

Μελέτη της
διαρροής
πατρικού
μιτοχονδριακού
DNA σε
διασταυρώσεις
ειδών του
γένους
Drosophila

Δοκιανάκης
Εμμανουήλ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ
ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ
ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ
Π.Μ.Σ. ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΒΙΟΛΟΓΙΑ

Επιβλέπων
Λαδουκάκης
Εμμανουήλ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2011

UNIVERSITY OF CRETE

SCHOOL OF SCIENCES AND ENGINEERING

DEPARTMENT OF BIOLOGY

G.S.P ENVIRONMENTAL BIOLOGY

A STUDY OF THE LEAKAGE OF PATERNAL MITOCHONDRIAL DNA
IN *DROSOPHILA* CROSSES

DOKIANAKIS EMMANOUIL

M.SC. THESIS

SUPERVISED BY LADOUKAKIS EMMANOUIL

IRAKLEIO 2011

Η παρούσα διατριβή εκτυπώθηκε σε ανακυκλωμένο χαρτί

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Ε. Λαδουκάκης

Ι. Βόντας

Ν. Πουλακάκης

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	5
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
Α. ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ	6
Β. ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΗ mtDNA	7
Γ. MULLER’S RATCHET	11
Δ. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΟΥ mtDNA	12
Ε. ΔΙΑΡΡΟΗ ΠΑΤΡΙΚΟΥ mtDNA	13
ΣΤ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	16
ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
Α. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ	18
Β. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	18
Γ. ΕΞΑΓΩΓΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA (gDNA)	23
Δ. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)	24
Ε. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	26
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
Α. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ	28
Β. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	29
Γ. ΟΡΙΟ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	31
Δ. ΔΙΑΡΡΟΗ ΠΑΤΡΙΚΟΥ mtDNA	33
Ε. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΔΙΑΡΡΟΗΣ	36
ΣΤ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	37
Ζ. ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ	38
ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	
Α. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ	41
Β. ΟΡΙΟ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ	43
Γ. ΔΙΑΡΡΟΗ ΠΑΤΡΙΚΟΥ mtDNA	44
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	49

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το καλοκαίρι του 2009 επέστρεψα στη Κρήτη μετά από πέντε χρόνια. Τελειώνοντας το μεταπτυχιακό μου και αποτιμώντας αυτή την εμπειρία θεωρώ ότι ήταν εξαιρετική και διδακτική ταυτόχρονα. Οι άνθρωποι που σημάδεψαν αυτή τη δίχρονη πορεία μου, αξίζουν μερικές γραμμές.

Έμαθα πολλά στο Τμήμα Βιολογίας. Διδάχθηκα να κρατάω χαμηλά τους τόνους μου και να δουλεύω σκληρά. Διδάχθηκα να μην διατυπώνω συμπεράσματα που μπορεί να αμφισβητηθούν επιστημονικά. Είναι, βλέπετε, η μοίρα της βασικής έρευνας. Με λίγα λόγια διδάχθηκα επιστήμη. Ευχαριστώ το Μανώλη Λαδουκάκη που με έβαλε σε αυτό το μονοπάτι αλλά κυρίως γιατί με άφησε να το περπατήσω μόνος μου.

Ευχαριστώ τη Μαρία Δραμουντάνη. Πολύ απλά γιατί μας βοηθάει στα καθημερινά του πάγκου. Πολύ απλά γιατί μας καθοδηγεί στα πρακτικά της επιστήμης. Πολύ απλά γιατί ξέρει πώς να προσεγγίσει το καθένα μας με έναν πολύ ιδιαίτερο τρόπο. Πολύ απλά γιατί ξέρει τι λέει, πότε το λέει και γιατί το λέει. Τώρα που το ξανασκέφτομαι δεν είναι απλά όλα αυτά. Είναι το Α και το Ω της ζωής σε ένα εργαστήριο. Είναι ένας αναντικατάστατος άνθρωπος που είχα την τύχη και την τιμή να γνωρίσω.

Ευχαριστώ όλα τα παιδιά στο εργαστήριο που μοιραστήκαμε την καθημερινότητα μας. Οι συζητήσεις μας τριγυρνάνε στο μυαλό μου συνέχεια και με μαθαίνουν να βελτιώνομαι. Ευχαριστώ τους φίλους που έκανα αυτά τα δύο χρόνια. Τους εύχομαι να μη σταματήσουν να κυνηγούν τα όνειρα τους.

Ευχαριστώ τη Μαρία για όσα περάσαμε, δύσκολα ή εύκολα, ευχάριστα ή δυσάρεστα. Ήταν εκεί όταν οι άλλοι έλειπαν.

Ευχαριστώ την οικογένεια μου. Νομίζω πως στιδήποτε έχουν επενδύσει πάνω μου, οικονομικά και ηθικά, αποδίδουν καρπούς τώρα. Τους ευχαριστώ γιατί αυτοί έβαλαν τα θεμέλια της προσωπικότητας μου, αφήνοντας να χτίσω τους ορόφους εγώ.

Φεύγω για άλλη μια φορά από τη Κρήτη γιατί θέλω να πραγματοποιήσω τα νέα μου όνειρα. Και, μεταξύ μας, χαίρομαι που τα όνειρά μου δε χωράνε πια στην ελληνική πραγματικότητα.

Μάνος, Ιούλης 2011

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η κληρονόμηση του γενετικού υλικού των μιτοχονδρίων (mtDNA) γίνεται μονογονεϊκά. Η μονογονεϊκή κληρονόμηση του mtDNA περιορίζει την εξάπλωση «εγωιστικών» μεταλλάξεων στον πληθυσμό. Θα έπρεπε όμως να το παγιδεύει σε διακριτές θηλυκές εξελικτικές γραμμές και να το απομονώνει από το φαινόμενο του ανασυνδυασμού με αποτέλεσμα να γίνεται ευάλωτο στη συσσώρευση επιβλαβών μεταλλάξεων όπως συμβαίνει σε όλα τα μη ανασυνδυαζόμενα γονιδιώματα. Κάτι τέτοιο θα το οδηγούσε στον εκφυλισμό. Όμως το mtDNA παραμένει λειτουργικό σε όλους τους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Πώς καταφέρνει το mtDNA να παραμένει λειτουργικό και ταυτόχρονα να μεταβιβάζεται αφυλετικά;

Στην παρούσα εργασία προσπαθούμε να προσεγγίσουμε αυτό το ερώτημα με μια σειρά διαειδικών και ενδοειδικών διασταυρώσεων στο γένος *Drosophila*. Γνωρίζουμε πως τα μιτοχόνδρια του σπέρματος τουλάχιστον στα θηλαστικά καταστρέφονται αμέσως μετά τη γονιμοποίηση και πως ο μηχανισμός καταστροφής τους είναι ειδο-ειδικός και αρκετά ακριβής.

Τα αποτελέσματά μας, υποστηρίζουν ότι η διαρροή του πατρικού mtDNA που έχει παρατηρηθεί σε αρκετούς οργανισμούς πιθανόν να μην αποτελεί ένα τυχαίο γεγονός ενός μη τέλειου μηχανισμού αλλά να καθορίζεται από εξειδικευμένους (άγνωστους ακόμα) μηχανισμούς.

Μια υπόθεση που υποστηρίζουμε είναι πως το να επιτρέπεται η διαρροή μικρού ποσοστού πατρικού mtDNA να εισέρχεται στη μητρική γραμμή κληρονομησης βοηθάει τη φυσική επιλογή να απομακρύνει επιβλαβείς μεταλλάξεις μέσω του ανασυνδυασμού χωρίς να παραβιάζει τη μονογονεϊκή κληρονόμηση του mtDNA.

Λέξεις κλειδιά

Κληρονόμηση mtDNA, Διαρροή πατρικού mtDNA, *Drosophila*

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

A. ΤΑ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑ

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια και έχουν γίνει γνωστά ως η μηχανή παραγωγής ενέργειας του κυττάρου. Αυτό το επιτυγχάνουν με την παραγωγή του ATP μέσω της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης. Πέρα από αυτόν το ρόλο έχει παρατηρηθεί ότι έχουν ανάμιξη σε αρκετές βιολογικές διαδικασίες στα ευκαρυωτικά κύτταρα (για ένα review Passamonti and Ghiselli 2009). Τα μιτοχόνδρια λαμβάνουν μέρος στον έλεγχο του κυτταρικού κύκλου (ειδικά στην αύξηση και στο θάνατο) και είναι υπεύθυνα για πολλές παραμέτρους της αναπαραγωγής, διαφοροποίησης, γήρανσης κ.α. Επίσης τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε ασθένειες του ανθρώπου όπως μυοπάθειες, ασθένεια του Πάρκινσον και άλλες νευροεκφυλιστικές ασθένειες (McBride *et al.* 2006).

Τα μιτοχόνδρια προήλθαν από μια ομάδα ελεύθερων στη φύση, αερόβιων και κινητικών α-πρωτεοβακτηρίων τα οποία περιείχαν 3000 – 5000 γονίδια (Boussau *et al.* 2004). Η θεωρία της ενδοσυμβίωσης υποστηρίζει ότι το μιτοχόνδριο προέκυψε με ενδοκυττάρωση των παραπάνω βακτηρίων από ένα αρχέγονο κύτταρο χωρίς κυτταρική μεμβράνη πριν από (τουλάχιστον) ένα δισεκατομμύριο χρόνια (Sagan 1967). Τα βακτήρια που ενσωματώθηκαν στα αρχέγονα κύτταρα πρόσφεραν στους ξενιστές νέες λειτουργικές δυνατότητες και αυτά με τη σειρά τους εκμεταλλεύτηκαν τα οφέλη που προέκυψαν από τις λειτουργίες του ξενιστή. Η συμβίωση αυτή οδήγησε στα σημερινά ευκαρυωτικά κύτταρα.

Τα μιτοχόνδρια περιέχουν δικό τους γενετικό υλικό, το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA), το οποίο περιλαμβάνει γονίδια για ένα μικρό αριθμό πρωτεϊνών, για tRNAs και για rRNAs. Ο αριθμός αυτός διαφέρει μεταξύ των ευκαρυωτικών οργανισμών αλλά είναι περίπου σταθερός στο mtDNA των μεταζώων (13 γονίδια για πρωτεΐνες, 2 για rRNA και 22 για tRNA). Συνεπώς το μιτοχόνδριο έχει μια σχετική αυτονομία από τον πυρήνα. Όμως για να ολοκληρωθεί οποιαδήποτε βιοχημική διεργασία στο μιτοχόνδριο (συμπεριλαμβανομένης της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης) θα πρέπει να υπάρχει συνεργασία με το πυρηνικό DNA. Μερικές από τις διαφορές μεταξύ του γονιδιώματος του mtDNA και του γονιδιώματος του πυρηνικού DNA είναι (Gillham 1994, Birky 1995, Xu 2005):

- Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης των ευκαρυωτικών κυττάρων, υπήρξε μια μεταφορά γενετικών πληροφοριών από τα οργανιδιακά στα πυρηνικά γονιδιώματα. Αυτό

είχε σαν αποτέλεσμα την ύπαρξη πολλών περισσότερων γενετικών πληροφοριών στον πυρήνα σε σχέση με τα οργανίδια

- Κατά τη διάρκεια της ενδοσυμβιωτικής εξελικτικής διαδικασίας, τα οργανιδιακά γονιδιώματα έχασαν την ικανότητα τους να αντιγράφονται, να μεταγράφονται και να μεταφράζονται ανεξάρτητα χωρίς τη βοήθεια πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων που κωδικοποιούνται από το γονιδίωμα του πυρήνα
- Τα πυρηνικά γονιδιώματα αντιγράφονται με πολύ συγκεκριμένο τρόπο ενώ τα αντίστοιχα οργανιδιακά με πιο χαλαρό τρόπο. Συγκεκριμένα, σε κάθε μιτωτικό κύκλο, το πυρηνικό γονιδίωμα αντιγράφεται μια φορά και κάθε θυγατρικό κύτταρο παίρνει ένα σετ γονιδίων. Αντίθετα, τα οργανιδιακά γονιδιώματα μέσα σε κάθε κύτταρο αντιγράφονται τυχαία και διαχωρίζονται σε θυγατρικά κύτταρα επίσης τυχαία κατά τη κυτταρική διαίρεση.
- Κάθε ευκαρυωτικό κύτταρο έχει πολλά οργανίδια και κάθε οργανίδιο πολλαπλά γονιδιώματα. Έτσι, ενδέχεται να υπάρχει εκτενής ενδοκυτταρική και διακυτταρική επιλογή μεταξύ των οργανιδιακών γονιδιωμάτων μέσα στα κύτταρα.

Τέλος, στα ζώα, τα μιτοχόνδρια ελέγχονται από ένα διπλό γονιδιακό σύστημα. Στο σύστημα αυτό συνεργάζονται γονίδια που κωδικοποιούνται από το ίδιο το μιτοχόνδριο και γονίδια που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα του κυττάρου. Τα τελευταία έχουν δύο προελεύσεις. Η πρώτη είναι από τα μιτοχόνδρια, δηλαδή γονίδια που έχουν μεταφερθεί από τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα στα πυρηνικά ενώ η δεύτερη πυρηνικά γονίδια που δεν ανήκαν ποτέ στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και εκφράζονται σε μιτοχονδριακούς στόχους (Ballard & Rand 2005).

B. ΜΟΝΟΓΟΝΕΪΚΗ ΚΛΗΡΟΝΟΜΗΣΗ mtDNA

Η κληρονομία του γενετικού υλικού των μιτοχονδρίων δεν ακολουθεί τους κλασικούς κανόνες που περιέγραψε ο Mendel στα μέσα του 19ου αιώνα. Αυτό συμβαίνει κυρίως επειδή (Birky 2001):

- Κατά την αφυλετική αναπαραγωγή (όπου ανήκουν τα μιτοχόνδρια) λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του μη φυλετικού διαχωρισμού (vegetative segregation) Τα μιτοχόνδρια δεν υπόκεινται στις διαδικασίες μείωσης και μίτωσης. Αυτό

συμβαίνει γιατί υπάρχει έλλειψη εξειδικευμένων μηχανισμών στο μιτοχόνδριο για αυτόν τον σκοπό. Στο πυρηνικό γονιδίωμα, κατά τη μίτωση, το DNA διπλασιάζεται μια και μόνο φορά, και κάθε θυγατρικό κύτταρο παίρνει ένα αντίγραφο αυτού, και κατά τη μείωση τα δύο θυγατρικά (απλοειδή) κύτταρα λαμβάνουν τη μισή ποσότητα DNA σε σχέση με το μητρικό (Πρώτος νόμος του Mendel).

- Στο πυρηνικό DNA, τα αλληλόμορφα διαχωρίζονται ανεξάρτητα (Δεύτερος νόμος του Mendel) σαν αποτέλεσμα της μείωσης και του ανασυνδυασμού γονιδίων του ίδιου χρωμοσώματος. Στο οργανιδιακό DNA, τα γονίδια βρίσκονται σε ένα μόνο «χρωμόσωμα» και ο ανασυνδυασμός είναι πολύ περιορισμένος λόγω της μονογονεϊκής κληρονομιάς.
- Η κληρονομία των πυρηνικών γονιδίων γίνεται και από τους δύο γονείς. Τα οργανιδιακά γονίδια κληρονομούνται μονογονεϊκά.

Στα ζώα η κληρονομία του mtDNA γίνεται μέσω της μητέρας (Dawid & Blackler 1972). Οι κατηγορίες μηχανισμών με τους οποίους επιτυγχάνεται η μονογονεϊκή κληρονομία είναι τρεις και τους περιέγραψε αναλυτικά ο Birky (1995). Έτσι, ανάλογα με το είδος, η πρώτη κατηγορία δρά πριν τη γονιμοποίηση, η δεύτερη κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης και η τρίτη μετά από αυτή.

Οι μηχανισμοί πριν τη γονιμοποίηση είναι εκείνοι που επεμβαίνουν στην διαδικασία της δημιουργίας των γαμετών για να διασφαλιστεί η μονογονεϊκή κληρονομία. Ένας βασικός μηχανισμός σε αυτή τη κατηγορία είναι η παρουσία στο ζυγωτό πολλαπλάσιων μητρικών μιτοχονδρίων σε σχέση με τα πατρικά. Στα ποντίκια και στον άνθρωπο, συγκεκριμένα, ο αριθμός των μιτοχονδρίων στο σπέρμα εκτιμάται σε μερικές εκατοντάδες, ενώ στο αβγό (ωάριο) είναι περίπου 10^6 (Gillham 1994). Κατά συνέπεια, τα μιτοχόνδρια θηλυκής προέλευσης στο ζυγωτό είναι κατά πολύ περισσότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα αρσενικής προέλευσης. Ο Birky (1995) αναφέρει ότι τα τυχόν υπάρχοντα πατρικά αλληλόμορφα στο ζυγωτό θα είναι δύσκολο να εντοπιστούν επειδή θα έχουν εγκαθιδρυθεί, τυχαία, σε ένα μέρος μόνο των κυττάρων του ζυγωτού. Έτσι, αν p είναι ο αριθμός των πατρικών αλληλομόρφων στους γαμέτες και m ο αντίστοιχος των μητρικών, τότε ο Birky (1995) υπολογίζει ότι $p/(m+p)$ θα είναι ο αριθμός των κυττάρων στα οποία τα πατρικά αλληλόμορφα θα έχουν εγκαθιδρυθεί. Τα υπόλοιπα κύτταρα δεν θα έχουν καθόλου πατρικά αλληλόμορφα. Στο ποντίκι ο λόγος p/m είναι 1×10^{-5} έως 4×10^{-5} (Gyllensten *et al.* 1991).

Οι μηχανισμοί κατά τη διάρκεια της γονιμοποίησης δρουν όταν οι δύο γαμέτες ενώνονται και σχηματίζουν το ζυγωτό. Λίγα είναι γνωστά, όμως, για τον τρόπο δράσης των μηχανισμών αυτών. Για παράδειγμα, σε ένα είδος χορδοτού (*Ascidia*) έχει αποδειχθεί ότι τα μιτοχόνδρια χάνονται λίγο πριν την είσοδο του σπέρματος στο ωάριο (Ursprung and Schabtach 1965).

Οι μηχανισμοί που δρουν μετά την γονιμοποίηση και τον σχηματισμό του ζυγωτού είναι αρκετοί. Σε κάποια άλγη, νουκλεάσες δρουν και αποδομούν το οργανιδιακό DNA (Nishimura *et al.* 2002, Moriyama & Kawano 2003). Σε κάποια γυμνόσπερμα, κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των γονιμοποιημένων κυττάρων, το κυτταρόπλασμα του ζυγωτού διαμερισματοποιεί μια περιοχή που φιλοξενεί μόνο πατρικά οργανίδια τα οποία και απομακρύνονται από αυτή τη περιοχή σε επόμενες διαιρέσεις (Szmidt *et al.* 1987). Στα θηλαστικά οι Sutovsky *et al.* (1999, 2000) απέδειξαν ότι το μέσο τμήμα του σπέρματος που περιέχει τα μιτοχόνδρια εισέρχεται και εκφυλίζεται μέσα στο ζυγωτό. Παράλληλα, πρότειναν ότι η πρωτεΐνη ubiquitin σημαίνει τα μιτοχόνδρια και ακολουθεί η αποδόμηση των οργανιδίων από πρωτεοσώματα και λυσοσωμάτια.

Κατά την εξέλιξη της συμβίωσης μιτοχονδρίων – ευκαρυωτικών κυττάρων υπήρξε μια περίοδος όπου η κληρονομία των τότε ενδοσυμβιωτών (πρόγονων των σημερινών οργανιδίων) δεν ήταν αυστηρά μονογονεϊκή. Ο Birky (1995) αναφέρει ότι, μετά την εισαγωγή των α – πρωτεοβακτηρίων στα ευκαρυωτικά κύτταρα (θεωρία της ενδοσυμβίωσης – βλ. προηγούμενη ενότητα), η αναπαραγωγή των κυττάρων πιθανώς ξεκινούσε με το φαινόμενο της σύντηξης. Σύμφωνα με αυτό, τα μη – διαφοροποιημένα κύτταρα συντήκονταν σχηματίζοντας ένα μεγαλύτερου μεγέθους κύτταρο με σκοπό να ανταλλάξουν γενετικό υλικό και να προκύψουν ζυγωτά. Το φαινόμενο αυτό, πιθανώς, συνέβαινε προτού ακόμα υπάρξει η ωογαμία.

Τα ζυγωτά που προέκυπταν είναι λογικό να περιείχαν και όλους τους ενδοσυμβιώτες των πατρικών κυττάρων από τα οποία προέκυψαν. Άρα τα ζυγωτά θα κληρονομούσαν τα ενδοσυμβιωτικά βακτήρια και από τους δύο γονείς. Παρόλα αυτά, ανταλλαγή γενετικού υλικού μέσα στο κύτταρο μεταξύ των ενδοσυμβιωτών ενδέχεται να μην συνέβαινε. Αυτό αιτιολογείται από τον Birky (1995) υποστηρίζοντας ότι, μιας και οι ενδοσυμβιώτες ήταν ελεύθερα (άρα και αυτόνομα) βακτήρια, οι μηχανισμοί ανταλλαγής γενετικού υλικού δεν λειτουργούσαν στο νέο περιβάλλον του κυττάρου – ξενιστή.

Η κληρονομία του mtDNA από τον ένα γονέα είναι σημαντική για τους οργανισμούς. Ο Hoekstra (2000) υποστηρίζει ότι με αυτόν τον τρόπο αποφεύγεται η γρήγορη εξάπλωση επιβλαβών εγωιστικών μεταλλάξεων στα μιτοχονδριακά γονιδιώματα. Οι εγωιστικές μεταλλάξεις είναι εκείνες οι μεταλλάξεις που αυξάνουν γρήγορα την αντιπροσωπευτικότητα τους στον πληθυσμό αλλά έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην αρμοστικότητα του οργανισμού που τις φέρουν. Τέτοιες εγωιστικές μεταλλάξεις είναι πολύ πιο εύκολο να εξαπλωθούν στον πληθυσμό αν υπάρχει αμφιγονική μεταβίβαση των κυτταροπλασματικών DNA τα οποία τις φέρουν.

Για παράδειγμα, εάν η κληρονομία του mtDNA γίνεται και από τους δύο γονείς θα υπάρξει μίξη γαμετών. Η μίξη αυτή είναι πιθανό να επιτρέψει να περάσει στην επόμενη γενιά μια εγωιστική μετάλλαξη (Cosmides & Tooby 1981). Ας υποθέσουμε πως αυτή η εγωιστική μετάλλαξη είναι μια διαγραφή (deletion) στο ένα μιτοχονδριακό γονιδίωμα. Θα προκύψει ένα νέο μόριο mtDNA μικρότερο σε μέγεθος από ότι τα υπόλοιπα. Αυτό το γεγονός καθιστά το νέο επιβλαβές μόριο πιο γρήγορο στην αντιγραφή του από ότι τα άλλα με αποτέλεσμα να αυξάνεται γρήγορα η αντιπροσώπευσή του μέσα στον οργανισμό. Παράλληλα, το συγκεκριμένο μόριο, αφού έχει αρνητικές επιπτώσεις στην αρμοστικότητα του οργανισμού, θα προκαλέσει κίνδυνο σε ολόκληρο το πληθυσμό μιας και λόγω της γρήγορης εγκαθίδρυσης του, όλο και περισσότερα άτομα θα το κληρονομήσουν. Είναι φανερό ότι η κληρονομία γονιδίων και από τους δύο γονείς θα έδινε πολλές πιθανότητες σε ένα τέτοιο εγωιστικό μόριο να αυξήσει τη συχνότητά του πολύ γρήγορα στον πληθυσμό και να τον εξαφανίσει.

Τέτοιες εγωιστικές «συμπεριφορές» είναι δύσκολο να συμβούν σε ένα πληθυσμό που αναπαράγεται αφυλετικά γιατί η ροή γονιδίων γίνεται από τον ένα γονέα, άρα, στη περίπτωση του mtDNA δεν υπάρχει ανταλλαγή γενετικού υλικού σε επίπεδο μιτοχονδρίων. Έτσι, αν θεωρήσουμε ότι συνέβαινε η παραπάνω μετάλλαξη, ο απλότυπος θα παρέμενε σε μια εξελικτική γραμμή (μητέρα – κόρη – εγγονή κλπ.) και θα ήταν αδύνατο να περάσει σε άλλη θηλυκή γραμμή. Παράλληλα, ο μεταλλαγμένος απλότυπος λειτουργεί εις βάρος της υγείας του οργανισμού. Άρα η Φυσική Επιλογή τείνει να τον εξαφανίσει. Όμως, κάτω από το μοντέλο της αφυλετικής αναπαραγωγής, αυτό που θα κάνει είναι να εξαφανίσει μόνο μια εξελικτική γραμμή και όχι έναν ολόκληρο πληθυσμό.

Γ. MULLER'S RATCHET

Ο Muller (1964) υποστήριξε ότι εξελικτικές γραμμές που φέρουν μη – ανασυνδυαζόμενα γονιδιώματα είναι ευάλωτες και κινδυνεύουν να εξαφανιστούν λόγω της συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλάξεων. Η παρατήρηση αυτή ονομάστηκε επισήμως Muller's Ratchet σε ένα paper του Felsenstein (1974).

Η αφυλετική αναπαραγωγή είναι μια διαδικασία όπου κλώνοι των πατρικών γονιδιωμάτων περνούν στα θυγατρικά κύτταρα. Αν θεωρήσουμε ότι σε ένα πληθυσμό ο μέσος αριθμός επιβλαβών μεταλλάξεων που φέρουν τα πατρικά άτομα είναι δεδομένος, τότε τα θυγατρικά τους άτομα (σαν γενετικοί κλώνοι των πατρικών) θα περιέχουν τον ίδιο μέσο αριθμό μεταλλάξεων. Στον θυγατρικό πληθυσμό, τα άτομα που περιέχουν τις λιγότερες επιβλαβείς μεταλλάξεις (άρα είναι πιο υγιή από τα υπόλοιπα άτομα) πιθανόν να μη δώσουν απογόνους ή να δώσουν στείρους απογόνους. Το αποτέλεσμα, στην επόμενη γενιά, είναι να εξαφανιστούν χωρίς να κληροδοτήσουν αυτό το πλεονέκτημα τους σε απογόνους. Τώρα, μετά από τον θάνατο των πιο υγιών κυττάρων, ο μέσος αριθμός μεταλλάξεων του πληθυσμού έχει αυξηθεί. Αν αυτή η διαδικασία επαναληφθεί διαδοχικά σε κάθε γενιά με τα άτομα που έχουν τις λιγότερες επιβλαβείς μεταλλάξεις ο πληθυσμός θα συνεχίζει να συσσωρεύει μεταλλάξεις μέχρι να καταρρεύσει. Το φαινόμενο αυτό δεν μπορεί να αναστραφεί σε μη – ανασυνδυαζόμενα γονιδιώματα γιατί μέσω του συγκεκριμένου τρόπου αναπαραγωγής δεν μπορούν να προκύψουν άτομα με λιγότερο αριθμό επιβλαβών μεταλλάξεων από τα άτομα της προηγούμενης γενιάς.

Δεδομένης, λοιπόν, της μονογονεϊκής του κληρονομής, το mtDNA έχει τραβήξει το ενδιαφέρον ως προς το αν συσσωρεύει επιβλαβείς μεταλλάξεις ή όχι και σε ποιο βαθμό. Έχει αποδειχθεί ότι τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα συσσωρεύουν περισσότερες μεταλλάξεις σε σχέση με τα πυρηνικά λόγω αυξημένου μεταλλακτικού ρυθμού (για ένα review Neiman & Taylor 2009). Επιπρόσθετα, αν θεωρήσει κανείς ότι το mtDNA δεν υπόκειται σε ανασυνδυασμό, θα έπρεπε να τείνει προς εξαφάνιση ή εκφυλισμό όπως όλα τα μη – ανασυνδυαζόμενα γονιδιώματα. Όμως, το mtDNA παραμένει υγιές και λειτουργικό (Rand 2001, Christie *et al.* 2004).

Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα μη – ανασυνδυαζόμενου γονιδιώματος που είναι εξαιρετικά εκφυλισμένο λόγω συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλάξεων είναι το χρωμόσωμα Y (Charlesworth & Charlesworth 2000). Σε αντίθεση με το mtDNA που είναι ένα αρχέγονο μόριο (Boussau *et al.* 2004), έχει δειχθεί ότι τα χρωμοσώματα Y αντικαθίστανται ανά

περιόδους από τα νέο – Υ χρωμοσώματα τα οποία περιέχουν μικρότερο αριθμό επιβλαβών μεταλλάξεων. Αυτός ο τρόπος, ίσως, να είναι η λύση στο πρόβλημα της συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλάξεων στην περίπτωση του συγκεκριμένου χρωμοσώματος (Steinemann & Steinemann 1998). Αντίστοιχα, ένας από τους τρόπους που έχουν προταθεί για να μην ισχύει το Muller's Ratchet στο mtDNA είναι ο ανασυνδυασμός του.

Δ. ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΤΟΥ mtDNA

Εξαιτίας της μονογονεϊκής κληρονομής του mtDNA ο κάθε οργανισμός περιέχει έναν μόνο απλότυπο του συγκεκριμένου μορίου mtDNA. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται ομοπ्लाσμία. Αντίθετα, ετεροπ्लाσμία είναι η κατάσταση εκείνη που βρίσκεται ο οργανισμός όταν διατηρεί δύο ή περισσότερους mtDNA απλότυπους (Birky 2001). Ένα άτομο μπορεί να γίνει ετεροπ्लाσμικό για το mtDNA είτε κληρονομώντας τα αλληλόμορφα και από τους δύο γονείς είτε μετά από μια μετάλλαξη στα πρόδρομα κύτταρα που δημιούργησαν το ζυγωτό (Rokas *et al.* 2003).

Το φαινόμενο του ανασυνδυασμού μεταξύ δύο μορίων mtDNA, μέχρι πρόσφατα, δεν είχε παρατηρηθεί. Παράλληλα, υπήρξαν αναφορές, ότι λόγω παραγόντων που απέκλειαν την ετεροπ्लाσμική κατάσταση σε ένα οργανισμό είναι αδύνατο να συμβεί ανασυνδυασμός. Τέτοιοι παράγοντες, για παράδειγμα, είναι η επιλογή (Rand 2001) και η αφυλετική αναπαραγωγή των μιτοχονδρίων (Jansen & de Boer 1998). Όμως, πιο πρόσφατες μελέτες έδειξαν (White *et al.* 2008) ότι οι ενζυματικοί μηχανισμοί που χρειάζονται για τον ανασυνδυασμό υπάρχουν στα μιτοχόνδρια. Επιπλέον έχει αποδειχθεί άμεσα και έμμεσα πως ο ανασυνδυασμός στο mtDNA δεν είναι τόσο σπάνιος όσο πιστευόταν παλαιότερα.

Παρόλα αυτά, ο ανασυνδυασμός είναι δύσκολο να αποδειχθεί κυρίως λόγω της μητρικής κληρονομής του mtDNA καθώς κάποιο φαινόμενο ανασυνδυασμού θα συνέβαινε σε ομοπ्लाσμικά κύτταρα άρα η αναγνώριση ενός ανασυνδυασμένου μορίου θα ήταν αδύνατη (εκτός εάν δημιουργόταν ετεροπ्लाσμία μεγέθους, βλ. Tang *et al.* 2000). Μέχρι στιγμής, άμεσες αποδείξεις ανασυνδυασμού έχουν προκύψει μόνο από ετεροπ्लाσμικά άτομα (Rokas *et al.* 2003).

Ο ανασυνδυασμός είναι σημαντικός για τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα γιατί εξαλείφει επιβλαβείς μεταλλάξεις που προκύπτουν από την μονογονεϊκή κληρονομή τους (Charlesworth *et al.* 1993). Η αποφυγή συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλάξεων μπορεί

να συμβεί καθώς, μετά από ανασυνδυασμό, παράγονται απόγονοι με λιγότερες επιβλαβείς μεταλλάξεις με αποτέλεσμα να μην λειτουργεί το Muller's Ratchet (Neiman & Taylor 2009).

Όμως αυτό δημιουργεί ένα παράδοξο για το mtDNA. Από τη μια κληρονομείται μονογονεϊκά και από την άλλη χρειάζεται τον ανασυνδυασμό. Συνεπώς, πρέπει να υπάρχει ένας μηχανισμός ο οποίος επιτρέπει να διατηρείται ο μονογονεϊκός τρόπος κληρονόμησης των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων (δεδομένων των πλεονεκτημάτων του) αλλά και προστατεύει αυτά τα γονιδιώματα, μέσω του ανασυνδυασμού, από τη συσσώρευση επιβλαβών μεταλλάξεων.

E. ΔΙΑΡΡΟΗ ΠΑΤΡΙΚΟΥ mtDNA

Για να υπάρξει ετεροπλάσμια θα πρέπει οι επιπλέον απλότυποι να δημιουργηθούν στο ίδιο το άτομο (μέσω μετάλλαξης) ή να κληρονομηθούν από τους γονείς. Μια μορφή ετεροπλάσμιας προκύπτει όταν υπάρχει διαρροή πατρικού mtDNA στο ζυγωτό κατά τη γονιμοποίηση. Τέτοια διαρροή έχει παρατηρηθεί σε πολλούς οργανισμούς, όπως θηλαστικά (πχ. Gyllensten *et al.* 1991), πουλιά (Kvist *et al.* 2003), ερπετά (Ujvari *et al.* 2007), ψάρια (Nesbo *et al.* 1998), και αρθρόποδα (Gantenbein *et al.* 2005, Sherengul *et al.* 2006). Η ύπαρξη του φαινομένου υποστηρίζεται από μελέτες που έχουν αποδείξει ότι ορισμένες φορές οι ενζυματικοί μηχανισμοί που διατηρούν τη μονογονεϊκή κληρονόμηση του mtDNA (βλ. ενότητα Β) αποτυγχάνουν να δράσουν. Αυτό οδήγησε σε διαρροή πατρικού mtDNA τόσο από ενδοειδικές διασταυρώσεις (πιο σπάνια) όσο και από διαειδικές διασταυρώσεις (White *et al.* 2008).

Η διαρροή πατρικού mtDNA έχει γίνει γνωστή σε περισσότερες περιπτώσεις διαειδικών διασταυρώσεων γιατί πιθανώς σε αυτές καταρρέουν οι ενζυματικοί μηχανισμοί εκφυλισμού του πατρικού mtDNA στα ζυγωτά που προκύπτουν. Οι Sutovsky *et al.* (1999) απέδειξαν τον ενεργό ρόλο της πρωτεΐνης ουμπικουτίνη στη σήμανση, και τελικά καταστροφή του πατρικού mtDNA μετά τη γονιμοποίηση, χρησιμοποιώντας αντισώματα που αναστέλλουν τη δράση της. Οι απόγονοι (ζυγωτά) ενδοειδικών διασταυρώσεων ήταν ετεροπλάσμιοι με αυξημένη αναλογία πατρικά προς μητρικά mtDNA. Οι Sutovsky *et al.* (2000), στη συνέχεια έκαναν ένα πείραμα με υβρίδια βοοειδών. Συγκεκριμένα, υποστήριξαν ότι η σήμανση των πατρικών μιτοχονδρίων με ουμπικουτίνη είναι ειδοειδική, καθώς παρατηρήθηκαν μιτοχόνδρια του σπέρματος στα ζυγωτά που προέκυψαν. Πρότειναν

ότι η αμινοξική αλληλουχία που παράγεται για την συγκεκριμένη πυρηνική πρωτεΐνη είναι υψηλά συντηρημένη στο επίπεδο του είδους με αποτέλεσμα το τελικό προϊόν της (η ουμπικουτίνη) να αποτυγχάνει να αναγνωρίζει τα ξένα (πατρικά) μιτοχόνδρια που μπήκαν στο ζυγωτό μέσω του σπέρματος στα συγκεκριμένα, τουλάχιστον, υβρίδια .

Η διαδικασία της ουμπικουτινιλύωσης είναι μια γενικότερη διαδικασία στο κύτταρο, όπως περιγράφουν οι Lane *et al.* (1999). Συγκεκριμένα, αναφέρουν ότι η πρωτεολυτική δράση της συμμετέχει ενεργά στην ανακύκλωση των συστατικών του κυττάρου. Παράλληλα, είναι πολύ ευέλικτη στους στόχους της και, εξελικτικά, μια διαδικασία πολύ συντηρημένη.

Μια άλλη αιτία λόγω της οποίας, πρακτικά, η διαρροή του πατρικού mtDNA εντοπίζεται καλύτερα σε υβρίδια είναι η ευκολία εντοπισμού πατρικού mtDNA λόγω της νουκλεοτιδικής διαφοράς του σε σχέση με το μητρικό. Οι Shitara *et al.* (1998) δημιούργησαν υβρίδια ποντικών και χρησιμοποίησαν ειδοειδικούς εκκινητές για το mtDNA του πατρικού είδους. Οι συγκεκριμένοι εκκινητές ήταν με τέτοιο τρόπο σχεδιασμένοι ούτως ώστε να πολλαπλασιάζουν μόνο τα πατρικά μόρια του mtDNA. Έτσι, με την ευαίσθητη τεχνική της PCR κατάφεραν να εντοπίσουν πατρικά mtDNA σε 17 από τους συνολικά 38 απογόνους που εξέτασαν. Μια τέτοια μοριακή μέθοδος εντοπισμού διαρροής mtDNA θα ήταν αδύνατη σε ενδοειδικές διασταυρώσεις αφού τα δύο μόρια είναι απολύτως όμοια.

Οι εργασίες των Sutovsky *et al.* (2000) και των Shitara *et al.* (1998) έχουν μια διαφορά. Η πρώτη (υβρίδια βοοειδών) εστιάζει σε κυτταρικό επίπεδο. Η δεύτερη (υβρίδια ποντικών) εστιάζει σε ενήλικα άτομα. Η κοινή ομάδα καταγωγής των δειγμάτων (θηλαστικά) καταδεικνύει ότι η διαρροή του mtDNA διατηρείται από το στάδιο του ζυγωτού έως και το στάδιο του ενηλίκου παραμένοντας στους ιστούς των ατόμων. Παρόμοια αποτελέσματα πήραν οι Fontaine *et al.* (2007) και οι Sherengul *et al.* (2006) υβριδίζοντας έντομα. Για να αποδειχθεί εάν η διαρροή κληρονομείται (μιας και φτάνει στα ενήλικα) και σε τι ποσοστό οι Sherengul *et al.* (2006) έκαναν επαναδιασταυρώσεις των γόνιμων υβριδίων με τα πατρικά στελέχη. Τα ποσοστά παρουσίας των πατρικών mtDNA έφτασαν το 63.1%. Στα αντίστοιχα ενήλικα που προέκυψαν από ενδοειδικές διασταυρώσεις τα πατρικά mtDNA έφτασαν το 48.3%. Οι Solignac *et al.* (1984) υπολόγισαν για τη *Drosophila* ότι για να γυρίσουν τα άτομα σε ομοπλασμική κατάσταση μπορεί να χρειαστούν 500 γενιές. Αντίθετα, στο επίπεδο των θηλαστικών, έχει δειχθεί ότι η ομοπλασμική κατάσταση επέστρεψε σε 1 (Koehler *et al.* 1991) έως 5 (Hauswirth & Laipis 1982) γενιές.

Η πιθανότητα σύνδεσης του φαινομένου της πατρικής διαρροής mtDNA με τον ανασυνδυασμό του mtDNA διερευνάται από τους Rokas *et al.* (2003). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές προτείνουν ένα «μονοπάτι» εύρεσης ανασυνδυασμένων μορίων. Συγκεκριμένα, υποστηρίζουν ότι ο ρυθμός παραγωγής ανασυνδυασμένων μορίων σε ένα πληθυσμό εξαρτάται από τη συχνότητα της συνύπαρξης δύο διαφορετικών μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων στο ίδιο κύτταρο και στο βαθμό της γενετικής απόστασης τους. Στη συνέχεια χωρίζουν το επιχείρημα τους σε δύο σκέλη.

Στο πρώτο, εξετάζουν κατά πόσον γίνεται σε ενδοειδικές διασταυρώσεις να υπάρξει ετεροπλασμία μέσω πατρικής διαρροής. Καταλήγουν ότι η πιθανότητα είναι μικρότερη σε σχέση με τις διαειδικές διασταυρώσεις μιας και οι μηχανισμοί της μονογονεϊκής κληρονομής μέσα στο είδος είναι πολύ ισχυροί.

Στο δεύτερο σκέλος, εξετάζουν τους υβριδικούς πληθυσμούς με ετεροπλασμικά άτομα (λόγω κατάρρευσης των ενζυματικών μηχανισμών καταστροφής του πατρικού mtDNA). Προτείνουν ότι όσο τα μόρια του mtDNA απέχουν γενετικά μεταξύ τους τόσο η πιθανότητα να ανασυνδυαστούν μικραίνει. Βέβαια, σημειώνουν ότι, και η διασταύρωση αυτή καθαυτή θα είναι δύσκολο να γίνει μιας και όσο πιο μεγάλη γενετική απόσταση υπάρχει μεταξύ δύο ειδών, τόσο πιο δύσκολα θα υβριδιστούν. Αντίθετα, όσο μικραίνει η γενετική απόσταση δύο ειδών, τόσο πιο εύκολα υβριδίζονται, αρχικά παράγοντας στείρους απογόνους και στη συνέχεια (σε ακόμα κοντινότερες γενετικές αποστάσεις) γόνιμους απογόνους ως προς το ένα φύλο (συνήθως τα θηλυκά). Ένα, όμως, γόνιμο υβριδικό θηλυκό μπορεί να διασπείρει έναν ανασυνδυασμένο απλότυπο mtDNA οδηγώντας τον σε εγκαθίδρυση. Παρόλα αυτά, όσο πιο κοντινή είναι η γενετική απόσταση μεταξύ δύο ειδών τόσο πιο αποτελεσματικά θα δουλέψουν οι μηχανισμοί εξασφάλισης της μονογονεϊκής κληρονομής, με αποτέλεσμα τον περιορισμό ετεροπλασμίας.

Συμπεραίνουν λοιπόν ότι υπάρχει ένα στενό «παράθυρο ευκαιρίας» από το οποίο μπορεί να κανείς να «δει» τα ανασυνδυασμένα μόρια στον πληθυσμό και να μελετήσει αν αυτά κληρονομούνται ή όχι. Το παράθυρο αυτό ανοίγει όταν υπάρξει ισορροπία μεταξύ πατρικής διαρροής mtDNA και γόνιμων απογόνων. Δηλαδή, μικρό ποσοστό παρουσίας πατρικού mtDNA στα ετεροπλασμικά άτομα για να μην παραβιάζεται η μονογονεϊκή κληρονομία αλλά γόνιμοι απόγονοι που στη περίπτωση ανασυνδυασμού να διασπείρουν τους ανασυνδυασμένους απλότυπους.

ΣΤ. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Το mtDNA των ζώων κληρονομείται μητρικά και έχουν αναπτυχθεί ισχυροί μηχανισμοί που διασφαλίζουν αυτό το φαινόμενο (Birky 1995, 2001). Το πλεονέκτημα του συγκεκριμένου τρόπου κληρονόμησης είναι ότι προστατεύει τους πληθυσμούς από εγωιστικές μεταλλάξεις στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα που θα τους οδηγούσαν σε κατάρρευση (Hoekstra 2000). Όμως έχει αποδειχθεί (Muller 1964) ότι μη – ανασυνδυαζόμενα γονιδιώματα συσσωρεύουν επιβλαβείς μεταλλάξεις και οδηγούνται σε κατάρρευση.

Τέτοια μόρια υπάρχουν στη φύση τα οποία ακολουθούν πορεία προς τον εκφυλισμό τους. Αυτά τα μόρια καταρρέουν, εξαφανίζονται και τελικά αντικαθίστανται από νέα που δεν έχουν ακόμα συσσωρεύσει επιβλαβείς μεταλλάξεις. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η αντικατάσταση των χρωμοσωμάτων Y με νέο – Y χρωμοσώματα (Steinemann & Steinemann 1998). Στην περίπτωση του mtDNA, θεωρητικά, ένα μικρό ποσοστό ανασυνδυασμού θα προσφέρει στο mtDNA την αναστροφή του Muller's Ratchet και δεν θα βάλλει ενάντια της μονογονεϊκής του κληρονόμησης (Barr *et al.* 2005).

Η κατάσταση ετεροπλασμίας ως προς το mtDNA, είναι ο πρόδρομος της ανίχνευσης του φαινομένου του ανασυνδυασμού, ενώ τα άτομα που τη φέρουν είναι το κατάλληλο μέρος για να αναζητηθούν ανασυνδυασμένα μόρια (Rokas *et al.* 2003). Ετεροπλασμία στα άτομα ενός πληθυσμού μπορεί να παρατηρηθεί εάν τα συγκεκριμένα άτομα κληρονομήσουν μιτοχόνδρια και από τους δύο γονείς. Αν όμως η ετεροπλασμία (που οδηγεί στον ανασυνδυασμό) είναι τόσο σημαντική για το mtDNA είναι δύσκολο η Φυσική Επιλογή να την άφησε να συμβαίνει ως συνέπεια ενός μη τέλειου μηχανισμού ο οποίος εξασφαλίζει την μονογονεϊκή κληρονόμηση. Κατά συνέπεια, η διαρροή του πατρικού mtDNA δεν θα πρέπει να είναι τυχαία.

Στην παρούσα εργασία προσπαθούμε να προσεγγίσουμε το ερώτημα σχετικά με τον τρόπο που τα μιτοχόνδρια κληρονομούνται αφυλετικά διατηρώντας τα γονιδιώματα τους υγιή. Έτσι, μέσω μιας σειράς ενδοειδικών και διαειδικών διασταυρώσεων μεταξύ ειδών του γένους *Drosophila*, ανιχνεύουμε το ποσοστό της διαρροής πατρικού mtDNA στους απογόνους τους, για να διευκρινίσουμε εάν η ετεροπλασμία που θα διαπιστωθεί ακολουθεί ή όχι κάποιο πρότυπο και ποιο είναι αυτό. Τα αποτελέσματα θα βοηθήσουν στην κατανόηση αυτού του φαινομένου και θα επιχειρήσουν να δώσουν περισσότερες πληροφορίες εάν μέσω της πατρικής αυτής διαρροής (ακολουθούμενης πολύ πιθανώς από

το φαινόμενο του ανασυνδυασμού) καταφέρνει η Φυσική Επιλογή να διατηρεί τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα λειτουργικά και υγιή.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

A. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ

Τα στελέχη των ειδών *Drosophila* διατηρούνται στο εργαστήριο Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης σε σταθερές συνθήκες θερμοκρασίας ($25^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$) και φωτοπερίοδο 12ώρου. Η τροφή τους αποτελείται από ένα μείγμα αγαρ – καλαμποκάλευρο – σουκρόζη – yeast extract (Ashburner *et al.* 2004).

Στον πίνακα 1 φαίνονται είδη του *Drosophila melanogaster* species subgroup και οι υβριδικές διασταυρώσεις που είναι δυνατό ή όχι να γίνουν (Lachaise *et al.* 1986, Lee & Watanabe 1987, Lachaise *et al.* 2000, Cariou *et al.* 2001, Ashburner *et al.* 2004). Οι διασταυρώσεις πραγματοποιήθηκαν με παρθένα θηλυκά ηλικίας 2 – 3 ημερών και αρσενικά ίδιας ηλικίας σε σωλήνες καλλιέργειας με τροφή, κλεισμένα με βαμβάκι. Η αναλογία αρσενικών – θηλυκών ήταν 3:1. Οι συνθήκες διασταύρωσης ήταν θερμοκρασία 25°C και 12ωρη φωτοπερίοδος. Οι γονείς αφήνονταν στους σωλήνες μέχρι να γίνει ορατή η παρουσία pupae. Αν ήταν ζωντανοί σε αυτό το στάδιο απομακρύνονταν και καταψύχονταν στους -80°C .

Στη συνέχεια, τα άτομα της F_1 γενιάς συλλεγόταν καθημερινά (περίπου ανά 12ωρο) μέχρι να εξαντληθεί η διασταύρωση. Αμέσως μετά από κάθε συλλογή γίνονταν καταμέτρηση και διαχωρισμός κάτω από στερεοσκόπιο μεταξύ αρσενικών και θηλυκών απογόνων. Οι απόγονοι διατηρούνταν στους -80°C μέχρι τη διαδικασία της εξαγωγής γενωμικού DNA (gDNA).

B. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Στον πίνακα 2 φαίνονται οι εκκινητές που σχεδιάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη. Για να ενισχυθούν κομμάτια των πατρικών μορίων του mtDNA μέσω της PCR σχεδιάστηκαν εκκινητές που πολλαπλασιάζουν αλληλόμορφα αυτών «αποφεύγοντας» παράλληλα τον πολλαπλασιασμό των αντίστοιχων μητρικών. Η συγκεκριμένη μέθοδος PCR ονομάζεται allele – specific PCR. Η διαδικασία είχε ως εξής: Αρχικά, ολόκληρα τα γονιδιώματα των mtDNA των υπό μελέτη ειδών κατεβάζονταν από την βάση δεδομένων

Nucleotide του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>). Στη συνέχεια, έμπαιναν σε ένα fasta αρχείο είτε όλα μαζί είτε μόνο εκείνα τα γονιδιώματα των ειδών που είναι δυνατή η διασταύρωσή τους (Πίνακας 1) και ευθυγραμμίζονταν με το πρόγραμμα ClustalW μέσω του πακέτου MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007).

Με βάση τις νουκλεοτιδικές διαφορές μεταξύ των αλληλουχιών, σχεδιάζονταν οι εκκινητές με τα ακόλουθα κριτήρια:

- Σε μια PCR θα πολλαπλασιάζουν μια περιοχή μεγέθους 500 – 900 βάσεων
- Όσο το δυνατόν περισσότερες διαφορές σε επίπεδο βάσεων με το μόριο του μητρικού mtDNA και παράλληλα να βρίσκονται όσο πιο κοντά στο 3' άκρο του εκκινητή (ή μια από αυτές οπωσδήποτε πάνω στο 3' άκρο) με αποτέλεσμα να είναι όσο το δυνατόν πιο ειδικό.
- Το περιεχόμενο του εκκινητή σε G/C να υπερβαίνει το 40%

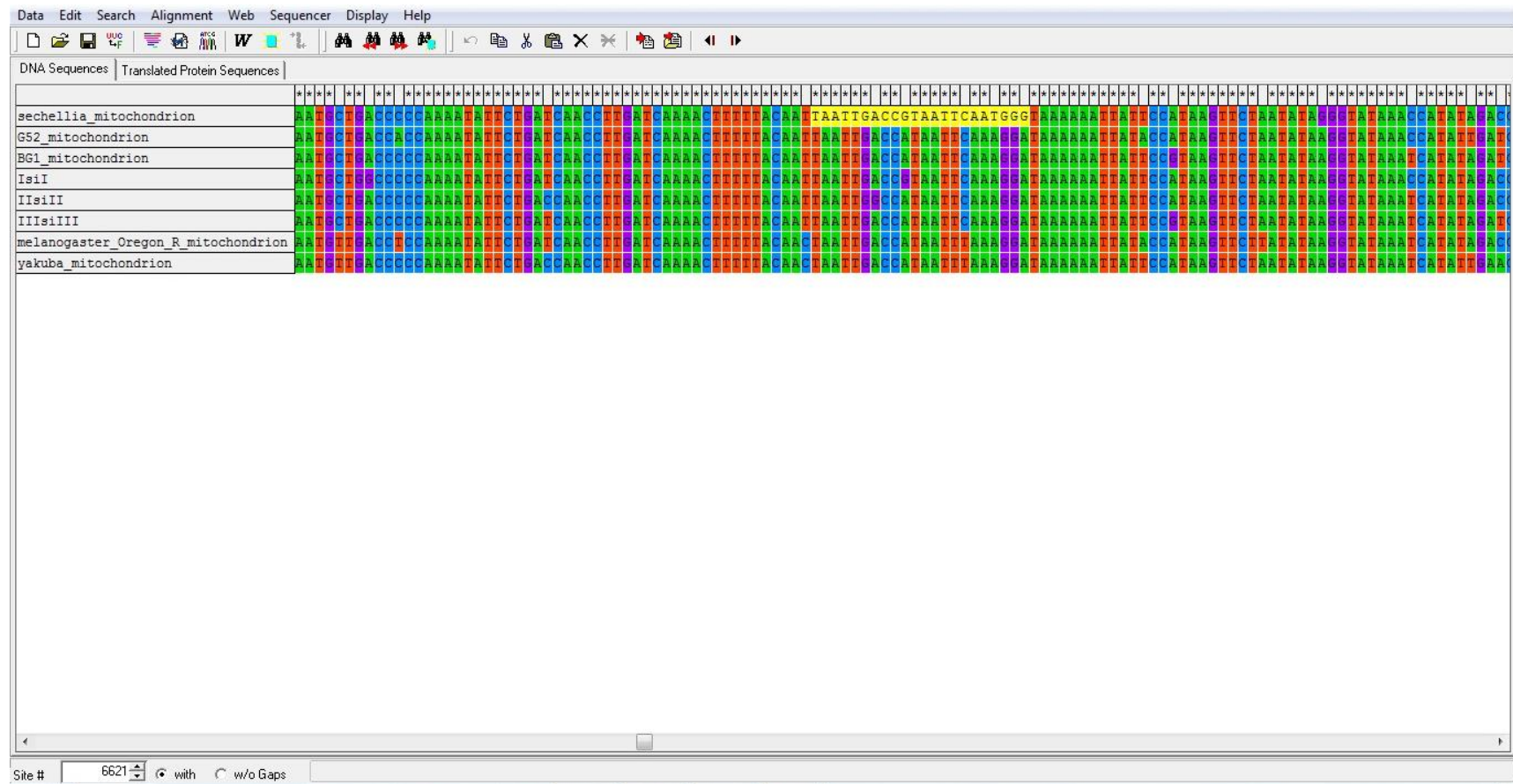
Οι παραπάνω προϋποθέσεις ικανοποιούν τα κριτήρια για την allele – specific PCR τα οποία είναι ο επιλεκτικός πολλαπλασιασμός μόνο ενός αλληλομόρφου έναντι κάποιου άλλου μέσα στο δείγμα DNA αλλά και τον εντοπισμό αυτού του αλληλομόρφου το οποίο βρίσκεται σε εξαιρετικά μικρή συγκέντρωση αποφεύγοντας τυχόν λάθη της PCR. Το τελευταίο κριτήριο είναι πολύ σημαντικό μιας και ακόμα και ένα αντίγραφο του αλληλομόρφου να υπάρχει, η PCR πρέπει να είναι σε θέση να το πολλαπλασιάσει (συνθήκες single – molecule PCR). Έτσι, το υψηλό περιεχόμενο σε G/C των εκκινητών οδηγεί σε υψηλότερες θερμοκρασίες υβριδισμού αυξάνοντας την ειδικότητά τους. Το σχήμα 1 δείχνει τον τρόπο σχεδιασμού των εκκινητών. Εκκινητές σχεδιάστηκαν για όλα τα είδη είτε χρησιμοποιήθηκαν σαν πατέρες είτε σαν μητέρες στις διασταυρώσεις.

Πίνακας 1: Οι αναπαραγωγικές σχέσεις μεταξύ ειδών του *Drosophila melanogaster* species subgroup

<i>Fem</i> \ <i>Male</i>	<i>melanogaster</i>	<i>simulans</i>	<i>mauritiana</i>	<i>sechellia</i>	<i>teissieri</i>	<i>yakuba</i>	<i>santomea</i>
<i>melanogaster</i>	-	Sterile fem No male	Sterile fem No male	Sterile fem No male	FAIL	FAIL	FAIL
<i>simulans</i>	No fem Sterile male	-	Fertile fem Sterile male	Fertile fem Sterile male	FAIL	FAIL	Sterile fem No male
<i>mauritiana</i>	No fem Sterile male	Fertile fem Sterile male	-	Fertile fem Sterile male	FAIL	FAIL	FAIL
<i>sechellia</i>	No fem Sterile male	FAIL	Fertile fem Sterile male	-	FAIL	FAIL	FAIL
<i>teissieri</i>	FAIL	FAIL	Sterile fem Sterile male	FAIL	-	FAIL	FAIL
<i>yakuba</i>	FAIL	FAIL	Sterile fem Sterile male	FAIL	FAIL	-	Fertile fem Sterile male
<i>santomea</i>	FAIL	FAIL	Sterile fem Sterile male	FAIL	FAIL	Fertile fem Sterile male	-

Πίνακας 2: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην μελέτη

Ζευγάρι εκκινητών	Αλληλουχία	Θερμοκρασία Υβριδισμού	Μέγεθος PCR προϊόντος (bp)	Αναφορά
12SAIF	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT	59	297	Simon <i>et al.</i> 1994
12SBIR	AAGAGCGACGGGCGATGTGT			
mauyakF	ATATTATTCGACCTGGAACA	59	569	Παρούσα μελέτη
mauyakR	CTCCTAATTCAATAGCGGGT			
maumelF	TACTCCTTCAAATTGCAGTTTGAT	59	746	Παρούσα μελέτη
maumelR	CCTGCTAATACTGGTAATGATAAA			
mausanF	GCTATAGCCGCTGGTAACCA	63	976	Παρούσα μελέτη
mausanR	TATGGCAGCTCCTCCTACAT			
simII_5183F	TTCAGGAGTTACTGTAACC	58	824	Dean <i>et al.</i> 2003
sim_uni_5983R	TATTCCTTGATTTCAATCATG			
simI_1737F	TCCTGATATAGCATTTC	57	795	Παρούσα μελέτη
simI_2531R	GTTAATCCTCCTACTGTG			
mausimF	GCTATTGGAGGTTTAAATCAG	56	850	Παρούσα μελέτη
mausimR	AATTCTTAGGGATGTACCT			
meIOR_1594F	GCTGAATTAGGACATCCTGGAGC	58	791	Παρούσα μελέτη
meIOR_2385R	TCGAGTATCTACATCTATTCCAACG			
sech_6676F	TAATTGACCGTAATTCAATGGG	58	938	Παρούσα μελέτη
sech_7614R	GCAGCTATGGCTGCCCTACT			
yak_4520F	ATATTATTCGACCGGGA	58	568	Παρούσα μελέτη
yak_5088R	CTCCTAATTCAATTGCTGGA			



Σχήμα 1: Σχεδιασμός εκκινητή που πολλαπλασιάζει μόνο το mtDNA της *D. sechellia* έναντι των υπολοίπων μιτοχονδριακών τύπων

Γ. ΕΞΑΓΩΓΗ ΓΕΝΩΜΙΚΟΥ DNA (gDNA)

Η εξαγωγή του gDNA έγινε με δύο πρωτόκολλα. Το πρώτο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για την εξαγωγή gDNA από τα ενήλικα της F1 γενιάς των διασταυρώσεων (από κάθε ένα άτομο ξεχωριστά – single fly extraction) για να γίνει η ανίχνευση των πατρικών μορίων mtDNA και από ενήλικα άτομα από κάθε είδος που μελετήθηκε για να χρησιμοποιηθούν ως controls στις PCR. Το δεύτερο πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε για να γίνει εξαγωγή από pools ενήλικων ατόμων (15 – 20 άτομα) όλων των ειδών. Το πρώτο πρωτόκολλο περιγράφηκε από τους O'Neill *et al.* (1992) ενώ το δεύτερο αποτελεί τροποποίηση εκείνου που περιέγραψαν οι Miller *et al.* (1988).

Πρωτόκολλο 1 (STE extraction method)

1. Ομογενοποιούμε το έντομο σε σωλήνα Eppendorf (1,5 mL) με αποστειρωμένο έμβολο σε 50 µL STE (10 mM Tris – HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl)
2. Προσθέτουμε 2 µL Proteinase K (20 mg/mL)
3. Επωάζουμε στους 55° C για 3 ώρες
4. Επωάζουμε στους 95° C για 10 λεπτά

Πρωτόκολλο 2 (High – Salt extraction method)

1. Ομογενοποιούμε 15 – 20 έντομα σε 400 µL διάλυμα λύσης (10 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 400 mM NaCl) μέσα σε σωλήνες eppendorf (1.5 mL)
2. Προσθέτουμε 32 µL 10% SDS
3. Προσθέτουμε 10 µL Proteinase K (20 mg/mL)
4. Επωάζουμε στους 55° C για 3 ώρες
5. Προσθέτουμε 280 µL υπέρκορο NaCl (>5 M)
6. Κάνουμε ισχυρή ανάδευση (vortex) για 15 λεπτά
7. Κάνουμε φυγοκέντρηση για 30 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα στους 4° C
8. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και το βάζουμε σε νέους σωλήνες eppendorf (1.5 mL)
9. Προσθέτουμε 500 µL χλωροφόρμιο (CHCl₃)

10. Κάνουμε καλή ανάμιξη με το χέρι
11. Κάνουμε φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα στους 4° C
12. Αφαιρούμε το υπερκείμενο και το βάζουμε σε νέους σωλήνες erpendorf (1.5 mL)
13. Προσθέτουμε 600 μL ισοπροπανόλη
14. Κάνουμε καλή ανάμιξη με το χέρι
15. Επωάζουμε στους – 20° C για 30 λεπτά
16. Κάνουμε φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα στους 4° C
17. Αφαιρούμε το υπερκείμενο
18. Προσθέτουμε 200 μL παγωμένη αιθανόλη 70%
19. Κάνουμε φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στη μέγιστη ταχύτητα στους 4° C
20. Αφαιρούμε το υπερκείμενο
21. Στεγνώνουμε τη πελέτα ή επωάζουμε στους 37° C για 10 λεπτά
22. Επαναδιαλύουμε τη πελέτα σε 50 – 60 μL νερό

Σε όλα τα άτομα από τα οποία έγινε εξαγωγή gDNA με το πρωτόκολλο 1 ελέγχθηκε η επιτυχία της εξαγωγής κάνοντας PCR με τους γενικούς εκκινητές 12SAIF/BIR. Ο αντίστοιχος έλεγχος στα rools ατόμων του πρωτόκολλου 2 γίνονταν με ποσοτικοποίηση του DNA σε σπεκτροφωτόμετρο της εταιρείας NanoDrop.

Δ. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

Οι σειρές των αντιδράσεων γίνονταν χρησιμοποιώντας την ίδια συνταγή και τις ίδιες συνθήκες πάντα αλλάζοντας μόνο τη θερμοκρασία υβριδοποίησης και τους κύκλους επαναλήψεων ανάλογα με τον σκοπό της PCR. Όλες οι παρακάτω αντιδράσεις γίνονταν σε τελικό όγκο 15 μL. Τα αποτελέσματα κάθε αντίδρασης οπτικοποιούνταν σε gel αгарόζης 1 – 1.3% βαμμένο με βρωμιούχο αιθίδιο 10% και φωτογραφίζονταν κάτω από UV φωτισμό. Στον πίνακα 3 φαίνεται η συνταγή αλλά και οι συνθήκες των πειραμάτων.

Πριν γίνει οποιαδήποτε ανάλυση έγινε μια σειρά PCR αντιδράσεων που ονομάστηκαν Detection Limit PCR και είχαν ως σκοπό την ανίχνευση του ορίου της συγκέντρωσης DNA που το κάθε ζευγάρι εκκινητών μπορούσε να εντοπίσει και να ενισχύσει στους 42 κύκλους. Το DNA που χρησιμοποιήθηκε σαν μήτρα προερχόταν από τα rools του πρωτόκολλου 2 σε διαδοχικές αραιώσεις. Οι αραιώσεις που έγιναν ήταν από 10^{-1} έως 10^{-9} . Συγκεκριμένα, έγινε εξαγωγή gDNA από 15 – 20 άτομα των ειδών *D. mauritiana*, *D. simulans* (simI), *D. simulans* (simII), *D. melanogaster* Oregon R, *D. sechellia*, *D. yakuba*.

Παράλληλα με την Detection Limit PCR πραγματοποιήθηκε και μια σειρά PCR στους 42 κύκλους, χρησιμοποιώντας άτομα από όλα τα είδη (εξαγωγή με πρωτόκολλο 1), με τους εκκινητές που ανιχνεύουν τα πατρικά mtDNA. Έτσι, κάθε ζευγάρι εκκινητών ελέγχονταν για την ειδικότητα του. Για παράδειγμα, οι εκκινητές mausanF/R που πολλαπλασιάζουν το mtDNA του *D. mauritiana* έναντι εκείνου του *D. santomea* (mausanF/R) ελέγχθηκαν χρησιμοποιώντας τους σε μια PCR με δείγματα 2 – 3 άτομα *D. mauritiana*, 2 – 3 άτομα *D. santomea* και ένα άτομο από όλα τα άλλα είδη. Με αυτή την PCR ελεγχόταν η εξειδίκευση των εκκινητών. Κάθε ζευγάρι εκκινητών που δεν κατάφερε να είναι απόλυτα ειδικό στο είδος για το οποίο έχει σχεδιαστεί, αποκλειόταν από οποιαδήποτε άλλη ανάλυση και σχεδιαζόταν νέο ζευγάρι.

Οι υπόλοιπες PCR ήταν τριών βασικών ειδών. Πρώτον, στα άτομα που γίνονταν εξαγωγή gDNA με το πρωτόκολλο 1 ενισχυόταν το γονίδιο 12S του mtDNA στους 35 κύκλους με γενικούς εκκινητές (12SAIF/BIR) με σκοπό να ελεγχθεί η παρουσία καλής ποιότητας DNA σε αυτά.

Δεύτερον, οι απόγονοι των διασταυρώσεων χωρίζονταν ανάλογα με την διασταύρωση και στη συνέχεια ανάλογα με το φύλο και ελέγχονταν η παρουσία του πατρικού mtDNA (Leakage PCR) σε κάθε άτομο ξεχωριστά στους 42 κύκλους. Η επιλογή των εκκινητών γινόταν ανάλογα με το πατρικό στέλεχος. Για παράδειγμα στην διασταύρωση μεταξύ *D. simulans* x *D. mauritiana* όπου πατρικό είδος είναι η *D. mauritiana* επιλέχθηκαν οι εκκινητές mausimF/R μιας και πολλαπλασιάζουν το mtDNA της *D. mauritiana* έναντι αυτού της *D. simulans* κ.ο.κ. Κάθε leakage PCR γίνονταν δύο φορές για να διαπιστωθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

Τρίτον, στα δείγματα με που είχαν πατρικό mtDNA ξαναγίνονταν PCR (Reamplification PCR) στους 35 κύκλους αλλά στα 50 μ L χρησιμοποιώντας ως μήτρα PCR προιόν από τις leakage PCR. Το προιόν που προέκυπτε, αφού καθαρίζονταν με το

NucleoSpin Extract II KIT της MACHERY – NAGEL σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, στέλνονταν για αλληλούχηση για να επιβεβαιωθεί ότι πράγματι ενισχύθηκε το πατρικό mtDNA.

Τέλος, λόγω των αποτελεσμάτων που προέκυψαν (βλ. σχετικό κεφάλαιο), σε υβρίδια κάποιων διασταυρώσεων ενισχύθηκε και το μητρικό mtDNA στους 35 κύκλους με σκοπό να επιβεβαιωθεί ότι πράγματι βρίσκονται σε ετεροπλασμική κατάσταση άρα διατηρούν δύο ειδών mtDNA.

Σε όλες τις PCR χρησιμοποιήθηκαν τα κατάλληλα θετικά και αρνητικά controls. Στις leakage PCR το θετικό control είναι DNA από το πατρικό στέλεχος ενώ το αρνητικό από το θηλυκό. Στις PCR για την ενίσχυση του μητρικού mtDNA τα controls ήταν αντίστροφα.

Πίνακας 3: Συνταγή και συνθήκες PCR

	Τελική Συγκέντρωση		°C	Χρόνος	
taq buffer 10X	1X	Αποδιάταξη	94	1 min	Κύκλοι 42 ή 35
MgCl ₂ 25mM	2.5 mM	Αποδιάταξη	94	15 sec	
dNTPs 10 mM	0.2 mM	Υβριδισμός	Κατάλληλη	15 sec	
pr_F 10 uM	0.6 uM	Επιμήκυνση	72	1 min	
pr_R 10 uM	0.6 uM	Επιμήκυνση	72	5 min	
taq 5u/μl	0.03 u/uL	Αναμονή	4	∞	
H ₂ O	στον όγκο				
Total	15 or 50 ul				
DNA	1 - 2 ul				

Ε. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Όλα τα αποτελέσματα της παρουσίας πατρικού mtDNA ελέγχθηκαν στατιστικά με την χρήση του ελέγχου χ^2 για τη σημαντικότητα των αποτελεσμάτων. Οι υπολογισμοί έγιναν στο Microsoft Office Excel 2010. Επίσης, τα αποτελέσματα της διαρροής πατρικού mtDNA στους απογόνους των διασταυρώσεων συσχετίστηκαν με την γενετική απόσταση των ειδών που

διασταυρώθηκαν χρησιμοποιώντας τα νουκλεοτιδικά δεδομένα του πυρηνικού γονιδίου *period* (βλ. Αποτελέσματα). Οι αλληλουχίες προήλθαν από τη βάση δεδομένων του NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>). Η συσχέτιση αυτή ελέγχθηκε στατιστικά με τον έλεγχο Spearman στο SPSS 17.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

A. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ

Όλες οι δυνατές διασταυρώσεις του πίνακα 1 επιχειρήθηκαν να γίνουν εκτός από αυτές που περιελάμβαναν σαν πατρικό είδος την *D. santomea*. Επίσης, δεν επιχειρήθηκαν οι διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών *D. yakuba* και *D. santomea*. Αυτό συνέβη λόγω του ότι δεν υπάρχουν αρκετές δημοσιευμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες για το mtDNA της *D. santomea* για να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές. Επίσης, πέρα από τις διαειδικές διασταυρώσεις έγιναν και δύο ενδοειδικές μεταξύ στελεχών της *D. simulans*. Οι πληθυσμοί της *D. simulans* χωρίζονται σε τρεις διακριτούς μιτοχονδριακούς τύπους (μιτότυπους) (Ballard 2000) οι οποίοι είναι καλά διαχωρισμένοι και έχουν αρκετές νουκλεοτιδικές διαφορές για να σχεδιαστούν ειδικευμένοι εκκινητές για κάθε μιτότυπο. Στη διάθεση μας είχαμε δύο στελέχη του είδους *D. simulans*. Το ένα στέλεχος έφερε τον μιτότυπο simI και το άλλο στέλεχος τον simII. Έτσι, διασταυρώσαμε τα δύο αυτά στελέχη, κάνοντας και τους δύο συνδυασμούς φύλου.

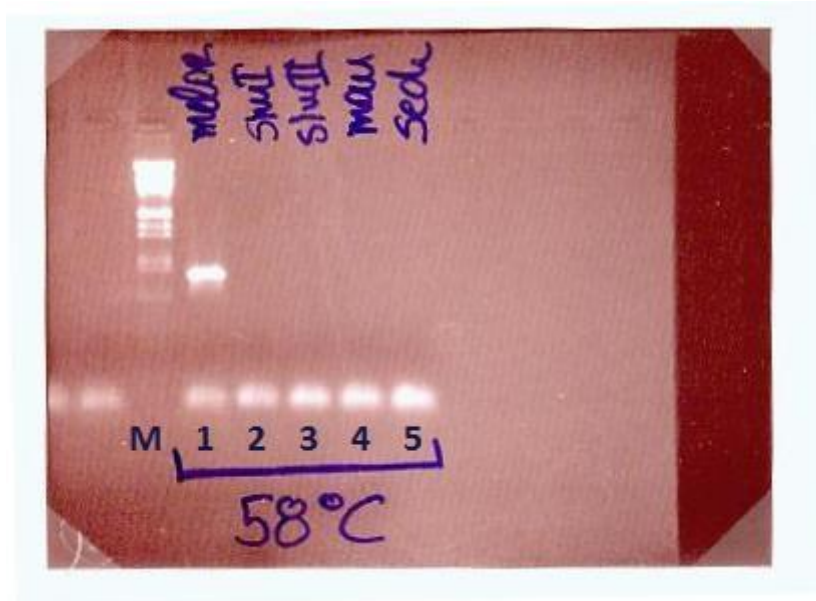
Στον πίνακα 4 φαίνονται οι διασταυρώσεις που επιχειρήθηκαν να γίνουν, τα αποτελέσματα τους αλλά και πόσες φορές επαναλήφθηκαν. Κάθε διασταύρωση επαναλαμβάνονταν τουλάχιστον δύο φορές εκτός και αν είχε δώσει ικανοποιητικό αριθμό απογόνων από την πρώτη φορά (θεωρήσαμε αυθαίρετα ικανοποιητικό αριθμό απογόνων μιας διασταύρωσης το 15). Οι διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. sechellia* και αρσενικών *D. mauritiana* και η αντίστροφή της δεν έδωσαν απογόνους (πίνακας 1, διαστ. 6 και 12). Το ίδιο συνέβη όταν προσπαθήσαμε να διασταυρώσουμε τα είδη *D. simulans* και *D. melanogaster* Oregon R (πίνακας 1, διαστ. 7 και 13). Τέλος, απογόνους δεν έδωσε και η διασταύρωση θηλυκών *D. sechellia* με αρσενικά *D. melanogaster* Oregon R (πίνακας 1, διαστ. 9).

Πίνακας 4: Αποτελέσματα διασταυρώσεων. Από τα αριστερά προς τα δεξιά, η πρώτη στήλη είναι ο αύξοντας αριθμός των διασταυρώσεων, η δεύτερη και η τρίτη στήλη είναι τα θηλυκά και τα αρσενικά στελέχη, αντίστοιχα, που διασταυρώθηκαν. Η τέταρτη στήλη είναι ο αριθμός των αρσενικών και θηλυκών απογόνων που προέκυψαν από τις διασταυρώσεις και η πέμπτη στήλη είναι ο αριθμός των επαναλήψεων της κάθε διασταύρωσης

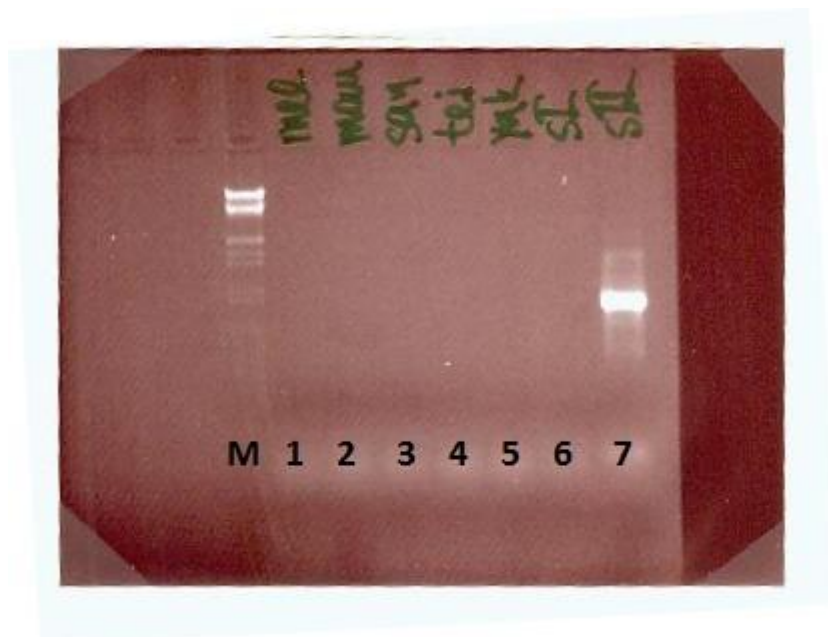
α/α	Θηλυκός γονέας	Αρσενικός γονέας	Απόγονοι		Επαναλήψεις
			♂	♀	
1	<i>yakuba</i>	<i>mauritiana</i>	5	5	3
2	<i>teissieri</i>	<i>mauritiana</i>	10	25	2
3	<i>melanogaster</i>	<i>mauritiana</i>	0	30	1
4	<i>santomea</i>	<i>mauritiana</i>	0	50	1
5	<i>simulans</i>	<i>mauritiana</i>	40	30	1
6	<i>sechellia</i>	<i>mauritiana</i>	Δεν έδωσε απογόνους		2
7	<i>simulans</i>	<i>melanogaster</i>	Δεν έδωσε απογόνους		2
8	<i>mauritiana</i>	<i>melanogaster</i>	16	1	3
9	<i>sechellia</i>	<i>melanogaster</i>	Δεν έδωσε απογόνους		2
10	<i>melanogaster</i>	<i>sechellia</i>	0	28	2
11	<i>simulans</i>	<i>sechellia</i>	30	20	1
12	<i>mauritiana</i>	<i>sechellia</i>	Δεν έδωσε απογόνους		2
13	<i>melanogaster</i>	<i>simulans</i>	Δεν έδωσε απογόνους		4
14	<i>mauritiana</i>	<i>simulans</i>	13	15	4
15	<i>simulans (I)</i>	<i>simulans (II)</i>	20	20	3
16	<i>simulans (II)</i>	<i>simulans (I)</i>	30	20	1

B. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Κάθε ζευγάρι εκκινητών που σχεδιάστηκε ελέγχθηκε σε PCR για την ειδικότητα του. Όλα τα ζευγάρια, πριν από οποιαδήποτε άλλη ανάλυση, μπήκαν σε PCR με μήτρα δείγματα DNA από όλα τα είδη της μελέτης. Οι εκκινητές που δε πολλαπλασίαζαν το mtDNA του είδους για το οποίο σχεδιάστηκαν ή πολλαπλασίαζαν mtDNA άλλου είδους πέρα από αυτό για το οποίο σχεδιάστηκαν αποκλείονταν από τη μελέτη και σχεδιαζόταν καινούργιο ζευγάρι. Στα σχήματα 2A και 2B φαίνονται δυο φωτογραφίες από gel αγαρόζης από τις PCR που ελέγξαμε τους εκκινητές melOR 1594F/2385R (ειδικευμένοι στο mtDNA της *D. melanogaster* Oregon R) και τους simII 5183F/5983R (ειδικευμένοι στο mtDNA της *D. simulans* (simII) (Dean *et al.* 2003).



Σχήμα 2A: Έλεγχος ειδικότητας εκκινητών melOR 1594F/2385R. M: λ DNA/EcoRI+HindIII, 1: *D. melanogaster* Oregon R, 2: *D. simulans* (simI), 3: *D. simulans* (simII), 4: *D. mauritiana*, 5: *D. sechellia*



Σχήμα 2B: Έλεγχος ειδικότητας εκκινητών sII 5183F/5983R. M: λ DNA/EcoRI+HindIII, 1: *D. melanogaster* Oregon R, 2: *D. mauritiana*, 3: *D. santomea*, 4: *D. teissieri*, 5: *D. yakuba*, 6: *D. simulans* (simI), 7: *D. simulans* (simII)

Γ. ΟΡΙΟ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Μετά τις εξαγωγές gDNA με το πρωτόκολλο εξαγωγής 2 (βλ. Υλικά και Μέθοδοι), δημιουργήσαμε διαδοχικές αραιώσεις των δειγμάτων (10^{-1} έως 10^{-9}) από κάθε είδος και πραγματοποιήσαμε τις detection limit PCR χρησιμοποιώντας τους εκκινητές που σχεδιάστηκαν στην παρούσα μελέτη με στόχο να καθορίσουμε το όριο ανίχνευσης του κάθε ζευγαριού εκκινητών, ανάλογα με το είδος στο οποίο είναι ειδικευμένο.

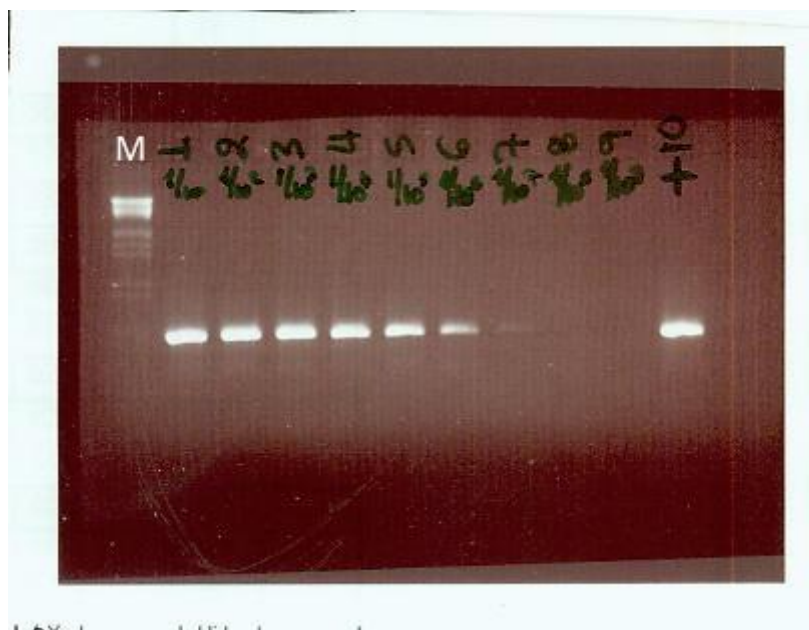
Στον πίνακα 5 φαίνονται τα αποτελέσματα της εξαγωγής, ενώ στον πίνακα 6 τα αποτελέσματα για το όριο ανίχνευσης. Οι εκκινητές που πολλαπλασιάζουν το mtDNA του *D. mauritiana* έναντι εκείνου του *D. yakuba* εμφάνισαν τη μεγαλύτερη ευαισθησία (1.4×10^{-4} ng). Αντίθετα, οι εκκινητές που πολλαπλασιάζουν το mtDNA του *D. melanogaster* Oregon R είχαν τη μικρότερη ευαισθησία έναντι όλων των άλλων (2 ng). Τα σχήματα 2 και 3 δείχνουν δύο παραδείγματα από τις συγκεκριμένες PCR.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα εξαγωγής gDNA με το πρωτόκολλο 2. Από αριστερά προς τα δεξιά, η πρώτη στήλη είναι το όνομα του κάθε στελέχους, στη δεύτερη το είδος από το οποίο έγινε εξαγωγή gDNA, η τρίτη στήλη ο μιτότυπος κάθε είδους και η τέταρτη στήλη η ποσότητα gDNA που βρέθηκε μετά από την ποσοτικοποίηση

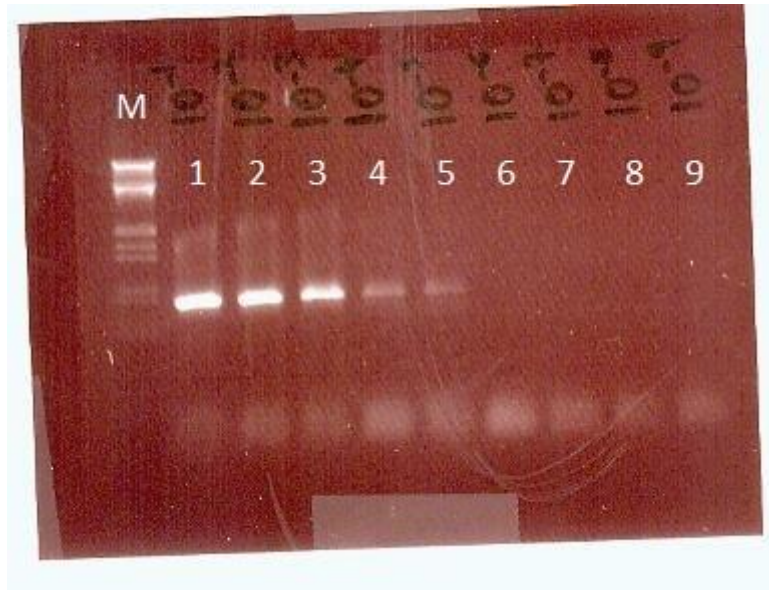
Εργαστηριακό στέλεχος	Είδος	Μιτοχονδριακός τύπος	Ποσότητα (ng/ul)
KB12	<i>D. mauritiana</i>	maull	1785
KB14	<i>D. yakuba</i>	yak	1667
KB11	<i>D. simulans</i>	simII	1736
KB17	<i>D. simulans</i>	simI	1104
D.melOR	<i>D. melanogaster</i> Oregon R	melOR	2033
248.07	<i>D. sechellia</i>	se	1364
248.31	<i>D. sechellia</i>	se	1411

Πίνακας 6: Αποτελέσματα εύρεσης ορίου ανίχνευσης εκκινητών της μελέτης. Από αριστερά προς τα δεξιά, η πρώτη στήλη είναι το ζευγάρι των εκκινητών, η δεύτερη σε ποιο είδος είναι ειδικευμένοι και η τρίτη το όριο ανίχνευσης των εκκινητών (σε ng)

Ζευγάρι εκκινητών	Είδος ειδίκευσης	Όριο ανίχνευσης (ng)
mauyakF/R	<i>D. mauritiana</i>	1.7×10^{-4}
maumelF/R	<i>D. mauritiana</i>	1.7×10^{-3}
mausanF/R	<i>D. mauritiana</i>	1.7×10^{-2}
sl1737F/2531R	<i>D. simulans</i> (I)	0.11
slI5183F/5983R	<i>D. simulans</i> (II)	0.17
mausimF/R	<i>D. mauritiana</i>	1.7×10^{-2}
melOR1594F/2385R	<i>D. melanogaster</i> Oregon R	2
sech6676F/7614R	<i>D. sechellia</i>	0.13



Σχήμα 2: Αποτέλεσμα detection limit PCR των mauyakF/R. M: λ DNA/EcoRI+HindIII, 1 – 9: διαδοχικές αραιώσεις KB12 (πιν. 5) από 10^{-1} - 10^{-9} , 10: KB12 από πρωτόκολλο 1 (βλ. υλικά & μέθοδοι)



Σχήμα 3: Αποτέλεσμα detection limit PCR των *mausimF/R*. M: λ DNA/EcoRI+HindIII, 1 – 9: διαδοχικές αραιώσεις KB12 (πιν. 5) από 10^{-1} – 10^{-9}

Δ. ΔΙΑΡΡΟΗ ΠΑΤΡΙΚΟΥ mtDNA

Μετά τη συλλογή των απογόνων από κάθε διασταύρωση και τον διαχωρισμό τους ανάλογα με το φύλο, γίνονταν εξαγωγή gDNA από κάθε άτομο ξεχωριστά χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο 1. Στη συνέχεια, για κάθε απόγονο γινόταν μια PCR με τους εκκινητές 12SAIF/BIR οι οποίοι είναι γενικοί για όλα τα είδη *Drosophila* και πολλαπλασιάζουν ένα τμήμα του γονιδίου 12S rRNA. Η PCR αυτή γινόταν για να διαπιστωθεί εάν το DNA από κάθε άτομο ήταν καλής ποιότητας. Όποιο άτομο δεν έδινε PCR προϊόν σε αυτή την αντίδραση αποκλειόταν από κάθε περαιτέρω ανάλυση.

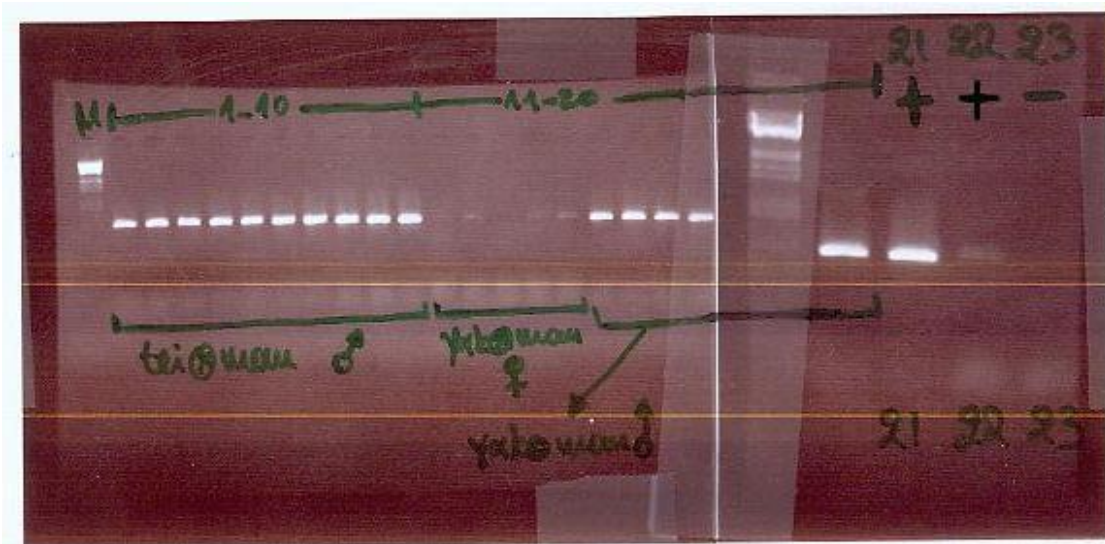
Ανάλογα με την διασταύρωση από την οποία προερχόταν κάθε άτομο ελέγχονταν για την παρουσία πατρικού mtDNA με τους κατάλληλους εκκινητές. Σε 4 από τις 9 διαειδικές διασταυρώσεις διαπιστώθηκε διαρροή πατρικού mtDNA, ενώ καθόλου διαρροή στις 2 ενδοειδικές και στις 5 από τις 9 διαειδικές. Στον πίνακα 7 φαίνονται τα αποτελέσματα από τον έλεγχο για την διαρροή πατρικού mtDNA. Στα σχήματα 4 και 5 φαίνονται δύο παραδείγματα από τις leakage PCR.

Οι απόγονοι των διασταυρώσεων μεταξύ αρσενικών *D. mauritiana* και θηλυκών *D. yakuba*, *D. teissieri* και *D. simulans* εμφάνισαν διαρροή πατρικού mtDNA. Επίσης, διαρροή

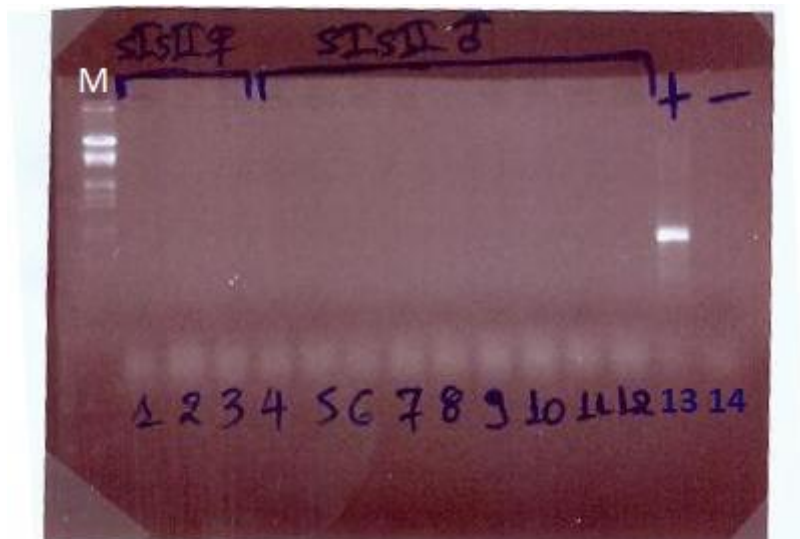
πατρικού mtDNA εμφάνισαν οι απόγονοι της διασταύρωσης θηλυκών *D. simulans* και αρσενικών *D. sechellia*.

Η διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. simulans* και αρσενικών *D. melanogaster* κατά τη δεύτερη επανάληψη έδωσε πολύ μεγάλο αριθμό απογόνων. Αυτά τα αποτελέσματα δεν συμφωνούν με παρόμοιες μελέτες (Lee & Watanabe 1987). Παράλληλα, όλοι οι απόγονοι εμφάνισαν πατρικό mtDNA. Έτσι, έγινε μια PCR σε μέρος των απογόνων αυτής της διασταύρωσης για ενίσχυση του μητρικού mtDNA με στόχο να επιβεβαιωθεί η ετεροπλασμική κατάσταση αυτών των ατόμων. Η PCR αυτή δεν έδωσε θετικά σήματα οπότε και η διασταύρωση αποκλείστηκε από περαιτέρω ανάλυση. Γενικότερα, ελέγχθηκαν μέρος των απογόνων όλων των διασταυρώσεων με διαρροή πατρικού mtDNA για να διασφαλιστεί η ακρίβεια των αποτελεσμάτων μας.

Στις διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. yakuba* και αρσενικών *D. mauritiana* αλλά και μεταξύ θηλυκών *D. simulans* και αρσενικών *D. mauritiana* παρατηρήθηκαν διαφορές στην ένταση του σήματος του leakage PCR προϊόντος (βλ. σχήμα 4A). Πιο αναλυτικά, τα θηλυκά άτομα των διασταυρώσεων αυτών έδωσαν ασθενή σήματα, σε σχέση με τα αντίστοιχα αρσενικά που έδωσαν πολύ δυνατώτερα σήματα. Στην διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. teissieri* και αρσενικών *D. mauritiana*, η ένταση των σημάτων μεταξύ των δύο φύλων δε διέφερε. Στη διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. simulans* και αρσενικών *D. sechellia*, όπου μόνο αρσενικά άτομα παρουσίασαν διαρροή πατρικού mtDNA τα σήματα ήταν το ίδιο δυνατά με τα αντίστοιχα αρσενικά που έδωσαν διαρροή στις υπόλοιπες τρεις διασταυρώσεις. Έχει αναφερθεί πως παρόλο που η PCR δεν είναι ποσοτική μέθοδος, μπορεί να εξαχθούν σχετικά ποσοτικά συμπεράσματα, δηλαδή αν ένα προϊόν είναι περισσότερο σε σχέση με κάποιο άλλο από την ένταση των ζωνών στην ηλεκτροφόρηση (Frye *et al.* 1989).



Σχήμα 4Α: Αποτελέσματα leakage PCR από τις διασταυρώσεις *teissieri* x *mauritiana* (θέσεις 1 – 10: αρσενικά 1 – 10) και *yakuba* x *mauritiana* (θέσεις 11 – 20: θηλυκά 1 – 5, αρσενικά 1 – 5 αντίστοιχα). 21,22: θετικά controls, 23: αρνητικό control. M: λ DNA/EcoRI+HindIII



Σχήμα 4Β: Αποτέλεσμα leakage PCR από την διασταύρωση *simulans* (I) x *simulans* (II). M: λ DNA/EcoRI+HindIII, 1 – 3: θηλυκά, 4 – 12: αρσενικά. 13 – 14: θετικό και αρνητικό control αντίστοιχα

Πίνακας 7: Αποτελέσματα ανίχνευσης διαρροής πατρικού mtDNA. Από αριστερά προς τα δεξιά, η πρώτη στήλη είναι ο αύξοντας αριθμός της διασταύρωσης, η δεύτερη και η τρίτη στήλη είναι τα θηλυκά και τα αρσενικά στελέχη, αντίστοιχα, που διασταυρώθηκαν. Η τέταρτη στήλη είναι τα αποτελέσματα της ανίχνευσης πατρικού mtDNA στους απογόνους κάθε διασταύρωσης. Τα αποτελέσματα δίνονται ως απόλυτος αριθμός και ως ποσοστό. Ως προς το φύλο των απογόνων τα αποτελέσματα είναι της μορφής «αρσενικά (ή θηλυκά) με διαρροή / συνολικά αρσενικά (ή θηλυκά). Ως προς το σύνολο των απογόνων είναι της μορφής «αρσενικά + θηλυκά με διαρροή / συνολικά αρσενικά + θηλυκά»

α/α	Θηλυκός γονέας	Αρσενικός γονέας	Διαρροή πατρικού mtDNA					
			Ως προς το φύλο απογόνων				Ως προς το σύνολο απογόνων	% στο σύνολο απογόνων
			♂	%	♀	%		
1	<i>yakuba</i>	<i>mauritiana</i>	5/5	100	4/5	80	9/10	90
2	<i>teissieri</i>	<i>mauritiana</i>	10/10	100	6/25	24	16/35	46
3	<i>melanogaster</i>	<i>mauritiana</i>	0/0	0	0/30	0	0/30	0
4	<i>santomea</i>	<i>mauritiana</i>	0/0	0	0/50	0	0/50	0
5	<i>simulans</i>	<i>mauritiana</i>	40/40	100	3/30	10	43/70	61
6	<i>sechellia</i>	<i>mauritiana</i>	Η διασταύρωση δεν έδωσε απογόνους					
7	<i>simulans</i>	<i>melanogaster</i>	Η διασταύρωση δεν έδωσε απογόνους					
8	<i>mauritiana</i>	<i>melanogaster</i>	0/16	0	0/1	0	0/17	0
9	<i>sechellia</i>	<i>melanogaster</i>	Η διασταύρωση δεν έδωσε απογόνους					
10	<i>melanogaster</i>	<i>sechellia</i>	0/0	0	0/28	0	0/28	0
11	<i>simulans</i>	<i>sechellia</i>	28/30	93	0/20	0	28/50	56
12	<i>mauritiana</i>	<i>sechellia</i>	Η διασταύρωση δεν έδωσε απογόνους					
13	<i>melanogaster</i>	<i>simulans</i>	Η διασταύρωση δεν έδωσε απογόνους					
14	<i>mauritiana</i>	<i>simulans</i>	0/13	0	0/15	0	0/28	0
15	<i>simulans (I)</i>	<i>simulans (II)</i>	0/20	0	0/20	0	0/40	0
16	<i>simulans (II)</i>	<i>simulans (I)</i>	0/30	0	0/20	0	0/50	0

Ε. ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΣΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΔΙΑΡΡΟΗΣ

Από τις τέσσερις διασταυρώσεις, των όποιων οι απόγονοι εμφάνισαν διαρροή πατρικού mtDNA, στάλθηκαν δείγματα (άτομα) για αλληλούχιση. Όλα τα δείγματα επιβεβαιώθηκαν μέσω της βάσης δεδομένων του NCBI ότι πράγματι ανήκουν στο mtDNA του εκάστοτε πατρικού είδους.

ΣΤ. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η πρώτη ανάλυση που κάναμε ήταν να ελέγξουμε αν σε κάθε μια από τις τέσσερις διασταυρώσεις που έδωσαν διαρροή πατρικού mtDNA, χωριστά, υπήρχε διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ αρσενικών και θηλυκών απογόνων. Στις τρεις από τις τέσσερις οι διαφορές αυτές στα αποτελέσματα διαρροής μεταξύ αρσενικών και θηλυκών απογόνων είναι στατιστικά σημαντικές. Πιο συγκεκριμένα, στις διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. teissieri* και αρσενικών *D. mauritiana* (πίνακας 7, διαστ. 2) το χ^2 ισούται με 58,3 ($P=2 \times 10^{-14}$). Στη διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. simulans* και αρσενικών *D. mauritiana* (πίνακας 7, διαστ. 5) το χ^2 ισούται με 474 ($P \approx 0$). Στη διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. simulans* και αρσενικών *D. sechellia* το χ^2 ισούται με 251 ($P \approx 0$).

Στη διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. yakuba* και αρσενικών *D. mauritiana* (πίνακας 7, διαστ. 1) η διαφορά δεν βγήκε στατιστικά σημαντική ($\chi^2=0,5$, $P=0,48$). Πολύ πιθανό όμως αυτό το αποτέλεσμα να οφείλεται στο μικρό αριθμό απογόνων αυτής της διασταύρωσης. Επιπλέον, αν αγνοήσουμε σε αυτή την διασταύρωση τα θηλυκά που έδωσαν ασθενές σήμα στη PCR τότε το αποτέλεσμα βγαίνει στατιστικά σημαντικό ($\chi^2=12,5$, $P=0,0004$). Βέβαια πρέπει να τονιστεί ότι το ασθενές σήμα είναι πραγματική διαρροή πατρικού mtDNA όπως έδειξε η αλληλούχιση του προϊόντος αυτού.

Στη συνέχεια ελέγξαμε αν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στη διαρροή του πατρικού mtDNA μεταξύ αρσενικών και θηλυκών απογόνων από τις τέσσερις διασταυρώσεις που έδωσαν διαρροή. Ο έλεγχος έδειξε ότι διαφέρουν ($\chi^2=2244$, $P \approx 0$). Ακόμα και αν κάνουμε τον έλεγχο αυτό για τις διαφορές των αποτελεσμάτων μεταξύ αρσενικών και θηλυκών απογόνων από όλες τις διαειδικές διασταυρώσεις (πιν. 7, διαστ. 1 – 14) υπάρχει στατιστική σημαντικότητα ($\chi^2=4724$, $P \approx 0$).

Παρατηρούμε, τέλος, ότι από τις τέσσερις διασταυρώσεις που έδωσαν διαρροή πατρικού mtDNA οι δύο παράγουν γόνιμους θηλυκούς απογόνους (θηλυκά *D. simulans* με αρσενικά *D. mauritiana* και *D. sechellia*) και οι άλλες δύο στείρους θηλυκούς απογόνους (θηλυκά *D. teissieri* και θηλυκά *D. yakuba* με αρσενικά *D. mauritiana*). Αν αθροίσουμε τους θηλυκούς απογόνους από αυτές τις διασταυρώσεις, τους χωρίσουμε σε γόνιμους και στείρους και τους ελέγξουμε για τα αποτελέσματα της διαρροής, οι διαφορές είναι στατιστικά σημαντικές ($\chi^2=54,08$, $P=2 \times 10^{-13}$).

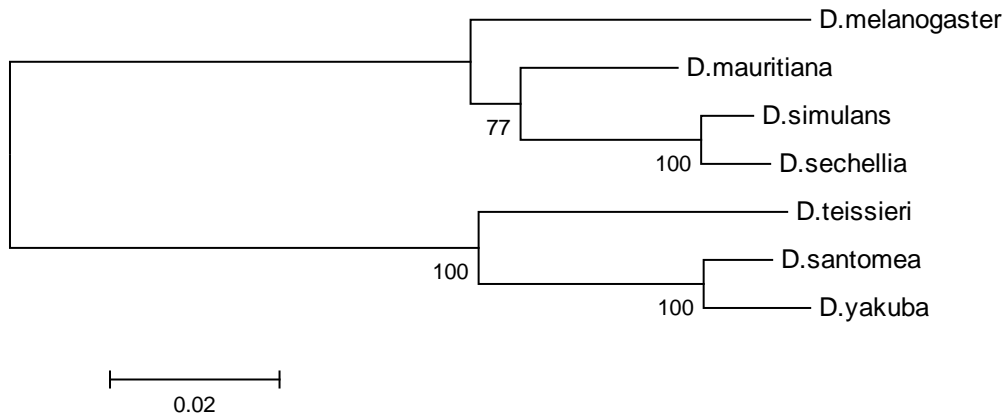
Ζ. ΓΡΑΦΙΚΕΣ ΠΑΡΑΣΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΣΧΕΣΕΙΣ

Έγιναν συσχετίσεις, μέσω γραφικών παραστάσεων, των αποτελεσμάτων διαρροής πατρικού mtDNA σε συνάρτηση με την σχετική νουκλεοτιδική απόσταση μεταξύ των ειδών που διασταυρώθηκαν. Οι φυλογενετικές σχέσεις των ειδών του γένους *Drosophila* είναι καλά χαρακτηρισμένες. Στις δικές μας αναλύσεις χρειαζόμασταν ένα σχετικό μέτρο των αποστάσεων μεταξύ των ειδών έτσι ώστε να αντικατοπτρίζονται οι πραγματικές φυλογενετικές σχέσεις. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήσαμε τυχαία το πυρηνικό γονίδιο *period* του οποίου την αλληλουχία από όλα τα είδη που χρησιμοποιήσαμε κατεβάσαμε από τη βάση δεδομένων (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore). Στοιχίσαμε τις αλληλουχίες με το Clustal W και υπολογίσαμε τις σχετικές αποστάσεις χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Kimura – 2 parameters στο πρόγραμμα MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007). Με βάση τις σχετικές αποστάσεις μεταξύ των ειδών που έδωσε αυτό το γονίδιο κατασκευάσαμε ένα φυλογενετικό δέντρο neighbor joining (Σχήμα 5). Το δέντρο αυτό συμφωνεί με την φυλογενετική ιστορία των ειδών η οποία έχει κατασκευαστεί με περισσότερα δεδομένα και απεικονίζεται στη flybase (<http://flybase.org/>). Η ταύτιση των δύο δέντρων μας δείχνει πως μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε τις σχετικές αποστάσεις που μας έδωσε το γονίδιο *period* για τις συσχετίσεις που μας ενδιαφέρουν.

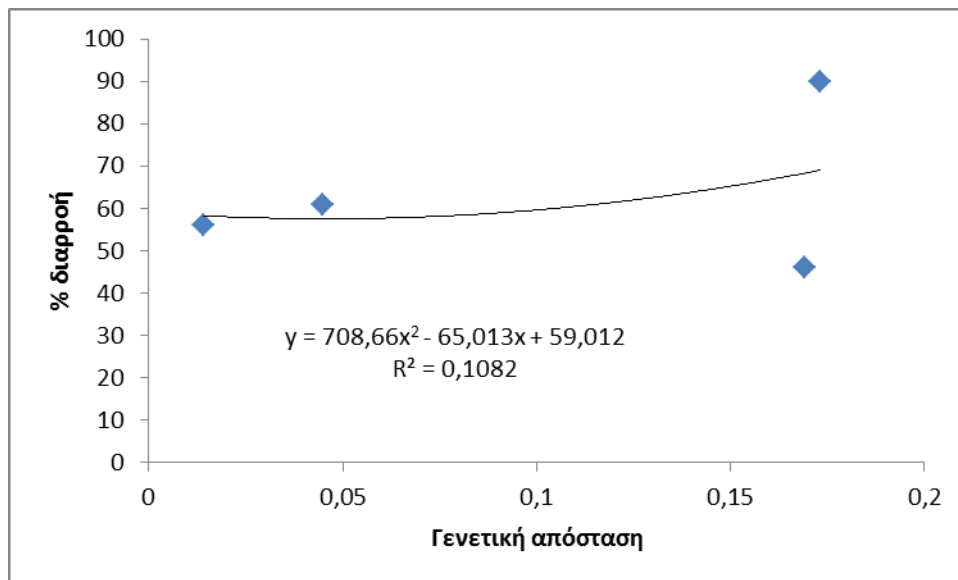
Με αυτόν το τρόπο συσχετίσαμε το ολικό ποσοστό διαρροής πατρικού mtDNA στο σύνολο των απογόνων των διασταυρώσεων που εμφάνισαν διαρροή με την απόσταση μεταξύ των ειδών που διασταυρώθηκαν. Επίσης συσχετίσαμε το ποσοστό διαρροής πατρικού mtDNA των αρσενικών απογόνων αλλά και το ποσοστό των θηλυκών απογόνων από τις διασταυρώσεις που εμφάνισαν διαρροή με την απόσταση μεταξύ των ειδών που διασταυρώθηκαν. Οι συσχετίσεις αυτές ελέγχθηκαν για τη σημαντικότητα τους με τον συντελεστή συσχέτισης R^2 .

Στο σχήμα 6 φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ του ολικού ποσοστού διαρροής πατρικού mtDNA και της γενετικής απόστασης των ειδών που διασταυρώθηκαν. Εδώ η συσχέτιση δεν είναι σημαντικά στατιστική ($P=0.67$). Στο σχήμα 7 φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ αρσενικών απογόνων από τις διασταυρώσεις που εμφάνισαν διαρροή και της γενετικής απόστασης των ειδών που διασταυρώθηκαν. Αυτή η συσχέτιση είναι σημαντική ($P=0.03$).

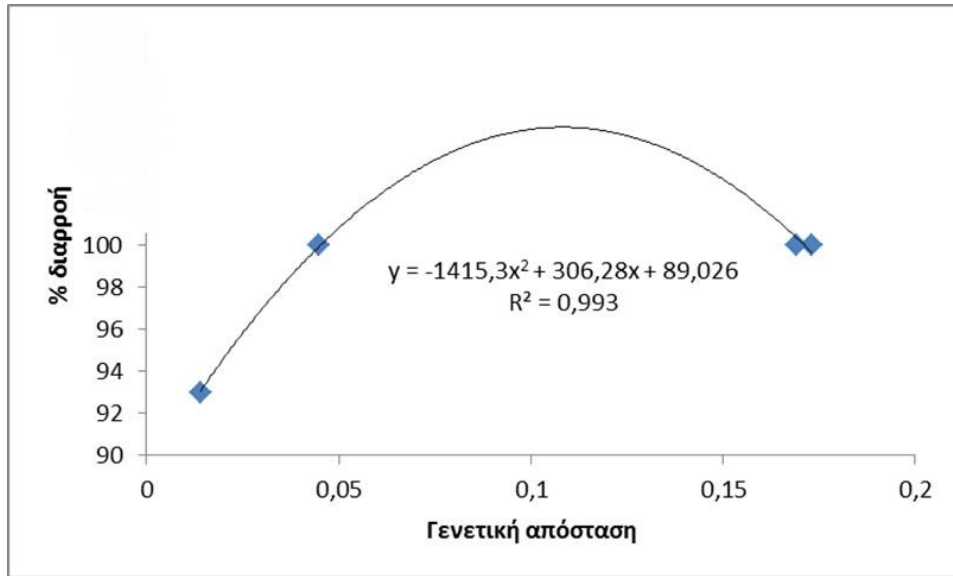
Στο σχήμα 8 φαίνεται η συσχέτιση μεταξύ θηλυκών απογόνων από τις διασταυρώσεις που εμφάνισαν διαρροή και της γενετικής απόστασης των ειδών που διασταυρώθηκαν. Αυτή η συσχέτιση στην πρώτη της μορφή δεν είναι σημαντική ($P=0.21$).



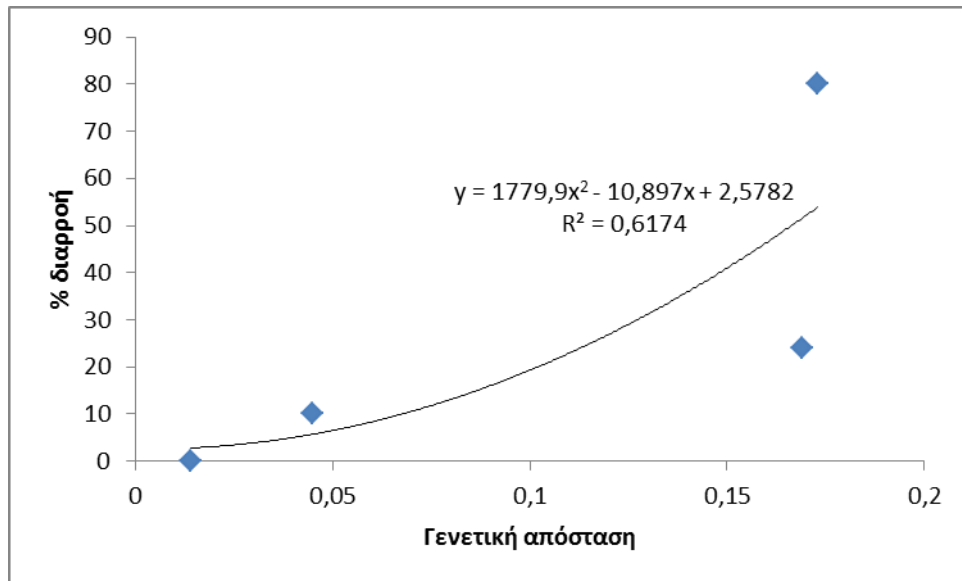
Σχήμα 5: Φυλογενετικές σχέσεις των υπό μελέτη ειδών της παρούσας μελέτης σύμφωνα με το πυρηνικό γονίδιο *period*. Ο υπολογισμός έγινε με το πρόγραμμα MEGA 4 χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο Kimura – 2 parameters και την μέθοδο neighbour-joining.



Σχήμα 6: Συσχέτιση ολικού ποσοστού διαρροής στο σύνολο των απογόνων των διασταυρώσεων που εμφάνισαν διαρροή πατρικού mtDNA



Σχήμα 7: Συσχέτιση του ποσοστού διαρροής των αρσενικών ατόμων στο σύνολο των αρσενικών απογόνων των διασταυρώσεων που εμφάνισαν διαρροή πατρικού mtDNA



Σχήμα 8: Συσχέτιση του ποσοστού διαρροής των θηλυκών ατόμων στο σύνολο των θηλυκών απογόνων των διασταυρώσεων που εμφάνισαν διαρροή πατρικού mtDNA

ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

A. ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ

Στην παρούσα μελέτη επιχειρήθηκαν διαειδικές και ενδοειδικές διασταυρώσεις μεταξύ ειδών του *Drosophila melanogaster* subgroup. Οι ενδοειδικές έδωσαν πάνω από 15 απογόνους ανά φύλο που ήταν το όριο το οποίο είχαμε θέσει. Το αποτέλεσμα, εξάλλου, ήταν αναμενόμενο μιας και πρόκειται για διασταυρώσεις μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Οι διαειδικές διασταυρώσεις στην πλειοψηφία τους ήταν πετυχημένες καθώς επιβεβαίωσαν αποτελέσματα προηγούμενων μελετών (Lachaise *et al.* 1986, Lee & Watanabe 1987, Lachaise *et al.* 2000). Συγκεκριμένα οι διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. tessieri*, *D. melanogaster*, *D. santomea*, *D. simulans* με αρσενικά *D. mauritiana* αλλά και μεταξύ αρσενικών *D. sechellia* και θηλυκών *D. melanogaster* και *D. simulans* έδωσαν και αυτές πάνω από 15 απογόνους ανά φύλο.

Η διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. yakuba* και αρσενικών *D. mauritiana* έδωσε δέκα μόνο απογόνους σε συνολικά τρεις προσπάθειες να γίνει η διασταύρωση. Οι Lee και Watanabe (1987) κάνοντας την ίδια διασταύρωση έδειξαν ότι από τα διακόσια θηλυκά *D. yakuba* που εξέτασαν, μόνο τα τέσσερα είχαν γονιμοποιηθεί, αποδεικνύοντας την ισχυρή αναπαραγωγική απομόνωση των δύο ειδών.

Οι διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. mauritiana* και αρσενικών *D. melanogaster* Oregon R όπως και μεταξύ θηλυκών *D. melanogaster* Oregon R και αρσενικών *D. sechellia* έδωσαν απογόνους πάνω από το όριο που θέσαμε. Το κοινό χαρακτηριστικό των δύο αυτών διασταυρώσεων, όμως, είναι το γεγονός ότι ένας από τους δύο γονείς είναι το είδος *D. melanogaster*. Σύμφωνα με τον Ashburner (2004) οι διασταυρώσεις τέτοιου είδους δίνουν απογόνους μόνο ενός φύλου. Το φύλο των απογόνων είναι το ίδιο με εκείνο του πατρικού στελέχους του *D. melanogaster*. Η διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. melanogaster* Oregon R και αρσενικών *D. sechellia* επιβεβαιώνει αυτόν τον κανόνα δίνοντας μόνο θηλυκούς απογόνους. Παρόλα αυτά, η διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. mauritiana* και αρσενικών *D. melanogaster* Oregon R έδωσε ένα άτομο (θηλυκό) που δεν ήταν αναμενόμενο. Όμως, οι Lachaise *et al.* (1986) περιέγραψαν ένα στέλεχος *D. melanogaster* το οποίο όταν διασταυρώθηκε με *D. simulans* έδωσε μερικούς θηλυκούς στείρους απογόνους. Παράλληλα, τα ποσοστά των βιώσιμων ενήλικων απογόνων σε σχέση με το σύνολο των

απογόνων από αυτή τη διασταύρωση, έδειξαν ότι κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα (11 – 20%).

Η διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. mauritiana* και αρσενικών *D. simulans*, πάρα τις 4 προσπάθειες, έδωσε λίγους σχετικά απογόνους. Οι Lee & Watanabe (1987) κάνοντας την ίδια διασταύρωση βρήκαν μόνο δύο θηλυκά γονιμοποιημένα από τα διακόσια θηλυκά *D. mauritiana* που εξέτασαν. Οι Lachaise *et al.* (1986) δεν κατάφεραν να πάρουν απογόνους από αυτή την διασταύρωση κάνοντας σαράντα επαναλήψεις. Τελικά, μικρός αριθμός απογόνων προέκυψε αυξάνοντας τον αριθμό των αρσενικών *D. simulans* σε αναλογία αρσενικά προς θηλυκά 4:1.

Οι διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. sechellia* και αρσενικών *D. mauritiana*, όπως και η αντίστροφή της δεν παρήγαγαν κανένα απόγονο. Το ίδιο συνέβη για τις διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. melanogaster* Oregon R και αρσενικών *D. simulans* όπως και για την αντίστροφή της. Τέλος, απόγονους δεν παρήγαγε η διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. sechellia* και αρσενικών *D. melanogaster* Oregon R.

Οι διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. sechellia* και αρσενικών *D. mauritiana* και η αντίστροφή της έγιναν από τους Lachaise *et al.* (1986). Τα αποτελέσματα αυτών των διασταυρώσεων ήταν τα μικρότερα σε αριθμό απογόνων από όλες τις επιτυχημένες διασταυρώσεις της μελέτης. Οι Lee & Watanabe (1987) εξετάζοντας τα θηλυκά *D. sechellia* που διασταυρώθηκαν με αρσενικά *D. mauritiana* δεν βρήκαν κανένα γονιμοποιημένο. Για την αντίστροφή διασταύρωση βρήκαν 26 γονιμοποιημένα θηλυκά στα 100 που εξέτασαν.

Παρομοίως, οι Lee & Watanabe (1987) έδειξαν ότι, για τη διασταύρωση μεταξύ θηλυκών *D. sechellia* και αρσενικών *D. melanogaster*, εννέα μόνο θηλυκά από τα τριακόσια που εξετάστηκαν ήταν γονιμοποιημένα. Οι Lachaise *et al.* (1986) δείχνουν ότι μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις τα θηλυκά *D. sechellia* έδωσαν απογόνους με οποιοδήποτε είδος του subgroup και να επιχειρούσαν να τα διασταυρώσουν. Πιθανώς, η επιτυχία των συγκεκριμένων διασταυρώσεων να εξαρτάται από τις περιοχές συλλογής των στελεχών του κάθε είδους ή από τις συνθήκες διασταύρωσης (αναλογία φύλου – θερμοκρασία). Εξάλλου, η βιωσιμότητα των υβριδίων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την θερμοκρασία του περιβάλλοντος (Ashburner 2004).

Οι διασταυρώσεις μεταξύ θηλυκών *D. melanogaster* Oregon R και αρσενικών *D. simulans* και οι αντίστροφες τους απέτυχαν να παράγουν απογόνους. Οι Lachaise *et al.*

(1986) σημειώνουν ότι σπάνια κατάφεραν να υβριδίσουν τα δύο αυτά είδη. Και εδώ, η επιτυχία της διασταύρωσης εξαρτήθηκε από την καταγωγή του στελέχους.

B. ΟΡΙΟ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ

Καθώς το πατρικό mtDNA βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες μέσα στο κάθε άτομο (τουλάχιστον $1:10^3$ – Kaneda *et al.* 1995) η κάθε τεχνική που χρησιμοποιείται πρέπει να φτάσει ή να υπερβαίνει αυτά τα όρια για να μπορέσει να το ανιχνεύσει. Το όριο ανίχνευσης της παρούσας μελέτης για τα πατρικά μόρια mtDNA κυμαίνεται από 1.7×10^{-4} ng DNA ανά άτομο, που μπορούν να ανιχνεύσουν οι πιο ευαίσθητοι εκκινητές, έως 2 ng DNA ανά άτομο που μπορούν να ανιχνεύσουν οι λιγότερο ευαίσθητοι εκκινητές.

Οι Kaneda *et al.* (1995), δείχνουν ότι οι εκκινητές που σχεδίασαν δεν κατάφεραν να ανιχνεύσουν πατρικό mtDNA με μια μόνο σειρά PCR. Έτσι, σχεδιάζοντας εκκινητές για nested PCR, όπου και ανίχνευσαν πατρικό mtDNA, κατάφεραν να πάρουν PCR προϊόν χωρίς όμως να αναφέρουν συγκεκριμένη ποσότητα DNA ως όριο ανίχνευσης. Οι Shitara *et al.* (1998) κάνοντας διαδοχικές αραιώσεις από ένα δείγμα ολικού DNA συκωτιού από ποντίκι ανίχνευαν DNA στο όριο του 0.01 fg (10^{-5} pg) κάνοντας nested PCR σε μια προσπάθεια να τελειοποιήσουν τη διακριτική ικανότητα των αρχικών εκκινητών που σχεδίασαν οι Kaneda *et al.* (1995). Οι Condo *et al.* (1992) δεν κατάφεραν να πάρουν PCR προϊόν από δείγμα mtDNA ενηλίκου *D. mauritiana* (μιτότυπος mauI) ποσότητας 2.5 pg μετά από 60 κύκλους PCR.

Φαίνεται λοιπόν ότι η παρούσα μελέτη χρησιμοποιώντας μόνο μια σειρά PCR ξεπερνάει το όριο ανίχνευσης των Condo *et al.* (1992) κατά μια τάξη μεγέθους κάνοντας χρήση των πιο ευαίσθητων εκκινητών (mauyakF/R). Οι περισσότεροι, όμως, εκκινητές (οι ειδικοί στα mtDNA των *D. simulans*, οι mausanF/R, οι mausimF/R, οι ειδικοί στο mtDNA του *D. melanogaster* και οι ειδικοί στο mtDNA του *D. sechellia*) υστερούν κατά μια έως τρεις τάξεις μεγέθους σε σχέση με τα όρια ανίχνευσης της μελέτης των συγκεκριμένων ερευνητών. Οι maumelF/R έχουν το ίδιο όριο ανίχνευσης με τους Condo *et al.* (1992). Γενικά, αν εξαιρέσουμε τους εκκινητές που είναι ειδικευμένοι στο *D. melanogaster*, τα όρια ανίχνευσης των υπολοίπων εκκινητών δείχνουν να είναι παρόμοια με εκείνα των Condo *et al.* (1992) χωρίς ιδιαίτερες διακυμάνσεις.

Γ. ΔΙΑΡΡΟΗ ΠΑΤΡΙΚΟΥ mtDNA

Οι Sherengul *et al.* (2006) για να ανιχνεύσουν τα ποσοστά διαρροής πατρικού mtDNA σε διασταυρώσεις μεταξύ ειδών του γένους *Drosophila* πραγματοποίησαν ενδοειδικές (αλλά μεταξύ διαφορετικών μιτοτύπων) και διαειδικές διασταυρώσεις, πήραν τα γόνιμα θηλυκά και από τα δύο είδη διασταυρώσεων και τα επαναδιασταύρωσαν με τα πατρικά στελέχη. Στη συνέχεια, έκαναν εξαγωγή mtDNA από pool πενήντα ατόμων από την F₁ γενιά και ανίχνευσαν πατρικά μόρια mtDNA. Τα αποτελέσματα ήταν ποσοστό επαναδιασταυρώσεων με διαρροή ως προς τον ολικό αριθμό επαναδιασταυρώσεων. Έτσι, στις ενδοειδικές τα ποσοστά κυμαίνονται από 19% έως 48%, ενώ στις διαειδικές από 31% έως 63%.

Η ίδια ομάδα (Kondo *et al.* [1992]) επεχείρησε να διαπιστώσει το ποσοστό διαρροής πατρικού mtDNA σε ένα συνδυασμό ενδοειδικών και διαειδικών διασταυρώσεων ειδών του γένους *Drosophila*. Εδώ, η ανίχνευση έγινε σε απογόνους της F₁ γενιάς αλλά και σε απογόνους επαναδιασταυρώσεων. Ο τρόπος εξαγωγής mtDNA έγινε με την ίδια ακριβώς μεθοδολογία (50 θηλυκά) όπως και παραπάνω. Τα αποτελέσματα ήταν της μορφής ποσοστό διαρροής πατρικού mtDNA ως προς το σύνολο των διασταυρώσεων. Κατέληξαν λοιπόν ότι υπάρχει ποσοστό διαρροής 87% (7 στις 8 διασταυρώσεις).

Και οι δύο μελέτες προσπάθησαν να κατανοήσουν το φαινόμενο εξετάζοντας απογόνους διασταυρώσεων ειδών του γένους *Drosophila*. Στη παρούσα μελέτη παρατηρήθηκε διαρροή πατρικού mtDNA στο 28,5% των διαειδικών διασταυρώσεων (4 στις 14 διασταυρώσεις). Οι Sherengul *et al.* (2006) βρίσκουν μεγάλες διακυμάνσεις στα ποσοστά της διαρροής αλλά εξετάζουν τρεις μόνο διασταυρώσεις. Οι Condo *et al.* (1992) πλησιάζει τον αριθμό διασταυρώσεων της παρούσας μελέτης αλλά εκείνες οι διασταυρώσεις έγιναν μεταξύ διαφορετικών στελεχών του ίδιου είδους, οπότε κάθε μια διασταύρωση δύσκολα συγκρίνεται με μια άλλη λόγω μεγάλης γενετικής ομοιότητας των στελεχών που διασταυρώνονται.

Οι Shitara *et al.* (1998), κάνοντας ενδοειδικές διασταυρώσεις ποντικών, παρατηρούν ότι το πατρικό mtDNA δεν κατανέμεται σε όλους τους ιστούς των απογόνων στην F₁ γενιά λόγω της περιορισμένης ποσότητας του. Επίσης, έδειξαν ότι δεν μεταφέρεται το πατρικό mtDNA στις επόμενες γενιές μέσω της θηλυκής γραμμής. Τέλος, κάνοντας επαναδιασταυρώσεις της F₁ γενιάς με τα πατρικά στελέχη, δεν ανίχνευσαν πατρικό mtDNA στους απογόνους των επαναδιασταυρώσεων. Αιτιολογούν τα αποτελέσματα τους

σημειώνοντας ότι, η ύπαρξη ενός συστήματος (ή συστήματα) στα ζυγωτά αναγνωρίζει τα mtDNA του σπέρματος και στη συνέχεια τα καταστρέφει.

Οι Gyllensten *et al.* (1991) έδειξαν την παρουσία πατρικών mtDNA σε επόμενες γενιές εξετάζοντας θηλυκά άτομα μετά από 8 – 26 γενιές επιτυχημένων επαναδιασταυρώσεων ποντικών της F_1 με τα πατρικά στελέχη. Οι συγκεκριμένες διασταυρώσεις ήταν διαειδικές, σε αντίθεση με εκείνες των Shitara *et al.* (1998) οι οποίοι έκαναν ενδοειδικές διασταυρώσεις.

Στη παρούσα μελέτη, συγκεντρωτικά, παρατηρήθηκε διαρροή πατρικού mtDNA στους 96 από τους 318 απογόνους διαειδικών διασταυρώσεων (ποσοστό 30%). Από αυτούς οι 83 ήταν αρσενικά (σε σύνολο 114 αρσενικών – ποσοστό 73%) και οι 13 θηλυκά (σε σύνολο 204 θηλυκών – 6,3%). Στις ενδοειδικές διασταυρώσεις δεν παρουσιάστηκε απόγονος με διαρροή πατρικού mtDNA. Αν τα αποτελέσματα αναχθούν σε ποσοστό διασταυρώσεων με διαρροή πατρικού mtDNA τότε οι 4 από τις 14 διαειδικές διασταυρώσεις εμφάνισαν διαρροή (ποσοστό 28,5%).

Οι μελέτες των Sherengul *et al.* (2006) και Condo *et al.* (1992) δεν ποσοτικοποιούν τα αποτελέσματα τους στο επίπεδο του φύλου ή του ατόμου αλλά εξετάζουν μόνο θηλυκά άτομα από pools 50 ατόμων. Επίσης, οι μελέτες στα θηλαστικά (Gyllensten *et al.* 1991, Shitara *et al.* 1998) δεν ποσοτικοποιούν τη διαρροή πατρικού mtDNA σε επίπεδο ατόμων, αλλά αρκούνται στην παρατήρηση του φαινομένου. Η παρούσα μελέτη εστιάζει στην παρουσία του φαινομένου σε κάθε άτομο ξεχωριστά τόσο στα αρσενικά, όσο και στα θηλυκά. Έτσι, θα φανεί εάν το φαινόμενο ακολουθεί κάποιο πρότυπο ή είναι τυχαίο.

Το φαινόμενο της διαρροής πατρικού mtDNA ανιχνεύθηκε σε τέσσερις από τις 14 διαειδικές διασταυρώσεις. Στις δύο ενδοειδικές δεν ανιχνεύθηκε διαρροή πατρικού mtDNA. Το άμεσο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί είναι ότι το φαινόμενο στις διαειδικές διασταυρώσεις παρατηρείται στο συντριπτικό ποσοστό των αρσενικών (83/85 αρσενικά, ποσοστό 98%). Στα θηλυκά, το ποσοστό είναι αρκετά μικρότερο (13/80 θηλυκά, ποσοστό 16%).

Ο Hoekstra (2000) υποστηρίζει ότι η Φυσική Επιλογή θα ευνοήσει ή θα εξαλείψει μια μετάλλαξη στο mtDNA με βάση τις επιπτώσεις της στα θηλυκά άτομα. Ένα τέτοιο επιχείρημα είναι λογικό μιας και η μητρική κληρονομία του mtDNA καθιστά τα αρσενικά άτομα «αδιέξοδο» για τα μιτοχόνδρια. Αυτό σημαίνει ότι οποιαδήποτε μετάλλαξη στο

mtDNA των αρσενικών δεν θα επηρεάσει τον πληθυσμό. Όμως, εάν μια μετάλλαξη συμβεί στα θηλυκά άτομα επηρεάζει άμεσα τον πληθυσμό γιατί θα διασπαρθεί μέσω της θηλυκής γραμμής. Η συγκεκριμένη θεωρία υποστηρίχθηκε από πειραματικά δεδομένα (Innocenti *et al.* 2011) στελεχών *Drosophila*.

Ο Hoekstra (2000) επίσης συμπεραίνει ότι η μεταβίβαση των μιτοχονδριακών γονιδιωμάτων στις επόμενες γενιές είναι μια διαδικασία ευαίσθητης ισορροπίας. Η Φυσική Επιλογή ισορροπεί μεταξύ της συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλάξεων λόγω της αφυλετικής κληρονομίας των οργανιδίων αυτών και της επαγωγής «εγωιστικών» μεταλλάξεων εάν αυτά κληρονομηθούν και από τις δύο φυλετικές γραμμές. Η πατρική συνεισφορά mtDNA είναι τόσο λίγη ώστε να αποφεύγονται οι «εγωιστικές» συμπεριφορές αλλά τόσο αρκετή ώστε να επιβραδύνεται το Muller's Ratchet μέσω ανασυνδυασμού. Ένας τέτοιος μηχανισμός, λοιπόν, είναι δύσκολο να έχει αφεθεί στην τύχη οπότε μάλλον ακολουθεί κάποιους, άγνωστους μέχρι τώρα, κανόνες.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης ενισχύουν το επιχείρημα που υποστηρίζει ότι το φαινόμενο ίσως να μην είναι τυχαίο. Αρχικά, η παρουσία πατρικών mtDNA στο 98% των αρσενικών απογόνων δεν θα επηρεάσει επόμενες γενιές. Αυτό θα γίνει γιατί το mtDNA κληρονομείται μητρικά και γιατί οι αρσενικοί απόγονοι από αυτές τις τέσσερις διασταυρώσεις είναι στείροι (πιν. 2). Παράλληλα, τα σήματα των PCR προϊόντων στα αρσενικά άτομα ήταν πολύ έντονα καταδεικνύοντας την παρουσία αρκετής ποσότητας πατρικών mtDNA στους ιστούς των ατόμων.

Στον αντίποδα, τα θηλυκά άτομα στα οποία παρατηρήθηκε διαρροή πατρικού mtDNA (16%) είχαν πολύ αδύναμα σήματα στις PCR (εξαιρουμένης της διασταύρωσης μεταξύ θηλυκών *D. teissieri* και αρσενικών *D. mauritiana*) τα οποία, τουλάχιστον συγκρινόμενα με τα αρσενικά, δείχνουν από μικρές έως πολύ μικρές συγκεντρώσεις πατρικών mtDNA στους ιστούς των θηλυκών απογόνων. Κάτι τέτοιο μπορεί να εξηγηθεί από τη θεωρία που υποστηρίζει ο Hoekstra (2000) με την υπόθεση ότι η Φυσική Επιλογή αποτρέπει τη διαρροή πατρικού mtDNA στα θηλυκά άτομα, υποστηρίζοντας τη μητρική κληρονομία του mtDNA.

Στις τέσσερις διασταυρώσεις που διαπιστώσαμε διαρροή πατρικού mtDNA, οι δύο δίνουν στείρους θηλυκούς απογόνους ενώ οι άλλες δύο γόνιμους (Lachaise *et al.* 1986, Lachaise *et al.* 2000). Στις μεν δύο πρώτες τα θηλυκά με διαρροή είναι της τάξεως του 33% ενώ στις υπόλοιπες δύο 6%. Υπάρχει μια κατακόρυφη πτώση του ποσοστού διαρροής μεταξύ στείρων και γόνιμων απογόνων.

Αυτό το αποτέλεσμα δείχνει πως οι μηχανισμοί που εξασφαλίζουν την μονογονεϊκή κληρονομία του mtDNA χαλαρώνουν όταν τα θηλυκά είναι στείρα διότι δεν πρόκειται να μεταβιβάσουν mtDNA στις επόμενες γενιές. Όμως ένα μικρό ποσοστό διαρροής παραμένει ακόμα και όταν τα υβρίδια θηλυκά είναι γόνιμα. Μικρό ποσοστό διαρροής έχει παρατηρηθεί σε ενδοειδικές διασταυρώσεις *Drosophila* (Sherengul *et al.* 2006), παρόλο που κάτι τέτοιο δεν επιβεβαιώνεται με την παρούσα μελέτη. Διαρροή πατρικού mtDNA έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη ζώων (για ένα review White *et al.* 2008) συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου (Schwartz & Vissing 2002).

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης δείχνουν πως ακόμα και σε διαειδικές διασταυρώσεις η διαρροή πατρικού mtDNA στους απογόνους δεν θα πρέπει να είναι το αποτέλεσμα της κατάρρευσης των μηχανισμών που εξασφαλίζουν τη μονογονεϊκή κληρονομία του mtDNA διότι μέσα στην ίδια διασταύρωση εμφανίζεται συστηματικά διαφορετικό ποσοστό διαρροής μεταξύ αρσενικών και θηλυκών απογόνων. Είναι συνεπώς πιθανό η διαρροή πατρικού mtDNA να βρίσκεται κάτω από τον αυστηρό έλεγχο της φυσικής επιλογής. Το μικρό ποσοστό διαρροής που παρατηρείται τόσο σε ενδοειδικές διασταυρώσεις όσο και σε διαειδικές διασταυρώσεις με γόνιμα θηλυκά υβρίδια (παρούσα μελέτη) είναι πιθανό να μην οφείλεται στην κατάρρευση των μηχανισμών της μονογονεϊκής κληρονομίας αλλά να επιτρέπεται από τη φυσική επιλογή.

Η εισαγωγή πατρικών μορίων mtDNA στη μητρική γραμμή κληρονομίας εξασφαλίζει το υπόβαθρο για να γίνει ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών εξελικτικών γραμμών. Ο ανασυνδυασμός στο mtDNA των ζώων έχει αποδειχθεί πως δεν είναι τόσο σπάνιος όσο πιστευόταν παλαιότερα (Kraytsberg *et al.* 2004, Tsaousis *et al.* 2005, Piganau and Eyre-Walker 2004). Ο ανασυνδυασμός όμως ακυρώνει τη δράση του Muller's ratchet δηλαδή τη συσσώρευση επιβλαβών μεταλλάξεων στο mtDNA. Αυτή η διαδικασία είναι πολύ σημαντική για το mtDNA διότι εξασφαλίζει την ευρωστία του.

Με βάση τα παραπάνω, η φυσική επιλογή θα πρέπει να ισορροπήσει μεταξύ δύο αντίθετων δυνάμεων: από τη μια πρέπει να εξασφαλίσει την μονογονεϊκή κληρονομία του mtDNA κι από την άλλη πρέπει να ακυρώσει το Muller's ratchet. Είναι πιθανό η φυσική επιλογή να επιτρέπει τη διαρροή πατρικού mtDNA σε τέτοια επίπεδα έτσι ώστε να μην απειλείται η μονογονεϊκή κληρονομία αλλά να ακυρώνεται η δράση του Muller's ratchet. Είναι γνωστό άλλωστε πως για να ακυρωθεί το ratchet απαιτούνται πολύ μικρά ποσοστά ανασυνδυασμού (Gordo and Charlesworth 2000). Τα αποτελέσματά μας υποστηρίζουν αυτή

την υπόθεση δείχνοντας ότι η διαρροή πατρικού mtDNA σε υβρίδια F1 δεν είναι τυχαία αλλά διαφοροποιείται τόσο μεταξύ θηλυκών και αρσενικών απογόνων όσο και μεταξύ διασταυρώσεων που δίνουν γόνιμα και στείρα θηλυκά.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ashburner, Michael, και R. Scott Hawley. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. 2^η έκδ. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004.
- Ballard, J W. 'Comparative genomics of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans*'. *Journal of Molecular Evolution* 51, no. 1 (Ιούλιος 2000): 64-75.
- Ballard, J. William O., και David M. Rand. 'THE POPULATION BIOLOGY OF MITOCHONDRIAL DNA AND ITS PHYLOGENETIC IMPLICATIONS'. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36, no. 1 (Δεκέμβριος 2005): 621-642.
- Barr, Camille M, Maurine Neiman, και Douglas R Taylor. 'Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals'. *The New Phytologist* 168, no. 1 (Οκτώβριος 2005): 39-50.
- Baur, Ervin. 'Das Wesen und die Erblchkeitsverhältnisse der "Varietates albomarginatae hort" von *Pelargonium zonale*'. *Z. Vererbungslehre* 1: 330-51.
- Bergstrom, C T, και J Pritchard. 'Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes'. *Genetics* 149, no. 4 (Αύγουστος 1998): 2135-2146.
- Birky, C W, Jr. 'The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models'. *Annual Review of Genetics* 35 (2001): 125-148.
- . 'Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, no. 25 (Δεκέμβριος 5, 1995): 11331-11338.
- Boussau, Bastien, E Olof Karlberg, A Carolin Frank, Boris-Antoine Legault, και Siv G E Andersson. 'Computational inference of scenarios for alpha-proteobacterial genome evolution'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, no. 26 (Ιούνιος 29, 2004): 9722-9727.
- Cariou, M L, J F Silvain, V Daubin, J L Da Lage, και D Lachaise. 'Divergence between *Drosophila santomea* and allopatric or sympatric populations of *D. yakuba* using paralogous amylase genes and migration scenarios along the Cameroon volcanic line'. *Molecular Ecology* 10, no. 3 (Μάρτιος 2001): 649-660.

- Charlesworth, B, και D Charlesworth. 'The degeneration of Y chromosomes'. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 355, no. 1403 (Νοέμβριος 29, 2000): 1563-1572.
- Charlesworth, D, και S I Wright. 'Breeding systems and genome evolution'. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, no. 6 (Δεκέμβριος 2001): 685-690.
- Charlesworth, D., M. T. Morgan, και B. Charlesworth. 'Mutation Accumulation in Finite Outbreeding and Inbreeding Populations'. *Genetics Research* 61, no. 01 (1993): 39-56.
- Christie, J S, J A Castro, P Oliver, A Picornell, M M Ramon, και A Moya. 'Fitness and life-history traits of the two major mitochondrial DNA haplotypes of *Drosophila subobscura*'. *Heredity* 93, no. 4 (Οκτώβριος 2004): 371-378.
- Cosmides, L M, και J Tooby. 'Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict'. *Journal of Theoretical Biology* 89, no. 1 (Μάρτιος 7, 1981): 83-129.
- Dawid, I B, και A W Blackler. 'Maternal and cytoplasmic inheritance of mitochondrial DNA in *Xenopus*'. *Developmental Biology* 29, no. 2 (Οκτώβριος 1972): 152-161.
- Dean, Matthew D, Kirrie J Ballard, Anne Glass, και J William O Ballard. 'Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*'. *Genetics* 165, no. 4 (Δεκέμβριος 2003): 1959-1969.
- Felsenstein, J. 'The evolutionary advantage of recombination'. *Genetics* 78, no. 2 (Οκτώβριος 1974): 737-756.
- Fontaine, Kathryn M, John R Cooley, και Chris Simon. 'Evidence for paternal leakage in hybrid periodical cicadas (Hemiptera: Magicicada spp.)'. *PloS One* 2, no. 9 (2007): e892.
- Frye, R A, C C Benz, και E Liu. 'Detection of amplified oncogenes by differential polymerase chain reaction'. *Oncogene* 4, no. 9 (Σεπτέμβριος 1989): 1153-1157.
- Gantenbein, Benjamin, Victor Fet, Iris A Gantenbein-Ritter, και François Balloux. 'Evidence for recombination in scorpion mitochondrial DNA (Scorpiones: Buthidae)'. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 272, no. 1564 (Απρίλιος 7, 2005): 697-704.
- Gillham, Nicholas W. *Organelle Genes and Genomes*. Oxford University Press, USA, 1994.

- Gordo, I, και B Charlesworth. 'On the speed of Muller's ratchet'. *Genetics* 156, no. 4 (Δεκέμβριος 2000): 2137-2140.
- Gyllensten, U, D Wharton, A Josefsson, και A C Wilson. 'Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice'. *Nature* 352, no. 6332 (Ιούλιος 18, 1991): 255-257.
- Hauswirth, W W, και P J Laipis. 'Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 79, no. 15 (1982): 4686 -4690.
- Hoekstra, R F. 'Evolutionary origin and consequences of uniparental mitochondrial inheritance'. *Human Reproduction (Oxford, England)* 15 Suppl 2 (Ιούλιος 2000): 102-111.
- Innocenti, Paolo, Edward H. Morrow, και Damian K. Dowling. 'Experimental Evidence Supports a Sex-Specific Selective Sieve in Mitochondrial Genome Evolution'. *Science* 332, no. 6031 (2011): 845 -848.
- Jansen, R P, και K de Boer. 'The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate'. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145, no. 1-2 (Οκτώβριος 25, 1998): 81-88.
- Kaneda, H, J Hayashi, S Takahama, C Taya, K F Lindahl, και H Yonekawa. 'Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, no. 10 (Μάιος 9, 1995): 4542-4546.
- Koehler, C M, G L Lindberg, D R Brown, D C Beitz, A E Freeman, J E Mayfield, και A M Myers. 'Replacement of bovine mitochondrial DNA by a sequence variant within one generation'. *Genetics* 129, no. 1 (Σεπτέμβριος 1991): 247-255.
- Kondo, R, E T Matsuura, και S I Chigusa. 'Further observation of paternal transmission of *Drosophila* mitochondrial DNA by PCR selective amplification method'. *Genetical Research* 59, no. 2 (Απρίλιος 1992): 81-84.
- Kondo, R, Y Satta, E T Matsuura, H Ishiwa, N Takahata, και S I Chigusa. 'Incomplete maternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*'. *Genetics* 126, no. 3 (Νοέμβριος 1990): 657-663.

- Kraytsberg, Yevgenya, Marianne Schwartz, Timothy A. Brown, Konstantin Ebralidse, Wolfram S. Kunz, David A. Clayton, John Vissing, και Konstantin Khrapko. 'Recombination of Human Mitochondrial DNA'. *Science* 304, no. 5673 (2004): 981.
- Kvist, Laura, Jochen Martens, Alexander A Nazarenko, και Markku Orell. 'Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*)'. *Molecular Biology and Evolution* 20, no. 2 (Φεβρουάριος 2003): 243-247.
- Lachaise, D, M Harry, M Solignac, F Lemeunier, V Bénassi, και M L Cariou. 'Evolutionary novelties in islands: *Drosophila santomea*, a new melanogaster sister species from São Tomé'. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 267, no. 1452 (Αύγουστος 7, 2000): 1487-1495.
- Lachaise, Daniel, Jean R. David, Françoise Lemeunier, Leonidas Tsacas, και Michael Ashburner. 'The Reproductive Relationships of *Drosophila sechellia* with *D. mauritiana*, *D. simulans*, and *D. melanogaster* from the Afrotropical Region'. *Evolution* 40, no. 2 (1986): 262-271.
- Laney, J D, και M Hochstrasser. 'Substrate targeting in the ubiquitin system'. *Cell* 97, no. 4 (Μάιος 14, 1999): 427-430.
- Lee, Won Ho, και Takao K. Watanabe. 'Evolutionary genetics of the *Drosophila melanogaster* subgroup. I. Phylogenetic relationships based on matings, hybrids and proteins.' *The Japanese journal of genetics* 62, no. 3 (1987): 225-239.
- McBride, Heidi M, Margaret Neuspiel, και Sylwia Wasiak. 'Mitochondria: more than just a powerhouse'. *Current Biology: CB* 16, no. 14 (Ιούλιος 25, 2006): R551-560.
- Miller, S A, D D Dykes, και H F Polesky. 'A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells'. *Nucleic Acids Research* 16, no. 3 (Φεβρουάριος 11, 1988): 1215.
- Moriyama, Y, και S Kawano. 'Rapid, selective digestion of mitochondrial DNA in accordance with the matA hierarchy of multiallelic mating types in the mitochondrial inheritance of *Physarum polycephalum*'. *Genetics* 164, no. 3 (Ιούλιος 2003): 963-975.
- MULLER, H J. 'The relation of recombination to mutational advance'. *Mutation Research* 106 (Μάιος 1964): 2-9.

- Neiman, Maurine, και Douglas R Taylor. 'The causes of mutation accumulation in mitochondrial genomes'. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 276, no. 1660 (Απρίλιος 7, 2009): 1201-1209.
- Nesbø, C L, M O Arab, και K S Jakobsen. 'Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*)'. *Genetics* 148, no. 4 (Απρίλιος 1998): 1907-1919.
- Nishimura, Yoshiki, Osami Misumi, Ko Kato, Noriko Inada, Tetsuya Higashiyama, Yu Momoyama, και Tsuneyoshi Kuroiwa. 'An mt(+) gamete-specific nuclease that targets mt(-) chloroplasts during sexual reproduction in *C. reinhardtii*'. *Genes & Development* 16, no. 9 (Μάιος 1, 2002): 1116-1128.
- O'Neill, S L, R Giordano, A M Colbert, T L Karr, και H M Robertson. '16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects'. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, no. 7 (Απρίλιος 1, 1992): 2699-2702.
- Passamonti, Marco, και Fabrizio Ghiselli. 'Doubly uniparental inheritance: two mitochondrial genomes, one precious model for organelle DNA inheritance and evolution'. *DNA and Cell Biology* 28, no. 2 (Φεβρουάριος 2009): 79-89.
- Piganeau, G, και A Eyre-Walker. 'A reanalysis of the indirect evidence for recombination in human mitochondrial DNA'. *Heredity* 92, no. 4 (Απρίλιος 2004): 282-288.
- Rand, David M. 'The units of selection on mitochondrial DNA'. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32, no. 1 (Νοέμβριος 2001): 415-448.
- Rokas, Antonis, Emmanuel Ladoukakis, και Eleftherios Zouros. 'Animal mitochondrial DNA recombination revisited'. *Trends in Ecology & Evolution* 18, no. 8 (Αύγουστος 2003): 411-417.
- Sagan, L. 'On the origin of mitosing cells'. *Journal of Theoretical Biology* 14, no. 3 (Μάρτιος 1967): 255-274.
- Sherengul, Wushur, Rumi Kondo, και Etsuko T Matsuura. 'Analysis of paternal transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*'. *Genes & Genetic Systems* 81, no. 6 (Δεκέμβριος 2006): 399-404.
- Shitara, H, J I Hayashi, S Takahama, H Kaneda, και H Yonekawa. 'Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA

- followed by the prevention of subsequent paternal leakage'. *Genetics* 148, no. 2 (Φεβρουάριος 1998): 851-857.
- SIMON, CHRIS, FRANCESCO FRATI, ANDREW BECKENBACH, BERNIE CRESPI, HONG LIU, και PAUL FLOORS. 'Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers'. *Annals of the Entomological Society of America* 87 (Νοέμβριος 1994): 651-701.
- Solignac, Michel, Jean Genermont, Monique Monnerot, και Jean-Claude Mounolou. 'Genetics of mitochondria in *Drosophila*: mtDNA inheritance in heteroplasmic strains of *D. mauritiana*'. *MGG Molecular & General Genetics* 197, no. 2 (1984): 183-188.
- Steinemann, M, και S Steinemann. 'Enigma of Y chromosome degeneration: neo-Y and neo-X chromosomes of *Drosophila miranda* a model for sex chromosome evolution'. *Genetica* 102-103, no. 1-6 (1998): 409-420.
- Sutovsky, P, R D Moreno, J Ramalho-Santos, T Dominko, C Simerly, και G Schatten. 'Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos'. *Biology of Reproduction* 63, no. 2 (Αύγουστος 2000): 582-590.
- Sutovsky, Peter, Ricardo D. Moreno, Joao Ramalho-Santos, Tanja Dominko, Calvin Simerly, και Gerald Schatten. 'Development: Ubiquitin tag for sperm mitochondria'. *Nature* 402, no. 6760 (1999): 371-372.
- Szmidt, Alfred E., Torsten Alden, και Jan-Erik Hallgren. 'Paternal inheritance of chloroplast DNA in *Larix*'. *Plant Molecular Biology* 9, no. 1 (1987): 59-64.
- Tamura, Koichiro, Joel Dudley, Masatoshi Nei, και Sudhir Kumar. 'MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0'. *Molecular Biology and Evolution* 24, no. 8 (Αύγουστος 2007): 1596-1599.
- Tang, Y, G Manfredi, M Hirano, και E A Schon. 'Maintenance of human rearranged mitochondrial DNAs in long-term cultured transmitochondrial cell lines'. *Molecular Biology of the Cell* 11, no. 7 (Ιούλιος 2000): 2349-2358.
- Tsaousis, A D, D P Martin, E D Ladoukakis, D Posada, και E Zouros. 'Widespread recombination in published animal mtDNA sequences'. *Molecular Biology and Evolution* 22, no. 4 (Απρίλιος 2005): 925-933.

- Ujvari, Beata, Mark Downton, και Thomas Madsen. 'Mitochondrial DNA recombination in a free-ranging Australian lizard'. *Biology Letters* 3, no. 2 (Απρίλιος 22, 2007): 189-192.
- Ursprung, H, και E Schabtach. 'Fertilization in tunicates: loss of the paternal mitochondrion prior to sperm entry'. *The Journal of Experimental Zoology* 159, no. 3 (Αύγουστος 1965): 379-383.
- White, Daniel James, Jonci Nikolai Wolff, Melanie Pierson, και Neil John Gemmell. 'Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance'. *Molecular Ecology* 17, no. 23 (Δεκέμβριος 2008): 4925-4942.