

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστήμων Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας

ΚΟΝΤΟΠΟΥΛΟΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ

**ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ  
ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ (*Bactrocera oleae*) ΜΕ ΤΗΝ ΜΕΘΟΔΟ SSCP.**



ΛΑΡΙΣΑ 2010

Μέλη τριμελούς επιτροπής

- Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Αυγουστίνος Αντώνης, Διδάσκων ΠΔ/407 Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

## Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ματθιόπουλου Κωνσταντίνο για την πολύτιμη βοήθεια και την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου, γιατί αναθέτοντάς μου το συγκεκριμένο ερευνητικό έργο, μου πρόσφερε την ευκαιρία να αποκτήσω την σημαντική αυτή εργαστηριακή εμπειρία.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον υποψήφιο διδάκτορα Ζυγουρίδη Νίκο για την πολύτιμη βοήθεια και τις συμβουλές του σε όλη την διάρκεια της διεξαγωγής των πειραμάτων, καθώς και για την αμέριστη συνεργασία του.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον διδάσκοντα ΠΔ/407 κ. Αυγουστίνο Αντώνη για την βοήθειά του.

Τέλος ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου, την διδάκτορα Κακάνη Ευδοξία, την υποψήφια διδάκτορα Τσουμάνη Κωνσταντίνα και την προπτυχιακή φοιτήτρια Γρηγορίου Μαριλένα για τις χρήσιμες συμβουλές τους και το φιλικό κλίμα συνεργασίας.

## Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη.....	6
1. Εισαγωγή .....	7
1.1 Ο Δάκος της ελιάς.....	7
1.1.1 Συστηματική κατάταξη .....	7
1.1.2 Περιγραφή του εντόμου .....	7
1.1.3 Προέλευση και εξάπλωση του είδους .....	8
1.1.4 Οικονομική σημασία .....	9
1.1.5 Βλαβερές συνέπειες.....	10
1.1.6 Αντιμετώπιση του Δάκου .....	10
1.2 Πληθυσμιακή ανάλυση .....	11
1.2.1 Γενετική ποικιλότητα.....	11
1.2.2 Γονιδιακή ροή και ρυθμός μετανάστευσης .....	11
1.2.3 Γενετικοί δείκτες.....	12
1.2.4 Τεχνικές .....	14
1.2.5 Μικροδορυφόροι .....	15
1.2.6 Μιτοχονδριακό DNA.....	16
Σκοπός .....	18
2.Υλικά & Μέθοδοι.....	19
2.1 Προέλευση δειγμάτων .....	19
2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα δάκου, με χρήση Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).....	20
2.3 Ενίσχυση μιτοχονδριακών γενετικών τόπων. ....	21
Μέθοδος.....	21
2.4 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου.....	22
2.5 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων.....	23

2.6 Εμφάνιση πηκτώματος.....	24
2.7 Ανάλυση δεδομένων .....	24
2.7.1 POPGENE .....	24
2.7.2 PHYLIP. TreeView.....	25
2.7.3 STRUCTURE.....	26
2.7.4 MDS .....	26
Παράρτημα χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων.....	27
3 Αποτελέσματα .....	28
3.1 Εμφανιζόμενοι απλότυποι .....	28
3.2 Εμφανιζόμενες συχνότητες.....	29
3.3 Κλαδόγραμμα φυλλογεωγραφικών σχέσεων.....	31
3.4 Ανάλυση structure.....	32
3.5 Multi Dimensional Scaling Analysis .....	33
4. Συμπεράσματα-Συζήτηση.....	35
Βιβλιογραφία .....	37

## Περίληψη

Ο δάκος είναι το πλέον καταστροφικό παράσιτο της ελιάς. Είναι είδος ενδημικό στην Μεσογειακή λεκάνη και τη Μέση Ανατολή και η εξάπλωσή του ακολουθεί την εξάπλωση της καλλιέργειας της ελιάς, ενώ την τελευταία εικοσαετία έχει εισβάλει και στην Αμερικανική ήπειρο. Δεδομένου των δυσμενών επιπτώσεων του εντόμου στη γεωργία και την οικονομία, είναι μεγάλης σημασίας η κατανόηση του τρόπου εξάπλωσής του αλλά και η εύρεση της πηγής της εξάπλωσης αυτής. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να υιοθετηθούν μέτρα πρόληψης όπως η καραντίνα και ο ορθολογικός και ο αποτελεσματικός φυτοϋγειονομικός έλεγχος. Προηγούμενες μελέτες εντοπίζουν την πηγή της εισβολής του δάκου στην Αμερικανική ήπειρο στην περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου.

Η παρούσα εργασία συνεχίζει το έργο των μελετών αυτών διερευνώντας τη δομή των φυσικών πληθυσμών του δάκου, *Bactrocera oleae* βασιζόμενη σε μιτοχονδριακούς γενετικούς τόπους. Η ανίχνευση των πολυμορφισμών πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο SSCP. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την ύπαρξη τριών υποπληθυσμών του *Bactrocera oleae* στη Μεσόγειο και καταδεικνύουν ως πιθανή περιοχή προέλευσης της εισβολής του δάκου στην Καλιφόρνια τον υποπληθυσμό της Ανατολικής Μεσογείου (Ισραήλ & Κύπρος).

# 1. Εισαγωγή

## 1.1 Ο Δάκος της ελιάς

### 1.1.1 Συστηματική κατάταξη

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* (παλαιότερη ονομασία: *Dacus oleae*), είναι ένα έντομο που ανήκει στην οικογένεια Tephritidae (τάξη: Δίπτερα). Η συστηματική του κατάταξη είναι η ακόλουθη:

Ομοταξία: Έντομα

Τάξη: Diptera

Οικογένεια: Tephritidae

Υποοικογένεια: Dacinae

Φυλή: Dacini

Γένος: Bactrocera

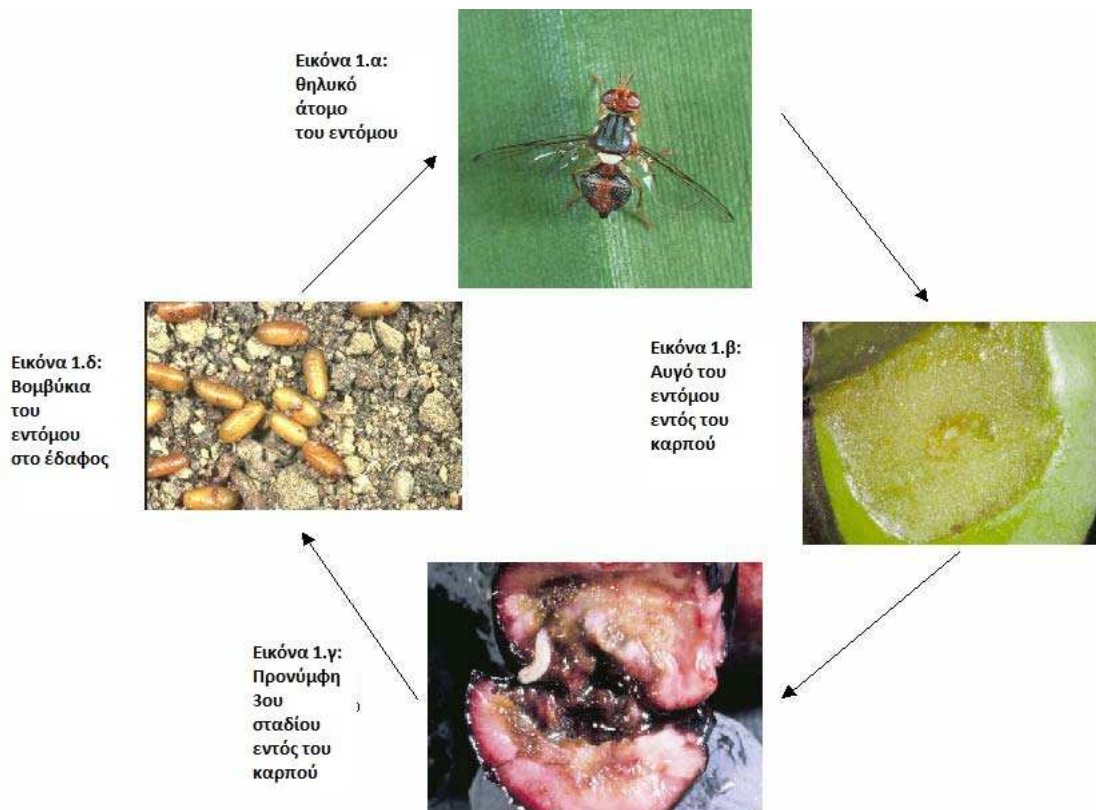
Είδος: oleae

Η οικογένεια των Tephritidae είναι μεγάλης σημασίας στην γεωργία, καθώς πολλά είδη που ανήκουν στην οικογένεια προκαλούν σημαντικές ζημιές σε φρούτα και άλλες καλλιέργειες. Πιό συγκεκριμένα το γένος *Bactrocera* περιλαμβάνει 28 υπογένη και περισσότερα από 500 διαφορετικά είδη (Drew et al., 2002). Ένα από αυτά τα είδη είναι και το *Bactrodera oleae* που αποτελεί το σημαντικότερο παράσιτο του καρπού της ελιάς (Bueno et al., 2002).

### 1.1.2 Περιγραφή του εντόμου

Το ενήλικο άτομο είναι μια μύγα μήκους 4-5 mm και με άνοιγμα πτερύγων 12 mm (Εικόνα 1.α). Το κεφάλι είναι κοκκινωπό προς κίτρινο, με πιο απαλή απόχρωση στο μπροστινό μέρος και έχει δύο μαύρα σημάδια πάνω από τις κεραίες. Ο θώρακας είναι επίσης κοκκινωπός προς το κίτρινο και χαρακτηρίζεται από τέσσερις κάθετες γκρι ζώνες. Η κοιλιά έχει το ίδιο χρώμα με το κεφάλι στην κεντρική της περιοχή, προς τα πλάγια όμως αποκτά μαύρο χρώμα. Στα θηλυκά άτομα, η κοιλιά καταλήγει σε ωοαποθέτη, μαύρου χρώματος και μεγάλου μήκους. Τα φτερά είναι διαφανή και έχουν από μία μαύρη κηλίδα στο άκρο τους. Τα πόδια είναι ιδίου χρώματος με το κεφάλι. Το αυγά του είναι άσπρου χρώματος, επιμήκη, με μήκος 0,7 mm και διάμετρο 0,2 mm (Εικόνα 1.β). Η προνύμφη είναι λευκόχρωμη. Προς το τέλος της ανάπτυξής της έχει μήκος 7 mm, το κεφάλι της είναι τραπεζοειδές και στο πρόσθιο άκρο της φέρει δύο τριμερείς κεραίες (Εικόνα 1.γ). Το βομβύκιο είναι ωοειδές, το χρώμα του ποικίλει από απαλό κίτρινο ως καφέ και το μήκος του είναι 4-4,5 mm περίπου (Εικόνα 1.δ).

Ο δάκος είναι ένα ολομετάβολο έντομο, το στάδιο του αυγού ακολουθούν τρία προνυμφικά, με την πάροδο των οποίων πραγματοποιείται η μεταμόρφωση σε νύμφη και με την δεύτερη μεταμόρφωση προκύπτει το ενήλικο άτομο.



Εικόνα 1. Βιολογικός κύκλος του *Bactrocera oleae*

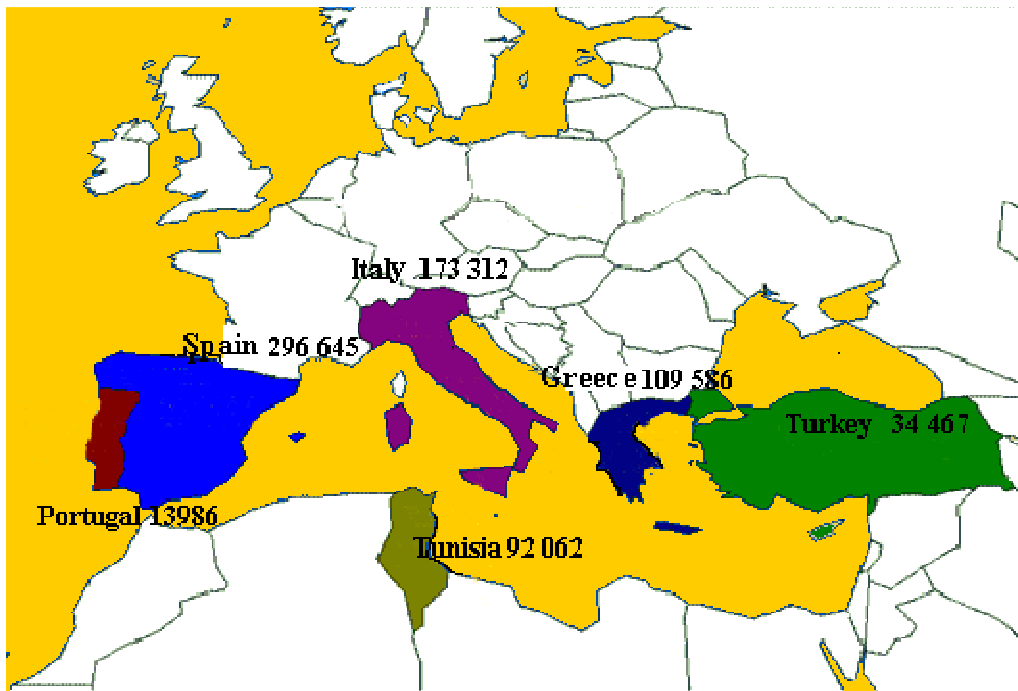
### 1.1.3 Προέλευση και εξάπλωση του είδους

Ο δάκος της ελιάς είναι ενδημικός καθ' όλη την έκταση της καλλιέργειας της ελιάς και για αυτό απαντάται σε όλες τις μεσογειακές χώρες όπου κυρίως συναντάται αυτή η καλλιέργεια. Εκτείνεται από την Ινδία έως τις Κανάριες νήσους και τα τελευταία χρόνια η καλλιέργεια της ελιάς έχει εξαπλωθεί και σε άλλες περιοχές, όπως στη Βόρεια και Κεντρική Αμερική (Καλιφόρνια, Αριζόνα, Μεξικό και Ελ Σαλβαδόρ), στη Νότια Αμερική (Αργεντινή, Χιλή, Περού, Ουρουγουάη), στην κεντρική Ασία (Κίνα) και την Αυστραλία. Ο δάκος της ελιάς έχει εισβάλλει σε όλες αυτές τις περιοχές πλην της Αυστραλίας (Πίνακας 1) (Rice, 2000). Στην Εικόνα 2 φαίνονται οι περιοχές καλλιέργειας στην Μεσόγειο.

Albania	Israel	Sardinia
Algeria	Italy	South Africa
Canary Islands	Jordan	Spain
Corsica	Lebanon	Syria
Cyprus	Libya	Tunisia
Egypt	Mexico	Turkey
Eritrea	Morocco	United States
France	Pakistan	Yugoslavia
Greece	Portugal	

Πίνακας 1. Παγκόσμια εξάπλωση του *Bactrocera oleae*



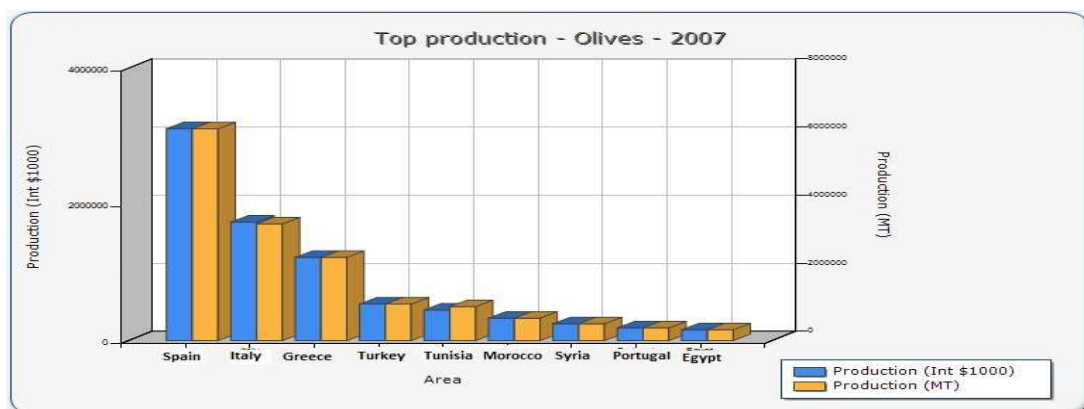


Εικόνα 2. Οι χώρες με τις μεγαλύτερες εξαγωγές σε ελαιόλαδο στη Μεσόγειο (Πηγή: UNCTAD με δεδομένα από FAO)

### 1.1.4 Οικονομική σημασία

Ο δάκος της ελιάς είναι ένα έντομο εξαιρετικής οικονομικής σημασίας, καθώς είναι το κύριο παράσιτο του ελαιοκάρπου, που είναι σημαντική διατροφική πηγή και πρώτη ύλη για προϊόντα υψηλής οικονομικής σημασίας. Συνεπώς η οικονομική σημασία του εντόμου είναι συνυφασμένη με αυτή της ελιάς.

Η ελαιοκαλλιέργεια έχει την μεγαλύτερη επεκτασιμότητα στο κόσμο. Η καλλιεργήσιμη έκταση τριπλασιάστηκε από 26.000 km<sup>2</sup> σε 85.000 km<sup>2</sup> μεταξύ 1960 και 2004. Οι δέκα μεγαλύτερες παραγωγές χώρες, φαίνονται στο γράφημα της Εικόνας 3 (FAOSTAT 2007). Στην Ελλάδα η ελιά καλλιεργείται σχεδόν σε όλα τα διαμερίσματα, κυρίως όμως σε Πελοπόννησο, Κρήτη και Μυτιλήνη.



Εικόνα 3. Οι δέκα μεγαλύτερες ελαιοπαραγωγές χώρες (πηγή FAOSTAT)

### **1.1.5 Βλαβερές συνέπειες**

Ο δάκος προσβάλει τα ελαιόδεντρα προκαλώντας κυρίως ποσοτικές αλλά και ποιοτικές απώλειες. Η αρχή πραγματοποιείται με την πρόκληση οπών στο περικόρπιο από τα θηλυκά άτομα κατά την διάρκεια της ωοτοκίας. Τα νύγματα που δημιουργούνται είναι εναρκτήρια σημεία δευτερογενών μολύνσεων από μικροοργανισμούς και μύκητες. Η είσοδος των μυκήτων αλλοιώνει την εμφάνιση της ελιάς και υποβαθμίζει την εμπορική της αξία. Η κύρια ζημιά που προκαλεί το έντομο στον καρπό συντελείται κατά στο προνυμφικό στάδιο του εντόμου. Οι προνύμφες οι οποίες εκκολάπτονται και αναπτύσσονται αποκλειστικά εντός του καρπού χρησιμοποιούν ως διατροφική πηγή τους ιστούς του μεσοκαρπίου. Τα περιττώματα της προνύμφης καθώς και η σήψη από την είσοδο βακτηρίων και μυκήτων υποβαθμίζουν και ποιοτικά τον καρπό. Η αποσύνθεση του καρπού προκαλεί αύξηση της οξύτητας του λαδιού και το κάνει να έχει οσμή χύματος. Το τελικό αποτέλεσμα όλων αυτών είναι μια ετήσια απώλεια της τάξης του 15% της παραγωγής, που αντιστοιχεί σε 800 εκατομμύρια δολάρια ετησίως (Montiel Bueno & Jones, 2002), χωρίς να συνυπολογίσουμε τις επιπτώσεις στα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά του λαδιού.

### **1.1.6 Αντιμετώπιση του Δάκου**

Η πληθυσμιακή παρακολούθηση με παγίδες McPhail είναι αυτή που θα δώσει τα στοιχεία για την σωστή στιγμή επέμβασης για την καταπολέμηση του δάκου. Το όριο για επέμβαση και καταπολέμηση του εντόμου με ψεκασμούς είναι οι 5 συλλήψεις ανά πενθήμερο. Πάνω από αυτό το όριο η επέμβαση πρέπει να είναι άμεση. Πάντως οι συσχέτιση μεταξύ συλλήψεων στην παγίδα και προσβολής στον καρπό δεν είναι ακριβής και εξαρτάται από την συγκεκριμένη περιοχή και την ποικιλία της ελιάς για συγκεκριμένες κλιματολογικές συνθήκες. (ΓΙΑΜΒΡΙΑΣ ΧΡΗΣΤΟΣ, 1998)

## 1.2 Πληθυσμιακή ανάλυση

Η ανάλυση των φυσικών πληθυσμών μπορεί να δώσει απαντήσεις σε σημαντικά ερωτήματα της οικολογίας ενός είδους. Μπορεί να μας διαφωτίσει σχετικά με την καταγωγή του και την πορεία εξάπλωσης του στο χώρο και το χρόνο. Η εξακρίβωση επίσης των εξελικτικών σχέσεων μεταξύ των πληθυσμών οικονομικής σημασίας ενός είδους, μπορεί να διευκολύνει την διαχείρισή τους. Στο τομέα των παρασιτικών εντόμων, μπορεί να διαπιστώσει αν υπάρχει γονιδιακή ροή μεταξύ ατόμων που ζουν σε διαφορετικές περιοχές και να εξακριβωθεί έτσι το κατά πόσο υπάρχουν φαινόμενα μετανάστευσης και να εντοπιστεί η περιοχή από την οποία προήλθαν αρχικά αυτοί οι πληθυσμοί. Βασική προϋπόθεση για την γενετική διερεύνηση των παραπάνω φαινομένων είναι η ύπαρξη γενετικής ποικιλότητας μεταξύ των πληθυσμών.

### 1.2.1 Γενετική ποικιλότητα

Προκειμένου να μελετήσουμε την δομή ενός πληθυσμού είναι απαραίτητο να υπολογίσουμε και να μελετήσουμε τον βαθμό της γενετικής ποικιλότητας. Η γενετική ποικιλότητα τόσο εντός όσο και μεταξύ των πληθυσμών, προκύπτει ως αποτέλεσμα της δράσης των μεταλλάξεων. Η τύχη των νέων μεταλλάξεων εξαρτάται από το μέγεθος του πληθυσμού, καθώς όσο μεγαλύτερος είναι ένας πληθυσμός τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα η μετάλλαξη αυτή να διατηρηθεί από γενιά σε γενιά και να μη χαθεί λόγω της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης. Κύρια μεγέθη για τον προσδιορισμό της γενετικής ποικιλότητας ενός πληθυσμού, δηλαδή του βαθμού πολυμορφισμού μεταξύ των ατόμων του, είναι ο πραγματικός αριθμός αλληλομόρφων  $n_a$ , ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων  $n_e$ , η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία  $H_o$  και η αναμενόμενη ετεροζυγωτία  $H_e$ . (T. BeeBee & G. Rowe, 2004)

### 1.2.2 Γονιδιακή ροή και ρυθμός μετανάστευσης

Η γονιδιακή ροή είναι η ανταλλαγή γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών. Η γονιδιακή ροή αν είναι εκτεταμένη τείνει να μειώσει την γενετική ποικιλότητα, εξισώνοντας τις γονιδιακές δεξαμενές δυο διαφορετικών πληθυσμών ή υποπληθυσμών. Το βασικό μέγεθος που χρησιμοποιείται για να απαντήσει σε ερωτήματα γονιδιακής ροής είναι το  $F_{statistics}$ . Εδώ θα πρέπει να διαχωριστεί η γονιδιακή ροή από το ρυθμό μετανάστευσης, καθώς η πρώτη αντικατοπτρίζει την ανταλλαγή γενοτύπων, κάτι που δεν απαιτεί πάντοτε την ανταλλαγή ατόμων. Η μετανάστευση από την άλλη δεν επηρεάζει πάντοτε την γονιδιακή ροή εάν κανένα άτομο που μεταναστεύει δεν αναπαραχθεί στον προορισμό του. Ο ρυθμός μετανάστευσης που αντικατροπτίζει το μέσο αριθμό των επιτυχημένα αναπαραχθέντων μεταναστών  $N_m$ , προσδιορίζεται από το  $F_{st}$  με τον ακόλουθο τύπο:  $N_m=0.25(1/F_{st}-1)$ . (T. BeeBee & G. Rowe, 2004).

### **1.2.3 Γενετικοί δείκτες**

Πρόκειται για κληρονομούμενους χαρακτήρες, οι οποίοι διαθέτουν πολλές διαφορετικές μορφές ο καθένας. Ένας τυπικός διπλοειδής οργανισμός μπορεί να διαθέτει δύο διαφορετικές μορφές (αλληλόμορφα) για κάθε χαρακτήρα (γενετικό τόπο). Όλοι οι γενετικοί δείκτες αντανakλούν διαφορές στην αλληλουχία του DNA (Sunpuks, 2000). Οι γενετικοί δείκτες έχουν επικρατήσει καθώς με την χρήση τους μπορούμε να πάρουμε απαντήσεις στο ερώτημα που μας ενδιαφέρει αξιόπιστα και σχετικά προσιτά με τις σημερινές μεθόδους μοριακής βιολογίας.

#### **1.2.3.1 Κυριότεροι γενετικοί δείκτες**

Οι κυριότεροι δείκτες είναι είτε μιτοχονδριακής προέλευσης είτε πυρηνικής. Το μιτοχονδριακό DNA χρησιμοποιείται είτε απ' ευθείας για αλληλούχιση είτε σε τμήματα ως RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms). Δείκτες που αντανakλούν γενετική ποικιλομορφία στους πυρηνικούς γενετικούς τόπους είναι οι μικροδορυφόροι, τα RAPDs (Randomly amplified polymorphic DNA), AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) και τα πυρηνικά RFLPs (Roderick, 2004).

##### **RFLPs**

Ένζυμα περιορισμού του DNA αναγνωρίζουν συγκεκριμένες αλληλουχίες του DNA και καταλύουν ενδονουκλεοτιδικές διασπάσεις, παράγοντας τμήματα συγκεκριμένου μήκους. Τα τμήματα περιορισμού μπορούν να απεικονιστούν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης, όπου διαχωρίζονται βάσει του μεγέθους τους. Οι διαφορές μεταξύ ατόμων στο μήκος συγκεκριμένων περιοριστικών τμημάτων αντανakλούν γενετυπικές διαφορές. Έχουν χρησιμοποιηθεί σε πληθώρα γενετικών αναλύσεων και στην κατασκευή γενετικών χαρτών. (Botstein D. et. al, 1980).

##### **AFLPs**

Τα AFLP προκύπτουν από την επιλεγμένη PCR ενίσχυση περιοριστικών τμημάτων από ένα σύνολο γενωμικού DNA, το οποίο έχει επεξεργαστεί με ένζυμα περιορισμού (Vos P., 1995). Τα AFLPs έχουν πολλά πλεονεκτήματα συγκρινόμενα με άλλους δείκτες όπως τα RAPDs και τα RFLPs όπως υψηλότερη αναπαραγωγιμότητα, ανάλυση και ευαισθησία στο σύνολο του γονιδιώματος συγκρινόμενα με άλλες τεχνικές (Mueller UG, 1999). Έχουν επίσης την ικανότητα να ενισχύουν μεταξύ 50 και 100 τμημάτων σε κάθε εφαρμογή (Meudt HM, 2007). Έτσι τα AFLP έχουν γίνει εξαιρετικά χρήσιμα σε οργανισμούς όπως βακτήρια, μύκητες και φυτά όπου δεν είναι ακόμα πολλά γνωστά σχετικά με το γενωμικό περιεχόμενό τους.

##### **RAPDs**

Τα RAPDs είναι τμήματα DNA τα οποία έχουν παραχθεί με PCR ενίσχυση τυχαίων τμημάτων γενωμικού DNA με έναν εκκινητή τυχαίας αλληλουχίας. Τα RAPDs όπως και τα AFLPs ανήκουν στους επικρατείς (Dominant) δείκτες.

### **SNPs**

Τα SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) όπως υποδηλώνει και το ακρωνύμιο τους είναι μια αλλαγή σε μια βάση στην αλληλουχία του DNA. Τα SNPs προέκυψαν από την ανάγκη για γενετικούς δείκτες οι οποίοι θα παρείχαν υψηλή πυκνότητα πληροφορίας (Vignal A., 2002).

### **Μικροδορυφόροι**

Η μικροδορυφόροι είναι περιοχές του DNA που αποτελούνται από δι-, τρι-, ή τετρά-, νουκλεοτιδικές επαναλήψεις παραταγμένες η μία μετά την άλλη (Wright, 1993, 1994; Park and Moran, 1994). Ο υψηλός ρυθμός μεταλλάξεων σε αυτές τις μικροδορυφορικές περιοχές οδηγεί σε εκτεταμένη ποικιλία αλληλομόρφων και υψηλά επίπεδα ετεροζυγωτίας.

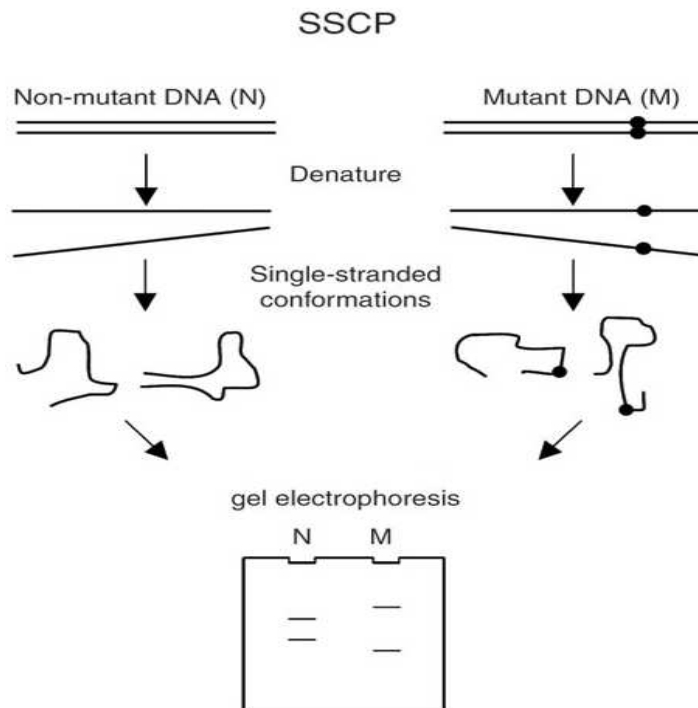
### **Πυρηνικοί ή μιτοχονδριακοί δείκτες;**

Οι μικροδορυφόροι είναι πυρηνικοί, συνεπικρατείς γενετικοί τόποι, με υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και είναι ιδιαίτερα πληροφοριακοί για πρόσφατα πληθυσμιακά φαινόμενα, όπως βιολογικές εισβολές. Αντίθετα, φυλογεωγραφικές μελέτες των μητρικά κληρονομούμενων μιτοχονδριακών απλότυπων, παρέχουν μια βαθύτερη ιστορική προοπτική, που συχνά περιλαμβάνει και εξελικτικές διαδικασίες (Avisé 1994, 2000).

## 1.2.4 Τεχνικές

### Πολυμορφισμός στερεοδιαμόρφωσης μονής αλυσίδας DNA (SSCP)

Με την μέθοδο SSCP μπορούν να ανιχνευθούν γρήγορα και αποτελεσματικά αλλαγές βάσεων σε δεδομένες αλληλουχίες DNA. Η τεχνική βασίζεται στο ότι αλληλουχίες DNA μπορούν να ενισχυθούν, να σημανθούν και η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα εξαρτάται όχι μόνο από το μέγεθός τους αλλά και από την αλληλουχία τους (Orita et.al, 1989). Η μέθοδος είναι απλή, γρήγορη και αποτελεσματική. Στα θετικά της συγκαταλέγεται ότι δεν απαιτούνται ένζυμα περιορισμού ή τεχνικές υβριδισμού. Προϋπόθεση για την εφαρμογή της είναι υπάρχουν ενισχυτές για την περιοχή ενίσχυσης. Με την μέθοδο αυτή έχουμε μια γρήγορη και οικονομική αποτύπωση των επιθυμητών SNPs.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου, (πηγή Gasser R., 2007)

### 1.2.5 Μικροδορυφόροι

Όπως προαναφέρθηκε, το μικροδορυφορικό DNA είναι επαναλαμβανόμενο DNA και περιλαμβάνει επαναλήψεις (5-50) ενός μοτίβου, που αποτελείται από 1-6 βάσεις. Έχουν ανιχνευθεί στο γονιδίωμα κάθε οργανισμού που έχει βρεθεί έως τώρα (Bruford et al., 1993). Αποτελούν πολύ χρήσιμα εργαλεία τόσο για πληθυσμιακές αναλύσεις όσο και για χαρτογράφηση γονιδίων. Το μεγάλο πλεονέκτημα των μικροδορυφόρων είναι ότι μας επιτρέπουν να ανιχνεύσουμε πολύ μικρές διαφορές μεταξύ ατόμων εξαιτίας του υψηλού πολυμορφισμού που παρουσιάζουν, είναι άφθονοι και διάσπαρτοι στα γονιδιώματα, κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες Μενδελικοί δείκτες, αναλύονται εύκολα με χρήση της τεχνικής PCR, γεγονός που σημαίνει ότι είναι απαραίτητη σχετικά μικρή αρχική ποσότητα DNA.

Στο δάκο της ελιάς έχει πραγματοποιηθεί απομόνωση μικροδορυφορικών δεικτών (Augustinos et al., 2002). Ακολούθησε μια πιο εκτεταμένη ανάλυση με δώδεκα μικροδορυφορικούς τύπους και μέγεθος δείγματος 671 ατόμων, στην οποία έγινε διαχωρισμός του πληθυσμού της Μεσογείου σε τρεις υποπληθυσμούς (Δυτικής, Κεντρικής και ανατολικής Μεσογείου). Παράλληλα, η συσχέτιση ετεροζυγωτίας και γεωγραφικής θέσης υπέδειξε ότι η εξάπλωση του εντόμου ιστορικά έγινε από περιοχές της δυτικής Μεσογείου προς περιοχές της ανατολικής (Augustinos et al., 2005). Πληθυσμιακή ανάλυση του δάκου με την χρήση μικροδορυφόρων πραγματοποιήθηκε και από τους Nardi et al., 2005, όμως δεν διαπίστωσε σημαντική διαφοροποίηση μέσα στον πληθυσμό της Μεσογείου.

Επίσης, η διερεύνηση της περιοχής εισβολής του δάκου στην Καλιφόρνια, κατέδειξε τη συγγένεια των δειγμάτων από την Αμερική με αυτά της Μεσογείου (Nardi et al., 2005). Η άποψη αυτή ισχυροποιήθηκε από μια επόμενη μελέτη (Zygouridis et al., 2009) στην οποία αναλύθηκαν δέκα μικροδορυφορικοί τύπων σε περίπου 800 δείγματα και διαπιστώθηκε πως η περιοχή προέλευσης του δάκου στην Καλιφόρνια είναι η ανατολική Μεσόγειος (Ισραήλ και Κύπρος). Παραμένει ασαφές αν η εισβολή έγινε μια φορά ή αν υπήρξαν πολλαπλές εισβολές μετά την πρώτη παρατήρηση δάκου στην Καλιφόρνια το 1998.





Μιτοχονδριακό DNA για πληθυσμιακή ανάλυση του δάκου έχει χρησιμοποιηθεί, συγκεκριμένα αλληλουχήθηκε το γονίδιο που κωδικοποιεί για τη μικρή υπομονάδα της NADH αφυδρογονάσης σε 93 δείγματα από περιοχές της μεσογείου, της Αφρικής, της Αμερικής και το Πακιστάν (Nardi et al., 2005). Συνολικά ανιχνεύθηκαν 22 διαφορετικοί απλότυποι και οι πληθυσμοί περιείχαν από ένα έως έξι διαφορετικούς απλότυπους. Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν την κατανομή των απλοτύπων σε τρεις γενετικές ομάδες. Η μια περιλαμβάνει απλοτύπους δειγμάτων από την Αφρική και το Πακιστάν. Στις άλλες δυο ομάδες περιλαμβάνονται απλότυποι δειγμάτων από την Μεσόγειο και την Αμερική.

Η πληθυσμιακή ανάλυση του δάκου βάση μικροδορυφόρων (Augustinos et al., 2005) διαχώρισε τον πληθυσμό της Μεσογείου σε τρεις υποπληθυσμούς σε αντίθεση με την ανάλυση των μιτοχονδριακών τόπων (Nardi et al., 2005), η οποία τον διαχώρισε σε δυο. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο μικρότερο αριθμό ατόμων της δεύτερης μελέτης.

## **Σκοπός**

Όπως προαναφέρθηκε οι προηγούμενες πληθυσμιακές αναλύσεις του δάκου της ελιάς που βασίστηκαν στο μιτοχονδριακό DNA αφορούσαν αλληλούχιση μεγάλων τμημάτων mtDNA αλλά μικρού αριθμού ατόμων. Στην παρούσα μελέτη γίνεται πληθυσμιακή ανάλυση του δάκου της ελιάς με χρήση της μεθόδου SSCP στο μόριο του mtDNA. Λόγω των πλεονεκτημάτων που προαναφέρθηκαν, μέσω της μεθόδου αυτής μπορεί εύκολα και με μικρό κόστος να αναλυθεί πολύ μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων.

Εξαιτίας των καταστρεπτικών επιπτώσεων του δάκου στην καλλιέργεια της ελιάς η εξάπλωσή του είναι ανεπιθύμητη. Μελέτες όπως η παρούσα συνεισφέρουν στον καλύτερο σχεδιασμό στρατηγικών αντιμετώπισης ώστε να αποφευχθεί περεταίρω εξάπλωση. Επίσης, προσφέρουν μια ευκαιρία καλύτερης κατανόησης της βιολογίας, της γενετικής δομής και της γεωγραφικής ποικιλότητας του. Όλα αυτά συνεισφέρουν σημαντικά στην υιοθέτηση προληπτικών μέτρων όπως η καραντίνα ορθολογικός και ο αποτελεσματικός φυτο-ϋγειονομικός έλεγχος.

## 2.Υλικά & Μέθοδοι

### 2.1 Προέλευση δειγμάτων

Η παρούσα μελέτη βασίσθηκε στην ανάλυση μιτοχονδριακού DNA από φυσικούς πληθυσμούς δάκου (*Bactrocera oleae*). Η προέλευση των δειγμάτων που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζεται στον Πίνακα 2.

A/A	Χώρα προέλευσης	Περιοχή συλλογής	Μέγεθος δείγματος
1	Ελλάδα	Πήλιο	30
2	Ελλάδα	Χανιά	30
3	Ισπανία	Cordoba	30
4	Ισπανία	Madrid	30
5	Ιταλία	Farfa	30
6	Ιταλία	Vasto	30
7	Πορτογαλία	Gimmaraes	30
8	Πορτογαλία	Lisbon	30
9	Μαρόκο	Ourika	30
10	Κροατία	Split	30
11	Τυνησία	Τυνησία	18
12	Γαλλία	Corsica_Lumio	30
13	Νότια Αφρική	Νότια Αφρική	23
14	Η.Π.Α(Καλιφόρνια)	Napa	30
15	Η.Π.Α(Καλιφόρνια)	San Diego	30
16	Η.Π.Α(Καλιφόρνια)	Solano Vacaville	30
17	Η.Π.Α(Καλιφόρνια)	Calaveras	30
18	Η.Π.Α(Καλιφόρνια)	San Luis Obispo	30
19	Η.Π.Α(Καλιφόρνια)	Yolo Davis	30
20	Κύπρος	Μαζωτός	30
21	Ισραήλ	Sde Boker	18

Πίνακας 2. Προέλευση των δειγμάτων

## **2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα δάκου, με χρήση Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)**

Η απομόνωση του γονιδιωματικού και μιτοχονδριακού DNA πραγματοποιείται με παραλλαγή του πρωτοκόλλου που δίδεται από την παρασκευάστρια εταιρεία.

1. Ένα ενήλικο άτομο δάκου τοποθετείται σε σωληνάκι τύπου erpendorf, το οποίο περιέχει Διάλυμα Λύσης Πυρήνων (400μl, Nuclei Lysis Solution).
2. Το έντομο ομογενοποιείται με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου και το ομογενοποίημα επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 25 λεπτά.
3. Το διάλυμα ψύχεται σε θερμοκρασία δωματίου, προστίθεται Διάλυμα Κατακρήμνισης Πρωτεϊνών (135μl, Protein Precipitation Solution) και ύστερα από ισχυρή ανάδευση επωάζεται σε πάγο για 5 λεπτά.
4. Το μείγμα φυγοκεντρείται σε 14,000g για 5 λεπτά και το υπερκείμενο συλλέγεται σε νέο σωληνάκι τύπου erpendorf.
5. Προστίθεται ισοπροπανόλη (400μl) και μετά από ήπια ανάδευση ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 14,000g για 5 λεπτά.
6. Το υπερκείμενο απομακρύνεται, προστίθεται στο ίζημα παγωμένη αιθανόλη 70% (500μl) και φυγοκεντρείται σε 14,000g για 2 λεπτά.
7. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και ακολουθεί ξήρανση του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου.
8. Το ίζημα ενυδατώνεται με την προσθήκη Διαλύματος Ενυδάτωσης DNA (100μl, DNA Rehydration Solution) και επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 1 ώρα.
9. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20°C.

## 2.3 Ενίσχυση μιτοχονδριακών γενετικών τόπων.

Η υψηλή εξειδίκευση και αποδοτικότητα της PCR την καθιστούν ως την ιδανική μέθοδο για την ενίσχυση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA (Michael Innis et al., 2004). Το γεγονός ότι η PCR είναι ιδανική για την ενίσχυση τμήματος DNA οφείλεται στην υψηλή εξειδίκευση του βήματος του υβριδισμού των εκκινητών, η οποία με τη σειρά της οφείλεται στις υψηλές θερμοκρασίες στις οποίες είναι δυνατόν να πραγματοποιηθεί η PCR λόγω της χρήσης Taq DNA πολυμεράσης (Saiki et al. 1988).

### Υλικά

Buffer, MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Taq DNA Polymerase (PCR kit της Bioline®), DNA στόχος, dH<sub>2</sub>O, ζεύγη εκκινητών 12S mtDNA και COII mtDNA,

### Μέθοδος

Για κάθε μιτοχονδριακό γενετικό τόπο, πραγματοποιήθηκε PCR τελικού όγκου 10μl. Σε κάθε αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν περίπου 10ng DNA. Στον πίνακα που ακολουθεί παραθέτονται οι τελικές συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων.

Αντιδραστήριο	Αρχικές συγκεντρώσεις (Stock solutions)	Τελικές συγκεντρώσεις
Buffer	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	50mM	1,5mM
dNTPs	10mM (total)	0,4mM (total)
Primer F	100μM	1μM
Primer R	100μM	1μM
Taq	5 U	0,25 U

Πίνακας 3

Επίσης οι αλληλουχίες των ζευγών των εκκινητών δίνονται στον Πίνακα 4.

Κωδική ονομασία	Αλληλουχία	Μήκος (bp)
12S-SSCP-F	5'-AACAAATTCAAGCGAGGTTC-3'	306
12S-SSCP-R	5'-GCGGTTATACAAATAATGCG-3'	
COII-SSCP-F	5'-TACAAACCGAAATCTCCTCC-3'	371
COII-SSCP-R	5'-CATCTACTTTTACGCCTAGAGC-3'	

Πίνακας 4. Αλληλουχίες των εκκινητών

Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε σε συσκευή PCR της BIORAD® σε συνθήκες που δίνονται στον Πίνακα 5 που ακολουθεί.

Στάδιο	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος
Αρχική αποδιάταξη	94	4 min
Αποδιάταξη	94	30 sec
Υβριδοποίηση εκκινητών	51-53*	30 sec
Επιμήκυνση	72	30 sec
Τελική επιμήκυνση	72	5 min

} 30 κύκλοι

Πίνακας 5. Συνθήκες PCR

\* Για την ενίσχυση του γενετικού τόπου του 12S mtDNA η θερμοκρασία υβριδοποίησης του αντίστοιχου ζεύγους εκκινητών ήταν 51° C ενώ για το ζεύγος εκκινητών COII mtDNA ήταν 53° C.

## 2.4 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

Το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σχηματίζεται με βινυλ – πολυμερισμό μονομερούς ακρυλαμιδίου, που οδηγεί στο σχηματισμό αλυσίδων. Σ' αυτές ενσωματώνονται κατά διαστήματα μόρια NN–μεθυλένο–δισ- ακρυλαμίδιο λόγω της δομής τους προσδένονται σε δύο διαφορετικές αλυσίδες σχηματίζοντας έτσι πλέγμα (Sambrook et al., 1989).

### Υλικά

- Acrylamide 50% w/v
- TBE 5X
- dH<sub>2</sub>O
- TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine)
- APS 10% (ammonium persulfate)
- Σιλικόνη αποκόλλησης: Dimethyl-dichlorosilane

### Μέθοδος

Η μήτρα πολυμερισμού προετοιμάζεται ως εξής:

Τα τζάμια τοποθετούνται σε οριζόντια θέση. Γίνεται καθαρισμός αυτών με αιθανόλη και στην συνέχεια επάλειψή τους με 0,5ml σιλικόνης αποκόλλησης. Έπειτα στο μεγάλο τζάμι τοποθετούνται στις μεγάλοι μήκους πλευρές του ειδικές ταινίες. Στη συνέχεια αφήνεται το μικρό τζάμι από πάνω έτσι ώστε να καλύπτει ακριβώς το μεγάλο. Τότε η μήτρα πολυμερισμού είναι έτοιμη να στερεωθεί σε κάθετη θέση στο ειδικό αποσπώμενο εξάρτημα της σκευής ηλεκτροφόρησης και να ελεγχθεί η στεγανότητα του συστήματος.

Ακολούθως παρασκευάζουμε το διάλυμα του πηκτώματος, εισάγοντας σε ένα ποτήρι ζέσεως τα αντιδραστήρια με την σειρά που εμφανίζονται στον Πίνακα 6, με τελευταίους τους παράγοντες πολυμερισμού TEMED και APS. Τέλος το πήκτωμα εισάγεται στη μήτρα πολυμερισμού, στο επάνω μέρος προστίθεται ειδικό χτενάκι και αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου για 20 περίπου λεπτά.

Για την ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος των γενετικών τόπων 12S mtDNA και COII mtDNA, χρησιμοποιήθηκε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου συγκέντρωσης 10% και 8% αντίστοιχα. Η σύσταση του πηκτώματος φαίνεται στον παρακάτω Πίνακα.

Αντιδραστήριο	12S (10%)	COII (8%)
Acrylamide	14ml	11ml
TBE	14ml	14ml
dH <sub>2</sub> O	42ml	45ml
TEMED	70μL	70μL
APS	700μL	700μL

Πίνακας 6. Σύσταση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

## 2.5 Ηλεκτροφόρηση PCR προϊόντων

Η ηλεκτροφόρηση των PCR προϊόντων πραγματοποιείται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου το οποίο έχει μεγαλύτερη διακριτική ικανότητα από το πήκτωμα αγαρόζης καθώς είναι ικανό να διαχωρίσει μόρια DNA που διαφέρουν ακόμη και κατά ένα ζεύγος βάσεων (Avisé JC 2004).

### Υλικά

- Χρωστική
- TBE 1X

### Μέθοδος

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, για τον διαχωρισμό και την αναγνώριση των διαφόρων απλοτύπων του κάθε μιτοχονδριακού γενετικού τόπου.

Πριν την ηλεκτροφόρηση η μήτρα πολυμερισμού τοποθετείται στη κατακόρυφη συσκευή ηλεκτροφόρησης, η οποία και γεμίζεται με διάλυμα TBE 1x.

Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται 40μl χρωστικής. (10mM NaOH, φορμαμίδιο 95%, 0,05% μπλε της βρωμοφαινόλης και 0,05% κυανούν της ξυλόζης)

Κατόπιν αποδιατάσσονται σε θερμοκρασία 85°C για 10 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετούνται σε πάγο. Τέλος τα δείγματα τοποθετούνται στα "πηγαδάκια" και ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση υπό σταθερή τάση 150V, ένταση 200mA, και ισχύ 50W.

## 2.6 Εμφάνιση πηκτώματος

Η χρώση του DNA με νιτρικό άργυρο χρησιμοποιείται όταν απαιτείται μεγάλη ευαισθησία για την ανίχνευση μικρών ποσοτήτων DNA (>100pg; Guillemette and Lewis 1983).

### Υλικά

- Fix Solution (400ml dH<sub>2</sub>O, 8ml Ethanol 96%, 0,5 ml Acetic Acid(glacial))
- Staining Solution (AgNO<sub>3</sub> 0.1% w/v)
- Developing Solution (200ml dH<sub>2</sub>O, 3g NaOH, 0,01g NaBH<sub>4</sub>, 1 ml formaldehyde 37% v/v)

### Μέθοδος

Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε μισό Fix Solution για 3 λεπτά υπό συνεχή και ήπια ανάδευση. Ακολουθεί άλλη μια εμβάπτιση στο υπόλοιπο Fix Solution όπως παραπάνω και στην συνέχεια μία πλύση 1 λεπτού με dH<sub>2</sub>O.

Στο επόμενο στάδιο εμβαπτίζουμε το πήκτωμα στο Staining Solution για 15 λεπτά και στην συνέχεια πραγματοποιούμε δύο φορές πλύση με dH<sub>2</sub>O και για 1 λεπτό κάθε φορά.

Τέλος το πήκτωμα εμβαπτίζεται στο Developing Solution και αναδεύεται ήπια έως ότου εμφανιστούν ευκρινώς οι μπάντες. Μόλις οι μπάντες γίνουν ευκρινείς τότε αποχύνουμε το διάλυμα και πραγματοποιούμε πλύση με dH<sub>2</sub>O για 3 λεπτά. Αφού ολοκληρωθεί η διαδικασία της εμφάνισης, αποθηκεύουμε το πήκτωμα μέσα σε πλαστική, διαφανή σακούλα, ώστε να μπορεί να διατηρηθεί για αρκετό χρόνο μετά.

## 2.7 Ανάλυση δεδομένων

### 2.7.1 POPGENE

Οι συχνότητες των εμφάνισης των απλοτύπων και οι γενετικές αποστάσεις, υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος POPGENE σύμφωνα με τη μέθοδο του Nei (1972) (Yeh et al., 1999). Η μήτρα για το πρόγραμμα Popgen 3.2 κατασκευάστηκε υπό μορφή αρχείου .txt (βλ. Παράρτημα σελ. 26) όπου “..” = missing value.

Μετά την εκκίνηση του προγράμματος Popgen 3.2 επιλέγεται file, load data, co-dominant markers data και το αρχείο .txt της μήτρας. Στην οθόνη εμφανίζεται η μήτρα υπό μορφή .txt. Επιλέγεται από το toolbar η επιλογή Co-Dominant και στη συνέχεια Diploid Data. Εμφανίζεται παράθυρο επιλογών στο οποίο επιλέγεται Multiple Populations και Allele Frequency. Στη συνέχεια επιλέγονται οι γενετικοί τόποι και οι πληθυσμοί που θα συμπεριληφθούν στην γενετική ανάλυση. Μετά την επεξεργασία των δεδομένων από το πρόγραμμα, οι συχνότητες των αλληλομόρφων είναι δυνατόν να αποθηκευτούν σε αρχείο υπό τη μορφή .rst.9).



### 2.7.2 PHYLIP. TreeView

Κατασκευάστηκε επίσης δενδρόγραμμα με τη μέθοδο UPGMA, με τη χρήση του προγράμματος PHYLIP 3.6C (Felsenstein, 1994), βασισμένο στις συχνότητες εμφάνισης των απλοτύπων. Η στατιστική δύναμη των κόμβων αποτιμήθηκε με τη μέθοδο bootstrap. Η οπτικοποίηση του δενδρογράμματος έγινε με το πρόγραμμα TreeView 32 (Page, 1996).

Η μήτρα για το πρόγραμμα PHYLIP κατασκευάστηκε σύμφωνα με τις συχνότητες των αλληλομόρφων που αποκτήθηκαν από το πρόγραμμα POPGENE 3.2 (βλ. Παράρτημα σελ. 31).

Από το φάκελο του προγράμματος Phyllip 3.65 χρησιμοποιούνται τα αρχεία seqboot.exe, gendist.exe, neighbor.exe και consense.exe με την σειρά που αναφέρθηκαν.

Πρώτα ανοίγεται το αρχείο seqboot.exe, πληκτρολογείται η διαδρομή που οδηγεί στο αρχείο της μήτρας του phylip και επιλέγεται gene frequencies και ναι στην εκπροσώπηση όλων των αλληλομόρφων σε κάθε γενετικό τόπο. Στην συνέχεια ως random number seed επιλέγεται 999. Το προκύπτον αρχείο outfile μετονομάζεται ως seq.txt.

Δεύτερο εκτελείται το αρχείο gendist.exe, πληκτρολογείται η διαδρομή για το αρχείο seq.txt, επιλέγεται ναι στην εκπροσώπηση όλων των αλληλομόρφων σε κάθε γενετικό τόπο και εισάγεται ο αριθμός 100 στην επιλογή datasets. Το προκύπτον αρχείο outfile σε gendist.txt.

Τρίτο εκτελείται το αρχείο neighbor.exe, πληκτρολογείται η διεύθυνση που οδηγεί στο αρχείο gendist.txt, στην επιλογή Neighbor-joining or UPGMA tree επιλέγεται UPGMA tree, εισάγεται ο αριθμός 100 στην επιλογή datasets και ο αριθμός 999 στην επιλογή Random Number Seed. Το προκύπτον αρχείο outtree μετονομάζεται σε nei.txt.

Τέλος εκτελείται το αρχείο consense.exe, πληκτρολογείται η διαδρομή που οδηγεί στο αρχείο nei.txt και επιλέγεται ναι στην επιλογή Trees to be treated as Rooted. Το προκύπτον αρχείο outtree μετονομάζεται σε consense.txt.

Στην συνέχεια εκτελείται το πρόγραμμα TreeView και από το μενού file επιλέγουμε open και μέσω του παραθύρου διαλόγου που ανοίγει επιλέγεται το αρχείο consense.txt αφού προηγουμένως στο πεδίο files of type επιλέγει το All Files. Στην συνέχεια από το μενού Tree επιλέγονται τα Rectangular cladogram και Show internal edge labels.

### 2.7.3 STRUCTURE

Για την κατάταξη του κάθε ατόμου σε ένα από τους τρεις ορισθέντες υποπληθυσμούς χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STRUCTURE (noadmixture model, burn-in period 5000, 5000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) επαναλήψεις μετά το αρχικό burn-in period και  $K=3$  όπου  $K$  είναι ο αριθμός των ορισθέντων υποπληθυσμών).

Μετά την εκκίνηση του προγράμματος STRUCTURE επιλέγεται file και new project. Εισάγεται η μήτρα του STRUCTURE η οποία έχει κατασκευαστεί με μεταφορά των δεδομένων από την μήτρα του POPGENE με τη διαφορά ότι το αλληλόμορφο A συμβολίζεται ως 1 το B ως 2 και ούτω καθεξής. Ως “-9” συμβολίζεται το missing value. Επιλέγεται data file stores data for individuals in a single line, ενώ η μήτρα έχει κατασκευαστεί με individual ID for each individual και putative population origin for each individual. Επιλέγεται η δημιουργία του Parameter set με burn-in period 5000 και 5000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) επαναλήψεις μετά το αρχικό burn-in. Χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο χωρίς προσμείξεις (no admixture model) και allele frequencies correlated. Μετά την εμφάνιση bar plot επιλέχθηκε η εμφάνιση των ομάδων by group ID.

### 2.7.4 MDS

Τεχνικές ανάλυσης πολλών μεταβλητών όπως η MDS (Multi Dimensional Scaling) έχουν χρησιμοποιηθεί συχνά σε συνδυασμό με γενετικά δεδομένα για την παραγωγή «στατιστικών χαρτών» για δείγματα ατόμων ή πληθυσμών (Menozzi et al., 1978; Zhivotovskiy et al., 2003; Patterson et al., 2006; Novembre and Stephens, 2008). Με αυτές τις τεχνικές το κάθε άτομο ή πληθυσμός αναπαριστάται ως σημείο σε ένα ευκλείδειο σύστημα αξόνων με τέτοιο τρόπο ώστε η θέση των σημείων να δίνει πληροφορίες σχετικά με την ομοιότητα ή την διαφορά των γενοτύπων μεταξύ των κείμενων ατόμων ή πληθυσμών. Οι εφαρμογές τις MDS και άλλων πολύ-μεταβλητών τεχνικών έχουν πρόσφατα ανακεφαλαιωθεί από τον Jombart et al. (2009).

Στην παρούσα μελέτη εφαρμόστηκε, στη μήτρα γενετικών αποστάσεων Multi-Dimensional Scaling (MDS) με τη χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Ανοίγεται το αρχείο της μήτρας γενετικών αποστάσεων που έχει δημιουργηθεί με το στατιστικό πακέτο SPSS. Από το μενού analyze ανοίγεται το υπομενού scale και επιλέγεται Multidimensional Scaling (ALSCAL)... . Στην συνέχεια επιλέγονται όλοι οι πληθυσμοί και μεταφέρονται στο πλαίσιο variables. Από την επιλογή shape επιλέγεται squarechimmetric. Από την επιλογή model επιλέγεται Euclidian distance scaling model. Εισάγεται ως ελάχιστος-μέγιστος αριθμός διαστάσεων το 2. Από την επιλογή options επιλέγονται τα group plots, individual subject plots, datamatrix model και options summary.

## *Παράρτημα χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων*

**1. Παρασκευή διαλύματος APS 10% w/v:** 1g ammonium persulfate διαλύεται σε dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 10 ml.

**2. Παρασκευή διαλύματος TBE 5x:** 54g Tris-base, 27,5 g Boric Acid και 20ml διαλύματος EDTA (pH 8,0, 0,5M), διαλύονται σε dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 1L.

**3. Παρασκευή ακρυλαμίδιου 50% w/v:** 72,5g Ακρυλαμίδιο και 2,5g Bis-ακρυλαμίδιο διαλύονται με θέρμανση σε dH<sub>2</sub>O μέχρι τελικού όγκου 150ml. Ακολουθεί διήθηση.

### 3 Αποτελέσματα

Πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση φυσικού πληθυσμού *Bactrocera oleae*, με τη χρήση δύο μιτοχονδριακών γενετικών τόπων.

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορήθηκαν σε μη αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και ανάλογα με τον απλότυπο του κάθε δείγματος έτρεξαν με μεγαλύτερη ή μικρότερη ταχύτητα σχηματίζοντας τις ανάλογες μπάντες στο πήκτωμα. Οι απλότυποι για τον γενετικό τόπο 12S, ανάλογα από την απόσταση τους από την αρχή του πηκτώματος χαρακτηρίστηκαν ως A, B, C, και D. Ο απλότυπος A βρισκόταν χαμηλότερα προς την αρχή του πηκτώματος ενώ ο D σε υψηλότερη θέση. Κατά την ανάλυση του γενετικού τόπου COII, βρέθηκαν στο πήκτωμα τρεις μπάντες, οι οποίες χαρακτηρίστηκαν A, B, C ανάλογα με την απόσταση από την αρχή του πηκτώματος. Α ονομάστηκε ο απλότυπος που βρισκόταν χαμηλότερα και C αυτός που βρισκόταν υψηλότερα.

#### 3.1 Εμφανιζόμενοι απλότυποι

Οι απλότυποι που ανιχνεύθηκαν στο σύνολο των δειγμάτων ανά γενετικό τόπο εμφανίζονται στον Πίνακα 7.

Γενετικός Τόπος	Εμφανιζόμενοι απλότυποι
12S	A, B, C, D
COII	A, B, C

Πίνακας 7. Εμφανιζόμενοι απλότυποι ανά γενετικό τόπο

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο απλότυπος D του γενετικού τόπου 12S mtDNA και ο απλότυπος C του γενετικού τόπου COII mtDNA, είναι μοναδικοί για τα δείγματα του Ισραήλ και της Κύπρου αντίστοιχα, που αποτελούν δείγματα της ανατολικής Μεσογείου.

### 3.2 Εμφανιζόμενες συχνότητες

Με την χρήση του Porgene, υπολογίστηκαν οι συχνότητες εμφάνισης των απλοτύπων ανά γενετικό τόπο ανά δείγμα και παραθέτονται στους Πίνακες 8 και 9 που ακολουθούν.

<b>Δείγμα</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>
<b>Gimmaraes</b>	0.0909	0.7273	0.1818	0.0000
<b>Lisbon</b>	0.0741	0.5556	0.3703	0.0000
<b>Madrid</b>	0.0000	0.9091	0.0909	0.0000
<b>Cordoba</b>	0.0741	0.8519	0.0740	0.0000
<b>Morocco</b>	0.0345	0.8276	0.1379	0.0000
<b>Tunisia</b>	0.1333	0.6667	0.2000	0.0000
<b>Farfa</b>	0.1053	0.8421	0.0526	0.0000
<b>Vasto</b>	0.1579	0.7368	0.1053	0.0000
<b>Lumio</b>	0.0714	0.7143	0.2143	0.0000
<b>Split</b>	0.1852	0.7407	0.0741	0.0000
<b>Pilio</b>	0.2593	0.5926	0.1481	0.0000
<b>Crete</b>	0.1923	0.6154	0.1923	0.0000
<b>Israel SB</b>	0.1111	0.5000	0.2778	0.1111
<b>Mazotos</b>	0.0400	0.4800	0.4800	0.0000
<b>Napa</b>	0.0000	0.4211	0.5789	0.0000
<b>Calaveras</b>	0.0000	0.5385	0.4615	0.0000
<b>Solano</b>	0.0000	0.5185	0.4815	0.0000
<b>Vacaville</b>				
<b>Yolo Davis</b>	0.0000	0.6667	0.3333	0.0000
<b>San Luis</b>	0.0714	0.6429	0.2857	0.0000
<b>Obispo</b>				
<b>San Diego</b>	0.1154	0.4615	0.4231	0.0000
<b>South Afrika</b>	0.2174	0.3043	0.4783	0.0000

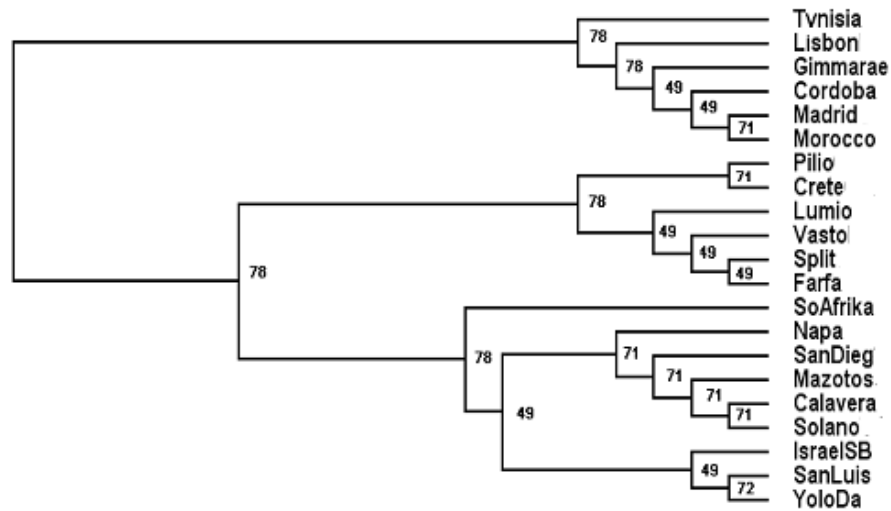
Πίνακας 8. Συχνότητες εμφάνισης απλοτύπων για τον γ.τόπο 12S.

<b>Δείγμα</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Gimmaraes</b>	0.0000	1.0000	0.0000
<b>Lisbon</b>	0.1154	0.8846	0.0000
<b>Madrid</b>	0.0741	0.9259	0.0000
<b>Cordoba</b>	0.0741	0.9259	0.0000
<b>Morocco</b>	0.1111	0.8889	0.0000
<b>Tunisia</b>	0.3750	0.6250	0.0000
<b>Farfa</b>	0.7273	0.2727	0.0000
<b>Vasto</b>	0.7917	0.2083	0.0000
<b>Lumio</b>	0.6786	0.3214	0.0000
<b>Split</b>	0.6667	0.3333	0.0000
<b>Pilio</b>	0.7407	0.2593	0.0000
<b>Crete</b>	0.6923	0.3077	0.0000
<b>Israel SB</b>	1.0000	0.0000	0.0000
<b>Mazotos</b>	0.9615	0.0000	0.0385
<b>Napa</b>	0.9615	0.0000	0.0385
<b>Calaveras</b>	1.0000	0.0000	0.0000
<b>Solano</b>	1.0000	0.0000	0.0000
<b>Vacaville</b>			
<b>Yolo Davis</b>	1.0000	0.0000	0.0000
<b>San Luis</b>	1.0000	0.0000	0.0000
<b>Obispo</b>			
<b>San Diego</b>	1.0000	0.0000	0.0000
<b>South Afrika</b>	1.0000	0.0000	0.0000

**Πίνακας 9. Συχνότητες εμφάνισης απλοτύπων για τον γ.τόπο COII.**

### 3.3 Κλαδόγραμμα φυλλογεωγραφικών σχέσεων

Βάσει των συχνοτήτων εμφάνισης απλοτύπων που υπολογίστηκαν παραπάνω και με την χρήση της μεθόδου UPGMA, σχεδιάστηκε το παρακάτω κλαδόγραμμα. Σε κάθε κόμβο του κλαδογράμματος απεικονίζονται και οι τιμές bootstrap.



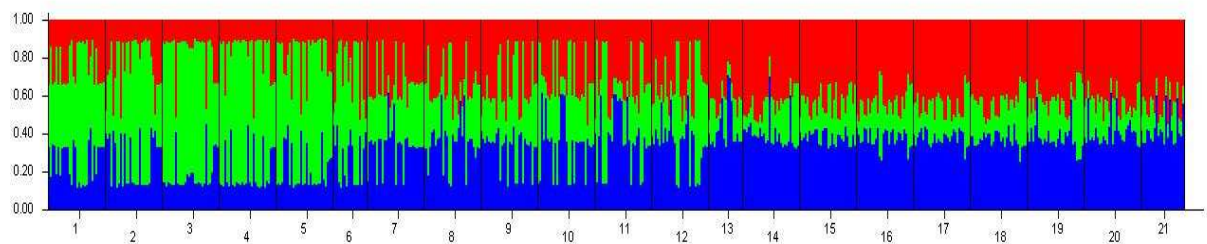
### 3.4 Ανάλυση structure

Έγινε εκτίμηση της πληθυσμιακής δομής των φυσικών πληθυσμών βάσει τη διακύμανσης των συχνοτήτων εμφάνισης των απλοτύπων. Παρατηρείται μεγάλη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών της δυτικής Μεσογείου και αυτών της ανατολικής Μεσογείου και της Καλιφόρνιας ενώ διαφαίνεται μια εκτεταμένη γονιδιακή ροή προς τους πληθυσμούς της κεντρικής Μεσογείου.

**West med Group**

**Central med Group**

**East med and Californian Group**



(1) Gimmaraes, (2) Lisbon, (3) Cordoba, (4) Madrid, (5) Tunisia, (6) Morocco, (7) Lumio Corsica, (8) Split Croatia, (9) Farfa, (10) Vasto, (11) Pilio, (12) Crete, (13) Mazotos, (14) Israel SB, (15) South Afrika, (16) Calaveras, (17) Napa, (18) Yolo Davis, (19) San Luis Obispo, (20) Solano Vacaville, (21) San Diego

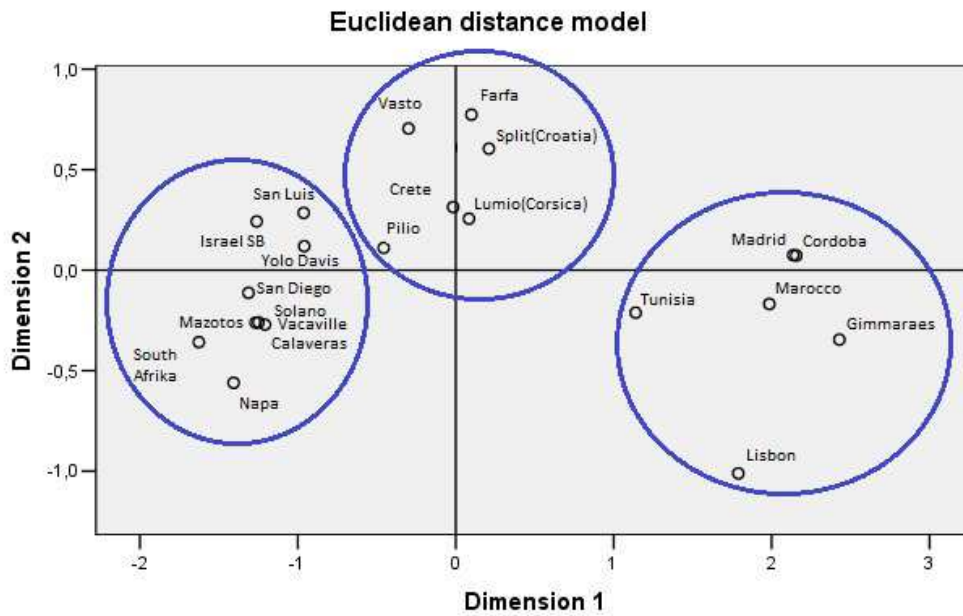


### 3.5 Multi Dimensional Scaling Analysis

Οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών που αναλύθηκαν φαίνονται στον επόμενο πίνακα.

0	0,9783	0,982	0,988	0,9873	0,9093	0,6266	0,5553	0,6669	0,6732	0,5752	0,6361	0,2912	0,298	0,267	0,3095	0,3027	0,349	0,3427	0,2848	0,2238
0,027	0	0,939	0,944	0,9572	0,9253	0,6378	0,5894	0,7126	0,6902	0,6257	0,6888	0,3884	0,4243	0,4105	0,4276	0,4253	0,4374	0,4267	0,4057	0,3656
0,018	0,0629	0	0,998	0,9978	0,9292	0,7176	0,6393	0,7357	0,745	0,6326	0,6917	0,3656	0,3591	0,318	0,3791	0,3692	0,4372	0,4289	0,3445	0,2586
0,012	0,0572	0,002	0	0,9975	0,9326	0,7109	0,6358	0,7287	0,7453	0,6385	0,6937	0,3596	0,348	0,3058	0,3657	0,3559	0,4226	0,4184	0,3383	0,2601
0,013	0,0437	0,002	0,003	0	0,9463	0,7291	0,658	0,7558	0,7614	0,6598	0,7177	0,3972	0,3951	0,3572	0,4121	0,4033	0,4629	0,4555	0,3816	0,3038
0,095	0,0777	0,073	0,07	0,0552	0	0,879	0,8453	0,9125	0,912	0,8605	0,8993	0,6588	0,6527	0,6171	0,663	0,656	0,6989	0,6989	0,6495	0,5907
0,467	0,4497	0,332	0,341	0,3159	0,1289	0	0,9908	0,9836	0,9928	0,9662	0,9735	0,8772	0,8349	0,7854	0,8535	0,843	0,9094	0,9154	0,8426	0,7657
0,588	0,5286	0,447	0,453	0,4186	0,1681	0,0093	0	0,9822	0,9872	0,9869	0,9857	0,9288	0,8898	0,846	0,9028	0,8943	0,9455	0,9546	0,9016	0,8418
0,405	0,3388	0,307	0,317	0,28	0,0916	0,0165	0,018	0	0,9852	0,972	0,9893	0,8945	0,881	0,8459	0,8937	0,8867	0,9269	0,9269	0,8805	0,8172
0,396	0,3707	0,294	0,294	0,2725	0,0921	0,0072	0,0129	0,0149	0	0,9808	0,9871	0,867	0,8248	0,7765	0,8387	0,8292	0,8884	0,8987	0,837	0,7734
0,553	0,4689	0,458	0,449	0,4159	0,1502	0,0344	0,0132	0,0284	0,0194	0	0,9945	0,9264	0,8903	0,8513	0,8954	0,8891	0,9246	0,9395	0,9085	0,8719
0,452	0,3728	0,369	0,366	0,3317	0,1062	0,0268	0,0144	0,0108	0,0129	0,0055	0	0,9123	0,8887	0,8529	0,8956	0,8894	0,9232	0,932	0,899	0,8549
1,234	0,9458	1,006	1,023	0,9233	0,4173	0,131	0,0739	0,1114	0,1427	0,0794	0,0918	0	0,9776	0,959	0,9804	0,978	0,9833	0,9893	0,9875	0,9625
1,211	0,8573	1,024	1,056	0,9285	0,4266	0,1804	0,1168	0,1267	0,1926	0,1162	0,118	0,0227	0	0,9948	0,9979	0,9987	0,9809	0,9771	0,9956	0,9763
1,321	0,8905	1,146	1,185	1,0294	0,4828	0,2416	0,1672	0,1674	0,2529	0,161	0,1591	0,0418	0,0052	0	0,9909	0,9937	0,9608	0,9534	0,9872	0,9766
1,173	0,8495	0,97	1,006	0,8864	0,411	0,1584	0,1022	0,1124	0,1759	0,1104	0,1103	0,0198	0,0021	0,0092	0	0,9997	0,9894	0,9844	0,9934	0,9654
1,195	0,8551	0,997	1,033	0,908	0,4216	0,1708	0,1117	0,1203	0,1874	0,1176	0,1172	0,0222	0,0013	0,0063	0,0003	0	0,9858	0,9804	0,9937	0,9686
1,053	0,8269	0,827	0,861	0,7703	0,3583	0,095	0,056	0,0759	0,1183	0,0784	0,0799	0,0168	0,0193	0,04	0,0107	0,0143	0	0,9976	0,9798	0,9337
1,071	0,8516	0,846	0,871	0,7863	0,3582	0,0884	0,0464	0,0759	0,1068	0,0624	0,0704	0,0108	0,0232	0,0477	0,0157	0,0198	0,0024	0	0,982	0,9407
1,256	0,9023	1,066	1,084	0,9634	0,4316	0,1713	0,1032	0,1272	0,178	0,096	0,1064	0,0126	0,0044	0,0129	0,0066	0,0064	0,0204	0,0181	0	0,9863
1,497	1,0061	1,352	1,347	1,1912	0,5264	0,267	0,1723	0,2019	0,2569	0,1371	0,1568	0,0382	0,0239	0,0237	0,0352	0,0319	0,0686	0,0611	0,0138	0

Με βάση τις παραπάνω γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών έγινε MDS ανάλυση με το στατιστικό πακέτο SPSS.



(1) Gimmaraes, (2) Lisbon, (3) Cordoba, (4) Madrid, (5) Tunisia, (6) Morocco, (7) Lumio Corsica, (8) Split Croatia, (9) Farfa, (10) Vasto, (11) Pilio, (12) Crete, (13) Mazotos, (14) Israel SB, (15) South Afrika, (16) Calaveras, (17) Napa, (18) Yolo Davis, (19) San Luis Obispo, (20) Solano Vacaville, (21) San Diego

## 4. Συμπεράσματα-Συζήτηση

Ο δάκος της ελιάς αποτελεί το πιο καταστρεπτικό παράσιτο της ελιάς. Από τη στιγμή που ανιχνεύθηκε στις Η.Π.Α. για πρώτη φορά έχει προκαλέσει μεγάλο ενδιαφέρον αλλά και ανησυχία. Είναι αναγκαίο να βρεθεί ο τρόπος εξάπλωσης του αλλά και η πηγή της εξάπλωσης έτσι ώστε στο μέλλον να αποφευχθούν παρόμοια περιστατικά.

Μετά την εύρεση της πηγής της πρώτης εισβολής του δάκου στην αμερικανική ήπειρο, η παρούσα μελέτη συνεχίζει προς την ίδια κατεύθυνση προσπαθώντας να εντοπίσει με μεγαλύτερη ακρίβεια την περιοχή προέλευσης της εισβολής. Για το λόγο αυτό ενισχύθηκαν δυο μιτοχονδριακοί γενετικοί τόποι, αυτός της κυτοχρωμικής οξειδάσης II και αυτός της 12S υπομονάδας του ρυβωσώματος. Τα δεδομένα αναλύθηκαν με τη χρήση των προγραμμάτων Popgene, Phyllip, Treeview, Structure και SPSS.

Η δομή του δενδρογράμματος UPGMA, που προέκυψε από την επεξεργασία των γονιδιακών συχνοτήτων από το πρόγραμμα TreeView είναι σχετικά αναμενόμενη. Τα δείγματα από την Ισπανία και την Πορτογαλία ομαδοποιούνται μαζί σχηματίζοντας τον πληθυσμό της Ιβηρικής στον οποίο εντάσσονται και τα δείγματα από την βορειοανατολική Αφρική. Τα δείγματα από την Ελλάδα και την Ιταλία σχηματίζουν την ομάδα της Κεντρικής Μεσογείου στην οποία εντάσσεται και ο πληθυσμός από την Κροατία, κάτι το οποίο μελετάται για πρώτη φορά. Τέλος, τα δείγματα από το Ισραήλ, την Καλιφόρνια, την Κύπρο και τη Νότιο Αφρική ομαδοποιούνται μαζί επιβεβαιώνοντας την προέλευση της πρώτης εισβολής του δάκου στην Αμερικανική ήπειρο. Επιπλέον, για τα δείγματα από την Καλιφόρνια φαίνεται ότι Napa, San Diego, Calaveras και Solano βρίσκονται εγγυτέρα στη Κύπρο ενώ τα San Luis και Yolo Davis είναι πιο κοντά στο Israel.

Η ανάλυση Structure επιβεβαιώνει τα μέχρι τώρα αποτελέσματα, διαφοροποιεί δηλαδή τον πληθυσμό του δάκου σε τρεις υποπληθυσμούς (Ιβηρικός, Ελληνορωμαϊκός, Ανατολικής Μεσογείου). Παρατηρείται πως τα δείγματα της Καλιφόρνιας είναι ορατά λιγότερο πολυμορφικά από τα δείγματα του Ισραήλ και της Κύπρου, όμως σίγουρα η προέλευσή τους εντοπίζεται στην Ανατολική Μεσόγειο.

Η ανάλυση MDS επιβεβαιώνει επίσης τα προϋπάρχοντα αποτελέσματα. Τα δείγματα του Ιβηρικού και του Ελληνορωμαϊκού πληθυσμού σχηματίζουν ανεξάρτητες συστάδες. Επίσης είναι εμφανές πως τα Καλιφορνέζικα εντάσσονται στον πληθυσμό της ανατολικής Μεσογείου. Παρόλα αυτά παρατηρείται και εδώ ότι τα δείγματα Yolo Davis και San Luis Obispo βρίσκονται πιο κοντά στον πληθυσμό από το Ισραήλ.

Η Μεσόγειος έχει ήδη χαρακτηριστεί η περιοχή προέλευσης της εισβολής στην Καλιφόρνια (Nardi et al., 2005). Επίσης έχει βρεθεί πως υπάρχουν τρεις υποπληθυσμοί του δάκου στη Μεσόγειο ο Δυτικός, Κεντρικός και ανατολικός (Augustinos et. al, 2005). Από αυτούς ο ανατολικός είναι η πιθανότερη πηγή της εισβολής στην Αμερική (Zygouridis et al., 2009).

Οι προηγούμενες μελέτες που καταδεικνύουν την ανατολική Μεσόγειο ως την πηγή της εισβολής στην Αμερική έχουν βασιστεί σε μικροδορυφορικούς γενετικούς δείκτες (Zygouridis et al., 2009). Στην μελέτη των Nardi et al. 2005, είχε χρησιμοποιηθεί ένας

μιτοχονδριακός γενετικός τόπος, αυτός της NADH δευδρογονάσης, ο οποίος παρουσιάζει μεγαλύτερο πολυμορφισμό σε σχέση με της κυτοχρωμικής οξειδάσης II (Nardi et al. 2003), που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη. Επίσης στην μελέτη των Nardi et al., 2005 είχε χρησιμοποιηθεί μικρότερο μέγεθος δείγματος σε σχέση με την παρούσα μελέτη.

Η χρήση του μητρικά κληρονομούμενου μιτοχονδρίου για πληθυσμιακή ανάλυση δίνει στις φυλογεωγραφικές μελέτες μια βαθύτερη ιστορική προοπτική (Avisé 1994, 2000). Σε συνδυασμό τον κατάλληλο αριθμό δειγμάτων και γενετικών τόπων, μπορεί να δώσει απαντήσεις σε πολλά ερωτήματα γύρω από την εξάπλωση του δάκου της ελιάς. Η παρούσα μελέτη περιορίστηκε σε δύο μιτοχονδριακούς γενετικούς τόπους. Σε ένα επόμενο στάδιο θα μπορούσαν να μελετηθούν και άλλοι, ώστε να καταλήξουμε σε ένα ισχυρότερο στατιστικά αποτέλεσμα.

## Βιβλιογραφία

- Allendorf FW and Phelps SR, 1981. Use of allelic frequencies to describe population structure. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 1507-1514.
- Attardi G. and A.Ghomyn. 1995. *Mitochondrial biogenesis and genetics*. Academic press.
- Augustinos, A.A., Z. Mamouris, E. Straticopoulos, S. D'Amelio, A. Zacharopoulou, K.D. Mathiopoulos, 2005. Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mditerranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* 125: 231-241.
- Augustinos, A.A., E.E. Straticopoulos, A. Zacharopoulou, K.D. Mathiopoulos, 2002. Polymorphic Microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol Ecol Notes* 2: 278-280.
- Avise JC. 1994. *Molecular Markers Natural History, and Evolution*. Chapman & Hall, London.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge,Massachusetts.
- Αλαχιώτης, Σ.Ν., 2007. Εισαγωγή στην εξέλιξη. Εκδοτικός οργανισμός Λιβάνη.
- Beebee T. and Rowe G., 2004. *An introduction to molecular ecology*. Oxford University Press (1st edition).
- Baker A., 2000. *Molecular methods in ecology*. Blackwell Science Ltd.
- Brown, T.A., 2002. *Genomes. Second Edition*. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Bruford MW and Robert K Wayne, 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development* 3:939-943.
- Bueno A., O.Jones, 2002. Alternative methods for controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC wprs Bulletin* vol. 25
- ΓΑΜΒΡΙΑΣ ΧΡΗΣΤΟΣ, 1998. *Εντομολογικοί εχθροί της ελιάς. Εκδόσεις Σταμούλη*
- Darling J., M. Blum, 2007. DNA-based methods for monitoring invansive species: a review and prospectus. *Biol Invansions* 9:751-765.
- Drew, R.A.I. & Raghu, 2002. The fruit fly fauna (Diptera: Tephritidae: Dacinae) of the rainforest habitat of the Western Ghats, India. *The Raffles Bulletin of Zoology* 50(2): 327-352
- Dyck, V.A, J. Hendrichs and A.S. Robinson, 2005. *Sterile Insect Technique, Principals and practice in area-wide integrated pest management*. Springer
- Fletcher B. & E.T.Kapatos,1983. THE INFLUENCE OF TEMPERATURE, DIET AND OLIVE FRUITS ON THE MATURATION RATES OF FEMALE OLIVE FLIES AT DIFFERENT TIMES OF THE YEAR. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 33: 244-252

Freeland J., 2005. *Molecular Ecology*. Wiley.

Gasser R., Chilton N., 2001. *Applications of single-strand conformation polymorphism (SSCP) to taxonomy, diagnosis, population genetics and molecular evolution of nematodes. Veterinary Parasitology 101: 201-213.*

Gasser R.B., Min Hu, Neil B Clinton, Bronwyn E Campbell, Aaron J Jex, Domenico Otranto, Claudia Cfarchia, Ian Beveridge and Xingquan zhu.,2007. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) for the analysis of genetic variation. *Nature Protocols 1:3121-3128.*

Gutierrez A., L. Ponti Q.A.Cossu, 2009. *Effects of climate warming on Olive fly (Bactrocera oleae (Gmelin)) in California and Italy. Climatic Change 95:195-217.*

Hawkins J. R., 1997. *Finding mutations the basics. Oxford University Press. 56-69.*

Hoelzel A., 1998. *Molecular genetic analysis of populations. Oxford University Press.*

Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (1990). *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Pages 13 – 20 in Academic Press Inc.*

Jamnongluk W., V. Baimai and P. Kittayapong, 2003. *Molecular evolution of Tephritid fruit flies in the genus Bactrocera based on the Cytochrome Oxidase I Gene.*

Katsoyannos P (1992). *Olive pests and their control in the near East. FAO Plant Production and Protection Paper No 115. FAO: Rome.*

Lewin B., *Genes VIII, Pearson Education.*

Mazomenos BE (1989). *Dacus Oleae. In: Robinson AS, Hooper G(eds). World Crop Pests, Vol. 3B, Elsevier: Amsterdam. Pp 169-177.*

Manikas G. Tsiroyannis V.,1983. Biological control of *Dacus oleae* in Greece using the parasite *Opius concolor*. Entomophagous insects and biotechnologies against the olive pests. *Join Research Centre. Commission of the European Communities. EUR 8647 EN-FR 75-83*

Montiel\_Bueno A. & Jones O. (2002) *Alternative methods for controlling the olive fruit fly, Bactrocera oleae, involving semiochemicals. IOBC Wprs Bull 25: 1-11*

Mueller UG, Wolfenbarger LL (October 1999). "AFLP genotyping and fingerprinting". *Trends Ecol. Evol. (Amst.) 14 (10): 389–394.*

Meudt HM, Clarke AC (March 2007). "Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances". *Trends Plant Sci. 12 (3): 106–17.*

Nardi F., Carapelli A., Dallai R. and Frati F. ,2003. *The mitochondrial genome of the olive fly Bactrocera oleae: two haplotypes from distant geographical locations. Insect Molecular Biology 12(6): 605–611.*

NARDI F., CARAPELLI A., DALLAI R., RODERICK G. and FRATI F., 2005. Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Molecular Ecology* 14(9):2729-38.

Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *Am. Nat.* 106: 283-292.

Orita M., Youichi Suzuki, Takao Sekiya, Kenshi Hayashi, 1989. Rapid and Sensitive Detection of Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaction. *Genomics* 5:874-879.

Park. L.K. and Moran, P. (1994) *Developments in molecular genetic techniques in fisheries.* *Rev.Fish Biol. Fish.* 4, 272-99.

Rice RE (2000). *Bionomics of the olive fruit fly Bactrocera (Dacus) oleae.* *UC Plant Protection Quarterly* 10: 1-5.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB and Erlich HA (1988). Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487 – 491.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schlotterer, C., 1998. *Molecular genetic analysis of populations. A practical approach.* Second edition. Oxford University Press.

Shi W., C. Kerderlhue and H. Ye, 2010. Population genetic structure of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (hendel) (Diptera: Tephritidae) from Yunnan province (China) and nearby sites across the border. *Genetica* 138: 377-385

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H. and Flook P., 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann Ent Soc Am* 87:651-701.

Smith P., S.Kambhampati, K.Armstrong, 2003. Phylogenetic relationships among *Bactrocera* species (Diptera: Tephritidae) inferred from mitochondrial DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 8-17.

Wesson R., 1991. *Beyond natural selection.* The IMT Press, Cambridge, Massachusetts.

Yeh, F.C., T. Boyle, Y. Rongcai, Z. Ye and J.M. Xiyuan, 1999. *POPGENE VERSION 1.31 Microsoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis.*

Vignal Alain, Denis Milan, Magali SanCristobal, Andre Eggen, 2002. A review on SNP and types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genet. Sel. Evol* 34:275-305

Vos P., Rene Hogers, Rene Hogers, Marjo Bleeker, Martin Reijmans, Theo van de Lee, Miranda Hornes, Adrie Frijters, Jerina Pot, Johan Peleman, Martin Kuiper and Marc Zabeau, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407-4414.

Wright, J.M. (1993) DNA fingerprinting of fishes. In Hochachka, P.W. and Mommsen, T., eds. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2. New York: Elsevier, pp. 57-91.

Wright, J.M. (1994) Mutation at VNTRs: are minisatellites the evolutionary progeny of microsatellites? *Genome* (in press).

Zygouridis NE., AA Augustinos, FG Zalom and KD Mathiopoulos, 2008. Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers. *Heredity* 102: 402-412

FAOSTAT, [faostat.fao.org](http://faostat.fao.org)