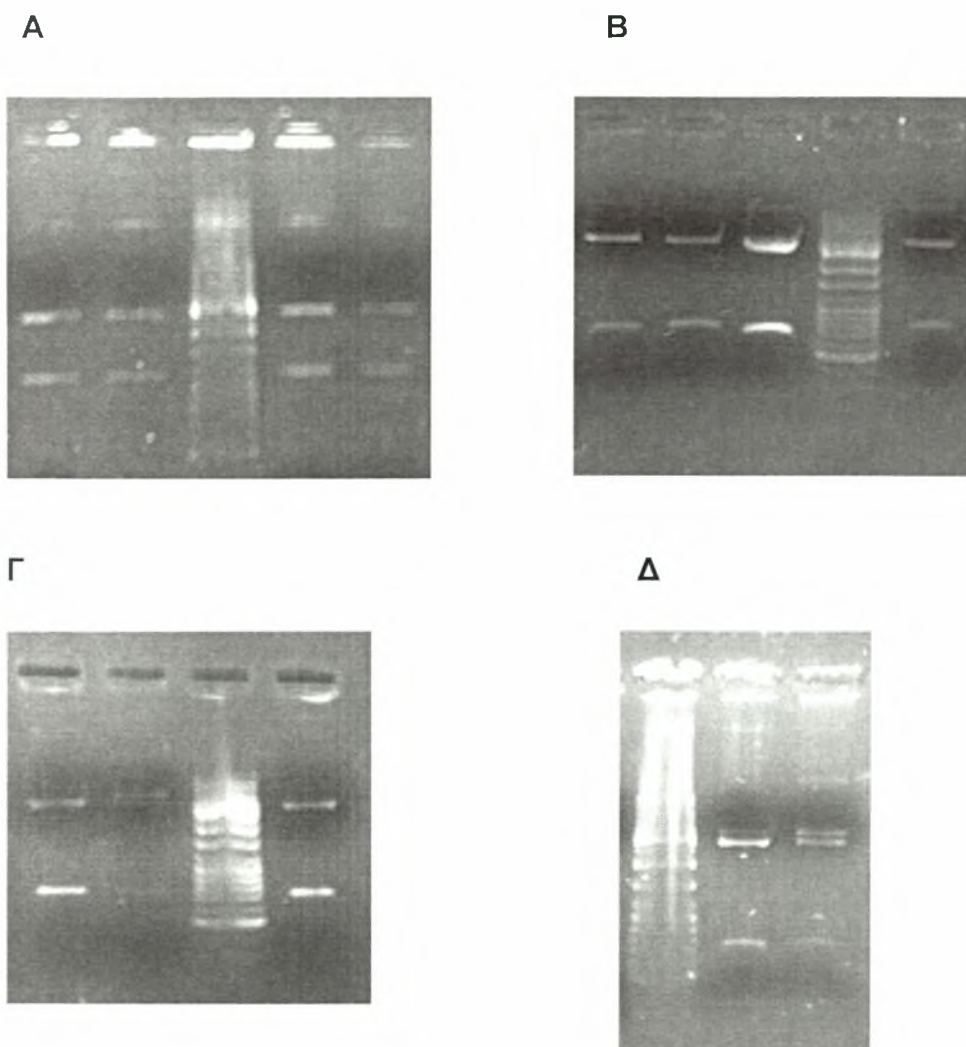
#### 3.1 Ενίσχυση με PCR τμημάτων mtDNA και rDNA

Τα επιθυμητά τμήματα DNA που έχουν ενισχυθεί με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) μετά από κλωνοποίησή τους, η διαδικασία της οποίας αναλύθηκε στην παράγραφο «Μέθοδοι και Υλικά», απομονώθηκαν και στάλθηκαν για να προσδιοριστεί η αλληλουχία τους στην εταιρεία Macrogen, η οποία εδρεύει στην Κορέα.

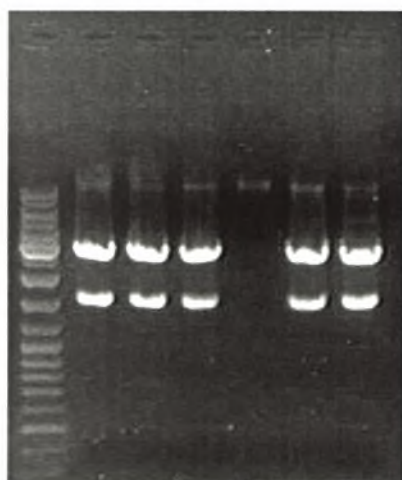
Οι αλληλουχίες που ενισχύθηκαν με τη μέθοδο της PCR, εισήχθησαν σε πλασμιδιακό φορέα, κλωνοποιήθηκαν σε βακτήρια *Esherichia coli* και στη συνέχεια απομονώθηκε το πλασμιδιακό DNA ώστε να σταλεί για να καθοριστεί η αλληλουχία του. Δεν επιλέχθηκε να σταλεί απ'ευθείας το προϊόν της αντίδρασης PCR για τον προσδιορισμό της αλληλουχίας του, αφ' ενός γιατί η αντίδραση PCR έδινε ποσότητα DNA που δεν επαρκούσε για την αντίδραση καθορισμού της αλληλουχίας και αφ' ετέρου για να λάβουμε καθαρή ολόκληρη την αλληλουχία (οι εκκινητές που «διαβάζουν» την αλληλουχία προσδένονται πάνω στα άκρα της με αποτέλεσμα σε αυτές οι περιοχές να μην είναι αρκετά ακριβής ο προσδιορισμός της αλληλουχίας).

Η κλωνοποίηση και απομόνωση ολοκληρώθηκε επιτυχώς για το τμήμα mtDNA (~1.6 kb) που απομονώθηκε από δάκο της περιοχής Solano της Καλιφόρνιας. Όσον αφορά το ριβοσωμικό DNA και τους εκκινητές 18S/28S, απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε επιτυχώς το επιθυμητό τμήμα από DNA δάκου της περιοχής Πήλιο της Ελλάδας (~1.4 kb) και από τις περιοχές Yolo και Solano της Καλιφόρνιας. Ο δάκος των περιοχών της Καλιφόρνιας έδωσε όμως μικρότερου μεγέθους τμήμα (~0.6 kb) σε σχέση με το αναμενόμενο (~1.4 kb). Ακόμη, με εκκινητές τους 5.8S-5'/28S-5', η διαδικασία ήταν επιτυχής για τα τμήματα DNA που απομονώθηκαν από δάκο των περιοχών Κύπρου, Πορτογαλίας, Μυτιλήνη Ελλάδας, Yolo και Solano Καλιφόρνιας και Murcia Ισπανίας (~0.8 kb).

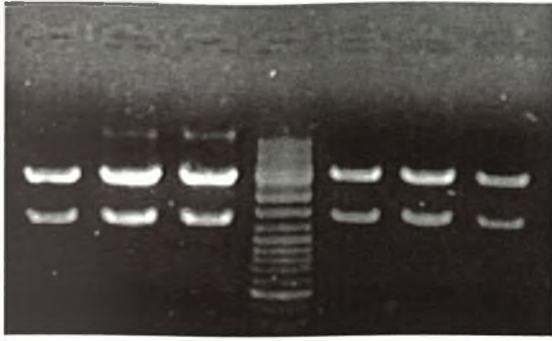
Τα αποτελέσματα των πέψεων με EcoRI που πιστοποίησαν την επιτυχημένη κλωνοποίηση των επιθυμητών τμημάτων DNA μέσα σε φορέα pGem παρουσιάζονται στις εικόνες 11, 12, 13.



Εικόνα 11. Φωτογραφίες ηλεκτροφορήσεων σε πήκτωμα 1%, 0.5X TBE των πέψεων με EcoRI 2μl δειγμάτων απομονωμένου πλασμιδιακού DNA. Το ένθεμα αντιστοιχεί σε τμήμα ~800 pb. (A) Διακρίνεται ο μάρτυρας στο κέντρο, αριστερά του τα δείγματα 1 και 3 από δάκο Πορτογαλίας και δεξιά του τα δείγματα 1 και 2 από δάκο Καλιφόρνιας της περιοχής Solano. (B) Αριστερά του μάρτυρα φαίνονται τα δείγματα 1-3 και δεξιά του το δείγμα 4 από δάκο Κύπρου. (Γ) Αριστερά του μάρτυρα φαίνονται τα δείγματα 3 και 4 από δάκο Καλιφόρνιας της περιοχής Yolo, δεξιά του φαίνεται το δείγμα 4 από δάκο Ισπανίας της περιοχής Murcia. (Δ) Τα 2 δείγματα δεξιά του μάρτυρα προέρχονται από δάκο Ελλάδας, συγκεκριμένα Μυτιλήνης.



Εικόνα 12. Φωτογραφία ηλεκτροφορήσεων σε πήκτωμα 1%, 0.5X TBE των πέψεων με EcoRI 2μl των 6 δειγμάτων απομονωμένου πλασμιδιακού DNA (1-6 από αριστερά προς τα δεξιά). Διακρίνεται το μέγεθος του πλασμιδιακού φορέα (~3 kb) σε σύγκριση με τον μάρτυρα (αριστερά), καθώς και το μέγεθος του ενθέματος. Το ένθεμα αυτό αντιστοιχεί σε τμήμα ~1.6 kb του mtDNA δάκου από το Solano της Καλιφόρνιας. Επιλέχθηκε να σταλεί για την αντίδραση καθορισμού της αλληλουχίας, μέρος του δείγματος 1.



Εικόνα 13. Φωτογραφία ηλεκτροφορήσεων σε πήκτωμα 1%, 0.5X TBE των πέγεων με EcoRI 2μl των 6 δειγμάτων απομονωμένου πλασμιδιακού DNA (1-6 από αριστερά προς τα δεξιά). Διακρίνεται το μέγεθος του πλασμιδιακού φορέα (~3 kb) σε σύγκριση με τον μάρτυρα (στο κέντρο), καθώς και το μέγεθος του ενθέματος. Το ένθεμα αυτό αντιστοιχεί σε τμήμα ~1.4 kb του rDNA δάκου από το Πήλιο της Ελλάδας. Επιλέχθηκε να σταλεί για την αντίδραση καθορισμού της αλληλουχίας, μέρος του δείγματος 2.

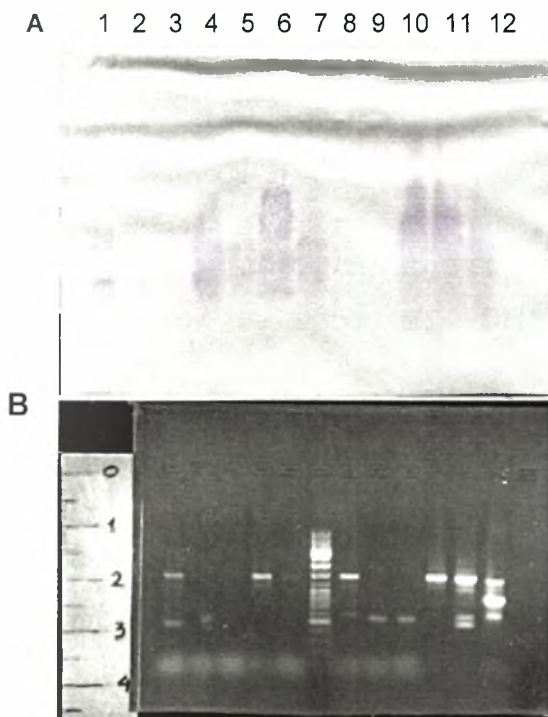
Όπως αναφέρθηκε στις «Μεθόδους και Υλικά», η περιοχή του mtDNA που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για τη σύγκριση των ατόμων δάκου με διαφορετική προέλευση είναι μέρος του γονιδίου της κυτοχρωμικής οξειδάσης I. Η συγκεκριμένη περιοχή επιλέχθηκε επειδή είναι υψηλά συντηρημένη ανάμεσα στα άτομα ενός είδους με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η σύγκριση των αλληλουχιών αλλά και η εύρεση μικρών διαφορών ανάμεσα στα άτομα.

Όσον αφορά την περιοχή του rDNA που επιλέχθηκε, αρχικά χρησιμοποιήθηκε ζεύγος εκκινητών που ξεκινώντας από τα γονίδια 18S και 28S ενισχύουν τα τμήματα ITS1, 5.8S και ITS2 του ριβοσωμικού DNA. Όμως, εξαιτίας του μεγέθους της αλληλουχίας που ενισχύεται (~1.4kb), η διαδικασία της ενίσχυσης, της κλωνοποίησης και της απομόνωσης δεν ήταν επιτυχημένη για τα περισσότερα δείγματα DNA που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχθηκε ένα ζεύγος εκκινητών που ενισχύουν το γονίδιο 5.8S και την αλληλουχία ITS2 ως την αρχή του γονιδίου 28S. Η συγκεκριμένη περιοχή του rDNA επιλέχθηκε γιατί περιλαμβάνει συντηρημένες αλληλουχίες όπως είναι τα γονίδια 18S, 5.8S και 28S που χρησιμεύουν για το σχεδιασμό εκκινητών, αλλά και περιοχές ανάμεσα στα γονίδια (ITS1 και ITS2) που τείνουν να συσσωρεύουν ευκολότερα μεταλλάξεις. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εύρεση περισσότερων διαφορών στη σύγκριση μεταξύ αλληλουχιών που προέρχονται από άτομα του ίδιου είδους.

### 3.2 Έλεγχος προϊόντων PCR με υβριδοποίηση κατά Southern

Οι rDNA αλληλουχίες του δάκου περιοχών της Καλιφόρνιας έδωσαν μικρότερου μεγέθους τμήμα (~0.6 kb) σε σχέση με το αναμενόμενο (~1.4 kb). Για να διευκρινίσουμε αν τα προϊόντα της PCR και ιδιαίτερα αν τα μικρότερου μεγέθους τμήματα που προήλθαν από τα άτομα της Καλιφόρνιας ήταν όντως rDNA αλληλουχίες προχωρήσαμε σε υβριδοποίηση κατά Southern των προϊόντων της PCR.

Για την υβριδοποίηση κατά Southern χρησιμοποιήθηκε ως ανιχνευτής το τμήμα DNA που ενισχύθηκε με τη μέθοδο της PCR με εκκινητές τους 18S/28S από δάκο Πηλίου (~1.4 kb), το οποίο ήταν γνωστό μετά τη σύγκρισή του με άλλες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων (με χρήση του προγράμματος Blast) ότι αποτελεί ριβοσωμικό DNA.



Εικόνα 14. (A) Υβριδοποίηση κατά Southern προϊόντων της PCR με εκκινητές τους 18S/28S. 1: *D. melanogaster*, 2: *B. oleae* 1, 3: *C. capitata*, 4: *B. oleae* 2, 5: *B. oleae* 3, 6: Μάρτυρας, 7: *B. oleae* 4, 8: *B. oleae* Solano, 9: *B. oleae* Yolo, 10: *B. oleae* Πηλίου, 11: *B. oleae* Δρέπανου, 12: *B. oleae* Καβάλας. (B) Φωτογραφία του πηκτώματος στο οποίο ηλεκτροφορήθηκαν τα προηγούμενα δείγματα μετά την αντίδραση PCR. Η σειρά των δειγμάτων είναι η ίδια με αυτήν της Εικόνας 14.A.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 14 δεν υπάρχει σήμα υβριδοποίησης στα δείγματα Yolo και Solano, επομένως οι μικρότερου μεγέθους ζώνες δεν είναι ριβοσωμικό DNA. Προφανώς, αυτή η αλληλουχία οφείλεται σε κάποια επιμόλυνση των συγκεκριμένων ατόμων δάκου με κάποιο βακτήριο.

### 3.3 Σύγκριση των αλληλουχιών

Οι επιτυχώς κλωνοποιημένες σε φορέα pGem αλληλουχίες εστάλησαν για να καθοριστεί η πρωτοδιάταξή τους. Οι αλληλουχίες των τμημάτων DNA που εστάλησαν από την εταιρεία, επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Omega και έγινε σύγκριση των αλληλουχιών με γνωστές αλληλουχίες σε βάσεις δεδομένων με τη χρησιμοποίηση του προγράμματος Blast. Η σύγκριση αυτή έδειξε ότι οι αλληλουχία mtDNA (~1.6 kb) που απομονώθηκε από δάκο της περιοχής Solano της Καλιφόρνιας καθώς και οι αλληλουχίες του rDNA δάκου των περιοχών της Ελλάδας Πήλιο (~1.4 kb) και Μυτιλήνης (~0.8 kb) παρουσίαζαν σημαντική ομοιότητα με παρεμφερείς αναμενόμενες αλληλουχίες της βάσης δεδομένων. Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι αλληλουχίες rDNA δάκου της Καλιφόρνιας των περιοχών Yolo και Solano παρουσίασαν ομοιότητα με βακτηριακές ριβοσωμικές αλληλουχίες. Οι υπόλοιπες αλληλουχίες (rDNA από δάκο των περιοχών Κύπρου, Πορτογαλίας, Yolo και Solano Καλιφόρνιας και Murcia Ισπανίας, με εκκινητές τους 5.8S-5'/28S-5', ~0.8 kb) παρουσίασαν μικρή ομοιότητα με αλληλουχίες μη αναμενόμενες.

Από τα υπάρχοντα αποτελέσματα μπορεί να προκύψει σύγκριση των αλληλουχιών του ριβοσωμικού DNA δάκου από Πήλιο και Μυτιλήνη με τη βοήθεια του προγράμματος Mega. Τα αποτελέσματα της σύγκρισης φαίνονται στην Εικόνα 15.

```

#Myticl TCGATTAAGA ACGCAGCAAA CTGTGCGTCA TCGTGTGAAC TGCAGGACAC ATGAACATCG ACATTTTGAA CGCATATTGC
#Pelio .....

#Myticl GGTCATGCT GTTAGTACT TTAATTAATT TTAAAGTGCT GCTTGGACTA CATATGGTTG AGGGTTGTAA GACTATGCTA
#Pelio .....

#Myticl AATTAGTTGC TTATTCTTTT AGTCAATTAA TAGAATTTAA GCATATGGCA TATTATTGGA TTGTATTTT CAATCCATAA
#Pelio .....

#Myticl TATTAATAGC ATAAAAGAA ATATAGAAA TATATTCTTG AATACCTCAT ATTTGAACGA AAATTTATGA TAAATGAGAA
#Pelio .....

#Myticl TCTTAGTATT CCCATAAAG AAAAATTTT CAACATTATT TAAATTAAT TAAATAATAC ATAAAGAGAA TGTCTAGCAT
#Pelio .....

#Myticl AAAATAAAAT TTTATTCTAG AATTAATTCA CTCTATTGTA TTGAGAAAAA TTTATAATAA AAAAAAATAT ATGATATGTG
#Pelio .....

#Myticl GAGGAATAAT GTTGTAAAT TTATTAATTA TTATATTATG AATTTTAAAA AGGGATGAAA AGATTGAATA ATATTGAGTA
#Pelio .....

#Myticl ATCAAGATAT AAAAATATAT TTCTTTAAAA TAGCAAAATAG CAAAAAAT TAGATAAAAA AAACAATAATCA ATCTAAAAATA
#Pelio .....

#Myticl TATTTTATAC AACCTCAACT CATATGGGAC TACCCCTTGA ATTTAAGCAT ATCA T AATC ACTAGTGAAT
#Pelio ..KY.....

#Myticl TCGGGCCGC CTGCAGGTCG ACCATATGGG AGAGCTCCCA AC
#Pelio .....

```

Εικόνα 15. Σύγκριση τμήματος των αλληλουχιών rDNA δάκου από Πηλίο και Μοτιλήνη. Οι βάσεις που διαφέρουν στις 2 αλληλουχίες είναι σκιασμένες με γαλάζιο χρώμα.

Στην Εικόνα 15 παρατηρείται από την παρουσία των χαρακτήρων R, Y, M, K, S, B ότι ο προσδιορισμός της αλληλουχίας του δείγματος από το Πήλιο δεν είναι ιδιαίτερα σαφής σε αυτά τα σημεία με αποτέλεσμα η σύγκρισή τους να μην πραγματοποιείται με ακρίβεια. Επίσης, παρατηρείται μια ένθεση 12 νουκλεοτιδίων στην αλληλουχία δάκου του Πηλίου σε σχέση με αυτήν της Μυτιλήνης στο νουκλεοτίδιο 94.

Η αλληλουχία του mtDNA δάκου του Solano της Καλιφόρνιας είναι δυνατό να συγκριθούν με άλλες υπάρχουσες αλληλουχίες mtDNA δάκου στη βάση δεδομένων. Έχουν αλληλουχηθεί πλήρως δύο απλότυποι του mtDNA του δάκου που προέρχονται από Ιταλία και Πορτογαλία από τις περιοχές Montecucco και Paradela, αντίστοιχα. Το mtDNA έχει μέγεθος 15815 pb, και εμφανίζει γονίδια και οργάνωση τυπικά των εντόμων, 13 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες που συμμετέχουν στην οξειδωτική φωσφορυλίωση, 2 μόρια rRNA, 22 μόρια tRNA και μια μεγάλη (949 pb) μη κωδικοποιούσα περιοχή. Τα δύο γονιδιώματα έχουν ίδια οργάνωση και διαφέρουν μόνο σε 31 σημειακές μεταλλάξεις [13].

Οι 3 αυτές αλληλουχίες συγκρίνονται με μία τέταρτη από τη βάση δεδομένων. Πρόκειται για αλληλουχία τμήματος του γονιδίου κυτοχρωμική οξειδάση I του mtDNA από δάκο Ελλάδας. Η σύγκριση των 4 αυτών αλληλουχιών με τη βοήθεια του προγράμματος Mega, φαίνεται στην Εικόνα 16.



```

#Solano      ATT TAA TCG CGA CAA TGG CTA TTT TCA ACA AAT CAC AAA GAT ATT GGA ACT TTA TAC TTC ATT TTC GGA GCC TGA GCA
#Montecuccio
#Paradela    ... ..T
#Greece      ... ..T

#Solano      GGA ATA GTT GGC ACA TCT CTT AGA ATT TTA GTT CGA GCA GAA CTA GGT CAT CCT GGA GCA TTA ATT GGA GAT GAT CAA
#Montecuccio
#Paradela    ... ..A
#Greece      ... ..T

#Solano      ATT TAT AAT GTA ATT GTA ACT GCT CAC GCT TTC GTA ATA ATT TTT TTC ATA GTT ATA CCT ATT ATA ACC GGG GGG TTT
#Montecuccio
#Paradela    ... ..T
#Greece      ... ..T

#Solano      GGA AAT TGA TTA GTC CCT TTA ATA TTA GGA GCA CCA GAT ATG GCA TTC CCC CGA ATA AAT AAT ATA AGA TTC TGG TTA
#Montecuccio
#Paradela    ... ..C
#Greece      ... ..C

#Solano      TTA CCC CCC TCT CTC ACT CTA TTG TTA GTC AGC AGC ATA GTG GAA AAC GGA GCC GGT ACA GGT TGA ACT GTA TAC CCA
#Montecuccio
#Paradela    ... ..T
#Greece      ... ..T

#Solano      CCA TTA TCA TCT ATT ATT GCA CAT GGA GGA GCA TCT GTC GAT TTA GCC ATC TTT TCA CTC CAC TTA GCA GGT ATC TCC
#Montecuccio
#Paradela    ... ..T
#Greece      ..T C.T ..T

#Solano      TCA ATC TTA GGA GCT GTA AAT TTT ATT ACA ACA GTA ATT AAT ATG CGA TCA ACA GGA ATT ACA TTC GAT CGA ATA CCT
#Montecuccio
#Paradela    ... ..T
#Greece      ... ..T

```

```

#Solano      TTA TTT GTT TGA GCA GTA GTA CTA ACA GCC CTA CTA CTT TTA CTA TCT CTA CCT GTA TTA GCC GGT GCT ATC ACA ATA
#Montecuccio
#Paradela    ... ..
#Greece      ... ..
#Solano      CTT TTA ACA GAT CGA AAT CTG AAT ACT TCC TTT TTC GAC CCA GCA GGT GGA GGA GAC CCA ATC CTT TAC CAA CAT TTA
#Montecuccio
#Paradela    ... ..
#Greece      ... ..
#Solano      TTT TGA TTT TTC GGA CAC CCA GAA GTA TA ATT CTA ATT CTC CCT GGA TTT GGT ATA ATC TCT CAC ATT ATT AGT CAA
#Montecuccio
#Paradela    ... ..
#Greece      ... ..
#Solano      GAA TCA GGT AAA AAG GAA ACC TTT GGG TCT CTA GGR ATA ATC TAC GCT ATA ATA GCA ATT GGA CTT CTA GGT TTT ATT
#Montecuccio
#Paradela    ... ..
#Greece      ... ..
#Solano      GTA TGA GCT CAC CAT ATA TTT ACA GTA GGR ATA GAT GTA GAC ACT CGA GCC TAC TTT ACT TCA GCT ACA ATA ATC ATT
#Montecuccio
#Paradela    ... ..
#Greece      ... ..
#Solano      GCA GTA CCT ACA GGC ATT AAA ATT TTC AGT TGA TTA GCT ACT CTT CAC GGC ACA CAG TTA AAT TAT TCC CCA GCA ATA
#Montecuccio
#Paradela    ... ..
#Greece      ... ..
#Solano      TTA TGA GCC CTA GGA TTT GTA TTC TTA TTT ACA GTA GGA GGA TTA ACG GGA GGT GTA CTT GCT AAT TCT TCT GTA GAC
#Montecuccio
#Paradela    ... ..
#Greece      ... ..

```



Στον Πίνακα 2 φαίνονται οι γενετικές αποστάσεις των τεσσάρων αλληλουχιών mtDNA. Οι φυλογενετικές σχέσεις των τεσσάρων αυτών αλληλουχιών φαίνονται σε ένα Neighbor-Joining δενδρόγραμμα στην Εικόνα 17.



Εικόνα 17. Φυλογενετικό δέντρο των τεσσάρων αλληλουχιών mtDNA δάκου.

	Solano	Montecucco	Paradela	Greece
Solano				
Montecucco	0.007			
Paradela	0.008	0.001		
Greece	0.062	0.057	0.058	

Πίνακας 2. Γενετικές αποστάσεις μεταξύ των τεσσάρων αλληλουχιών mtDNA δάκου.

## 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο στόχος της εργασίας ήταν να βρεθεί η πιο συγγενική γενετικά ευρωπαϊκή αλληλουχία του γονιδιώματος του δάκου με την αντίστοιχη του δάκου της Καλιφόρνιας. Για το λόγο αυτό ενισχύθηκαν με τη μέθοδο της PCR τμήματα του μιτοχονδριακού DNA και του πυρηνικού ριβοσωμικού DNA από διάφορα άτομα της Μεσογείου και της Καλιφόρνιας, καθορίστηκε η αλληλουχία των τμημάτων αυτών και τέλος έγινε σύγκριση των αλληλουχιών.

Από τα αποτελέσματα που έχουμε μπορούμε να βγάλουμε συμπεράσματα μόνο από τη μελέτη του ενός γενετικού τόπου, δηλαδή του mtDNA. Η σύγκριση των αλληλουχιών του mtDNA δάκου από 4 περιοχές (Solano, Montecuccio, Paradela, Ελλάδα) αποτελεί μόνο μια ένδειξη ότι ο δάκος της Καλιφόρνιας μπορεί να προέρχεται από την Ιταλία. Αυτό προκύπτει επειδή η αλληλουχία του δάκου του Solano έχει τις λιγότερες διαφορές όταν συγκρίνεται με τον ιταλικό απλότυπο σε σχέση με τους υπόλοιπους. Επίσης, από αυτή τη σύγκριση προκύπτει ότι ο πορτογαλικός και ο ιταλικός απλότυπος παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα κάτι το οποίο φαίνεται από τη μικρή γενετική τους απόσταση (0.001). Επιπλέον, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η αλληλουχία του δάκου της Ελλάδας διαφέρει περισσότερο από τις υπόλοιπες όταν συγκρίνονται όλες μαζί.

Η ένδειξη όμως που προκύπτει από τη σύγκριση αλληλουχιών mtDNA ότι ο πορτογαλικός και ο ιταλικός απλότυπος είναι συγγενικοί, έρχεται σε αντίθεση με μια άλλη μελέτη που βασίστηκε σε ανάλυση με μικροδορυφόρους σε πληθυσμούς δάκου της Μεσογείου. Τα συμπεράσματα αυτής της ανάλυσης υποδεικνύουν μια διαφοροποίηση των πληθυσμών της Μεσογείου σε τρεις υποπληθυσμούς: ένας της Ιβηρικής χερσονήσου, ένας της Ελλάδας και της Ιταλίας και ένας της Κύπρου [17]. Αυτό το συμπέρασμα έρχεται επίσης σε αντίθεση με το αποτέλεσμα της σύγκρισης αλληλουχιών mtDNA που δείχνει ότι η ελληνική αλληλουχία διαφέρει σε αρκετά σημεία από την ιταλική. Όμως, τα αποτελέσματα που βασίζονται στο mtDNA είναι ανεπαρκή για να για να υφίσταται ουσιαστική σύγκριση.

Τα αποτελέσματα είναι ανεπαρκή όσον αφορά τις αλληλουχίες του ριβοσωμικού DNA και δε δύναται να γίνει κάποια ουσιαστική σύγκριση. Τα

ανεπαρκή αποτελέσματα οφείλονται κυρίως στο γεγονός ότι ο προσδιορισμός της αλληλουχίας των τμημάτων του rDNA δάκου από Ισπανία (Murcia), Πορτογαλία, Κύπρο και Καλιφόρνια (Yolo και Solano) που στάλθηκε από την εταιρεία δεν ήταν ο αναμενόμενος. Όταν οι αλληλουχίες αυτές συγκρίθηκαν με ήδη υπάρχουσες αλληλουχίες στη βάση δεδομένων με τη βοήθεια του προγράμματος Blast, διαπιστώθηκε μικρή ομολογία με μη αναμενόμενες αλληλουχίες. Αυτό είναι πιθανό να οφείλεται σε δύο λόγους. Ένα πιθανό αίτιο είναι πρακτικό, στη μέθοδο της PCR, στο στάδιο υβριδισμού των εκκινητών η θερμοκρασία που χρησιμοποιήθηκε ήταν σχετικά χαμηλή (50°C). Η χαμηλή θερμοκρασία υβριδισμού επιτρέπει στους εκκινητές να υβριδιστούν σε αλληλουχίες μη ομόλογες με αποτέλεσμα να ενισχύονται λανθασμένα τμήματα, αν αυτά τα τμήματα έχουν παρόμοιο μήκος με τα αναμενόμενα δε γίνονται αντιληπτά κατά τις διαδικασίες πριν τον καθορισμό της αλληλουχίας. Μία άλλη αιτία μπορεί να είναι η πιθανότητα να έγινε κάποιο λάθος από την εταιρία με αποτέλεσμα να μας εστάλησαν άλλες αλληλουχίες μετά τον προσδιορισμό τους, λαμβάνοντας υπ' όψη ότι οι πέντε αλληλουχίες rDNA στάλθηκαν στην εταιρία την ίδια ημερομηνία, διαφορετική από τις υπόλοιπες.

Για τη γενετική ανάλυση των πληθυσμών δάκου της Μεσογείου και της Καλιφόρνιας επιλέξαμε να εργαστούμε με αλληλουχίες από mtDNA και rDNA. Η επιλογή αυτή στηρίχθηκε στο γεγονός ότι το mtDNA όπως και το rDNA χρησιμοποιούνται ευρέως ως γενετικοί δείκτες και είναι καλά μελετημένοι. Περιέχουν καλά συντηρημένες περιοχές, αυτό βοηθά στο σχεδιασμό εκκινητών για τη μέθοδο της PCR, αλλά και περιοχές που συσσωρεύουν εύκολα μεταλλάξεις, σε αυτές τις περιοχές διακρίνονται περισσότερες διαφορές ανάμεσα στις αλληλουχίες. Ωστόσο, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν και άλλοι γενετικοί δείκτες, όπως οι μικροδορυφόροι ή VNTRs. Ο συνδυασμός των μικροδορυφόρων και του mtDNA έχει χρησιμοποιηθεί για τη διαλεύκανση παρόμοιων περιπτώσεων [28, 31].

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Timothy R. Collier and Robert A. Van Steenwyk. Prospects for integrated control of olive fruit fly are promising in California. *California agriculture, vol 57, No 1*, 28-31 (2003).
2. Basilios E. Mazomenos, Anastasia Pantazi-Mazomenou, Dimitra Stefanou. Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system. *IOBC wprs Bulletin Vol. 25*, 1-11 (2002).
3. The Olive Fly - *Bactrocera (Dacus) Oleae*. The olive oil source (2005).
4. Richard E. Rice. Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) Oleae*. *KAC Plant Protection Quarterly Vol 10, No 3*, 1-11 (2000).
5. Richard E. Rice Phil A. Phillips Judy Stewart-Leslie G. Steven Sibbett. Olive fruit fly populations measured in Central and Southern California. *California agriculture Vol 57, No 4*, 122-127 (2003).
6. Paul Sunnucks. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution Vol 15, No 5* 199-203 (2000).
7. De-Xing Zhang and Godfrey M. Hewitt. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology Vol 12*, 563-584 (2003).
8. Paul Vossen, Lucia G. Varela, and Alexandra Devarenne. Olive Fruit Fly. April 2004.
9. Family tree DNA. Haplogroup H sub-clades. History unearthed daily.
10. News about the Olive Fly in California. The olive oil source (2005).
11. Ashburner, M., *Drosophila: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York (1989).
12. University of California. Cooperative Extension Olive Fruit Fly Project (2003).
13. F. Nardi, A. Carapelli, R. Dallai and F. Frati. The mitochondrial genome of the olive fly *Bactrocera oleae*: two haplotypes from distant geographical locations. *Insect Molecular Biology Vol 12*, 1-7 (2003).
14. Paul T. Smith, Srimi Kambhampati ad Karen A. Armstrong. Phylogenetic relationships among *Bactrocera* species (Diptera:

- Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26, 8-17 (2003).
15. James J. Smith and Guy L. Bush. Phylogeny of the Genus *Rhagoletis* (Diptera: Tephritidae) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome oxidase II. *Molecular Phylogenetics and Evolution Vol 7, No 1*, 33-43 (1997).
  16. Diethard Tautz, John M. Hancock, David A. Webb, Christiane Tautz and Gabriel A. Dover. Complete sequences of the rRNA genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 5 (4), 366-376 (1988).
  17. Augustinos AA, Z. Mamuris, Stratikopoulos EE, D'amelio S, Zacharopoulou A and Mathiopoulos KD. Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*, 125 (in press).
  18. Thomas D. Gelehrter, Francis S. Collins, David Ginsburg. Αρχές ιατρικής γενετικής. *Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδη*, 2η Έκδοση (1997).
  19. Benjamin Lewin. Genes VIII, Πρώτος τόμος. *Ακαδημαϊκές εκδόσεις Ι. Μπάσδρα και ΣΙΑ* (2004).
  20. B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. Βασικές αρχές Κυτταρικής Βιολογίας. Εισαγωγή στη Μοριακή Βιολογία του κυττάρου. *Ιατρικές εκδόσεις Π. Χ. Πασχαλίδη* (1998).
  21. Τριανταφυλλίδης Κωνσταντίνος. Κλασική και Μοριακή Γενετική. *Εκδοτικός οίκος αδερφών Κυριακίδη* (1992, 2001).
  22. Bob Wharton and Krishna Dole. Parasitoids of Fruit - Infesting Tephritidae (2005).
  23. A. M. Aransay, E. Scoulica, Y. Tselentis and P. D. Ready. Phylogenic relationships of phlebotomine sandflies inferred from small subunit nuclear ribosomal DNA. *Insect Molecular Biology Vol 9 (2)*, 157-168 (2000).
  24. A. M. Aransay, E. Scoulica, B. Chaniotis and Y. Tselentis. Typing of sandflies from Greece and Cyprus by DNA polymorphism of 18S rRNA gene. *Insect Molecular Biology Vol 8 (2)*, 179-184 (1999).
  25. J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. Molecular cloning, a laboratory manual. Second edition. *Cold Spring Harbor laboratory press* (1989).



26. Casey D. "Primer on Molecular Genetics" *DOE Human Genome 1991-92 Program Report* (1992).
27. Sharp, P.A., B. Sugden and J. Sambrook. Detection of two restriction endonuclease activities in *Haemophilus parainfluenzae* using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. *Biochemistry* 12: 3055 (1973).
28. M.D. Meixner, B.A. McPheron, J.G. Silva, G.E. Gasparich και W.S. Sheppard. The Mediterranean fruit fly in California: evidence for multiple introductions and persistent populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. *Molecular Ecology* Vol 15, 891-899 (2002).
29. Guo-qin Yu, Ying Bao, Chun-hai Shi, Chang-qin Dong και Song Ge. Genetic diversity and population differentiation of Liaoning Weedy Rice detected by RAPD and SSR markers. *Biochemical genetics* Vol 43, 261-270 (2005).
30. Tamra C. Mendelson και Kerry L. Shaw. Use of AFLP markers in surreys of arthropod diversity. *Methods in Enzymology* Vol 395, 161-177 (2005).
31. Silva JG, Meixner MD, McPheron BA, Steck GJ, Sheppard WS. Recent Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) infestations in Florida – a genetic perspective. *Journal of Economic Entomology* Vol 96, 1711-1718 (2003).
32. Bonizzoni M, Zheng L, Guglielmino CR, Haymer DS, Gasperi G, Gomulski LM, Malacrida AR. Microsatellite analysis of medfly bioinfestations in California. *Molecular Ecology* Vol 10, 2515-2524 (2001).
33. Bonizzoni M, Guglielmino CR, Smallridge CJ, Gomulski M, Malacrida AR και Gasperi G. On the origins of medfly invasion and expansion in Australia. *Molecular Ecology* Vol 13, 3845-3855 (2004).
34. Villablanca FX, Roderick GK, Palumbi SR. Invasion genetics of the Mediterranean fruit fly: variation in multiple nuclear introns. *Molecular Ecology* Vol 7, 547-560 (1998).
35. Gomulski LM, Bourtzis K, Brogna S *et al.* Intron size polymorphism of the *Adhl* gene parallels the worldwide colonisation history of the

- Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Molecular Ecology* Vol 7, 1729-1742 (1998).
36. Mun J, Bohonak AJ, Roderick GK. Population structure of the pumpkin fruit fly *Bactrocera depressa* (Tephritidae) in Korea and Japan: Pliocene allopatry or recent invasion? *Molecular Ecology* Vol 12, 2941-2951 (2003).
  37. S. Kumar, K. Tamura, and M. Nei (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:2 (In press).