



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

ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ ΤΣΟΥΜΑΝΗ

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

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2012

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

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

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

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

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

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

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

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