

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ-ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗΣ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ
ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ (*Bactrocera oleae*) ΣΤΗΝ
ΚΑΛΙΦΟΡΝΙΑ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ
ΑΠΩΛΕΙΑΣ ΑΝΘΕΚΤΙΚΩΝ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ.

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΥ ΕΥΑΓΓΕΛΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2011

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Μαμούρης Ζήσης

Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Πληθυσμών του Τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Κακάνη Ευδοξία

Διδάσκουσα ΠΔ/407 Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο της Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας- Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας κ. Κωνσταντίνου Μαθιόπουλου.

Ολοκληρώνοντας την παρούσα διπλωματική εργασία θα ήθελα να απευθύνω τις θερμές ευχαριστίες μου πρωτίστως στον επιβλέποντα καθηγητή κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο που με δέχτηκε στο εργαστήριό του και με εμπιστεύθηκε για τη διεκπεραίωση αυτής της διπλωματικής εργασίας καθώς και για τις γνώσεις, τις συμβουλές, τη βοήθεια και το επιστημονικό υλικό που μου διέθεσε κατά τη διάρκεια της εκπόνησής της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Μαμούρη Ζήση για την συμβολή του. Ακόμα, θέλω να της εκφράσω τις ιδιαίτερες ευχαριστίες μου στη κ. Κακάνη Εύη, για την ανεκτίμητη καθοδήγηση και η αρωγή της κάθε φορά που τη χρειάστηκα. Ευχαριστώ τους υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου κ. Τσουμάνη Κωνσταντίνα και κ. Ζυγουρίδη Νίκο η βοήθεια των οποίων ήταν άμεση σε οποιοδήποτε ζήτημα προέκυπτε, όπως επίσης και την κ. Γρηγορίου Μαρία- Ελένη για την εξαιρετική συνεργασία. Τέλος, θα ήθελα να κλείσω ευχαριστώντας ιδιαίτερα την οικογένειά μου για την αμέριστη και άοκνη υποστήριξη που μου πρόσφεραν σε όλα τα επίπεδα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

| | |
|---|----|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | 6 |
| I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | 7 |
| I.1. Προσαρμογή..... | 7 |
| I.1.1. Η προσαρμογή στην εξελικτική θεωρία..... | 8 |
| I.1.2. Προσαρμογή εξωτικών ειδών σε νέα περιβάλλοντα..... | 14 |
| I.2. Κόστος της φυσικής επιλογής..... | 19 |
| I.2.1. Ορισμός..... | 19 |
| I.2.2. Συσχέτιση του κόστους της επιλογής με μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα..... | 21 |
| I.3. Ρυθμός εμφάνισης/εξαφάνισης ενός αλληλομόρφου..... | 24 |
| I.3.1. Επίδραση της επιλογής στις συχνότητες των αλληλομόρφων..... | 24 |
| I.3.2. Ρυθμός μεταβολής των γονιδιακών συχνοτήτων..... | 29 |
| I.4. Μοριακοί δείκτες κατάλληλοι για την παρακολούθηση προσαρμογής..... | 34 |
| I.4.1. Ορισμός, ιδιότητες και εφαρμογές μοριακών δεικτών..... | 34 |
| I.4.2. Μοριακοί δείκτες και τεχνικές..... | 35 |
| I.5. Ο δάκος <i>Bactrocera oleae</i> σαν οργανισμός-παράδειγμα για τη μελέτη της προσαρμογής σε νέα περιβάλλοντα..... | 41 |
| ΣΚΟΠΟΣ..... | 43 |
| II. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ..... | 44 |
| II.1. Βιολογικό υλικό..... | 44 |
| II.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης..... | 44 |
| II.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR..... | 49 |
| II.4. Πέψη με ενδονουκλεάσες περιορισμού..... | 52 |
| III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ..... | 55 |
| III.1. Μοριακός έλεγχος παρουσίας μεταλλάξεων..... | 55 |

| | |
|---|----|
| III.1.1. Έλεγχος παρουσίας της μετάλλαξης Ile214Val..... | 55 |
| III.1.2. Έλεγχος παρουσίας της μετάλλαξης Gly488Ser..... | 57 |
| III.1.3. Έλεγχος παρουσίας της μετάλλαξης Δ3Q..... | 59 |
| III.2. Πληθυσμιακή ανάλυση..... | 62 |
| III.2.1. Έλεγχος συχνότητας ανθεκτικών αλληλομόρφων στους πληθυσμούς..... | 62 |
| III.2.2. Ανάλυση ρυθμού απώλειας των ανθεκτικών αλληλομόρφων..... | 65 |
| IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ..... | 73 |
| V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 78 |
| VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ..... | 83 |

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα αποτελεί άμεσο αποτέλεσμα μιας εξελικτικής διαδικασίας επιλογής που ξεκινάει με την εφαρμογή των εντομοκτόνων έτσι ώστε να είναι δυνατή η προσαρμογή των οργανισμών σε νέα περιβάλλοντα. Η ταχύτητα και η αμεσότητα που παρατηρείται η διαδικασία της προσαρμογής μέσω της ανάπτυξης ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, καθιστούν τα έντομα ως οργανισμούς- παραδείγματα για τέτοιου είδους μελέτες και ο δάκος της ελιάς *B. oleae* είναι ένας από αυτούς. Η μελέτη της ανθεκτικότητας βοηθάει στην κατανόηση των παραμέτρων που επιτρέπουν ταχεία προσαρμογή στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς κι έτσι προωθείται η έρευνα για ανακάλυψη νέων μεθόδων για την ελαχιστοποίηση της ανθεκτικότητας, ενώ παράλληλα βοηθάει στη κατανόηση των γενετικών μηχανισμών της προσαρμογής στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Στην παρούσα εργασία μελετάται η προσαρμογή φυσικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς στην Καλιφόρνια μέσω της ανάλυσης του ρυθμού απώλειας ανθεκτικών αλληλομόρφων του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Η Καλιφόρνια αποτελεί ιδανική πηγή προέλευσης των δειγμάτων, αφού δεν χρησιμοποιούνται οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, έτσι ώστε να είναι δυνατόν να υπολογιστεί το κόστος αρμοστικότητας που φέρουν οι μεταλλάξεις ανθεκτικότητας εάν υπάρχουν. Για να υπολογιστεί αυτό, αρχικά πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ύπαρξης μετάλλαξης με αναλύσεις PCR-RFLP, ύστερα ακολουθεί υπολογισμός των συχνοτήτων των αλληλομόρφων και σύγκριση των συχνοτήτων θα καταδείξει εάν και είναι συσχετισμένο κάποιο κόστος με τις μεταλλάξεις ανθεκτικότητας και σε ποιο βαθμό συμβαίνει αυτό.

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1. Προσαρμογή

I.1.1 Η προσαρμογή στην εξελικτική θεωρία

Οι προσαρμογές -οι χαρακτήρες εκείνοι για τους οποίους ο Δαρβίνος έλεγε ότι «τόσο δίκαια προκαλούν το θαυμασμό μας»- αποτελούν κεντρικό σημείο στη μελέτη της Βιολογίας (Futuyma, 1995). Είναι όντως αξιοθαύμαστο το γεγονός ότι οι περισσότεροι οργανισμοί φαίνεται να είναι τόσο ταιριαστοί, σχεδόν ιδανικοί για τα αντίστοιχά τους περιβάλλοντα. Πολλές μορφές ζωής εμφανίζουν μια ευρεία ποικιλότητα χαρακτηριστικών που τους προσδίδουν την ικανότητα να επιβιώνουν, αλλά και να αναπαράγονται με επιτυχία κάτω από διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Μέχρι τα μέσα του 19^{ου} αιώνα η κυρίαρχη επιστημονική θέση ήταν ότι τα είδη είναι ιδεατά και αμετάβλητα, ήτοι δεν εξελίσσονται. Έτσι οι εξηγήσεις για τον τρόπο με τον οποίο τα έμβια όντα είναι τόσο κατάλληλα για τα περιβάλλοντά τους βασίζονταν αποκλειστικά στην έννοια της θεϊκής δημιουργίας (Moore, 1999). Η αναγνώριση του γεγονότος της εξέλιξης είναι παλαιότερη από τον Δαρβίνο, αλλά με την ουσιαστική συμβολή του και με άλλες προόδους της επιστήμης η εξέλιξη αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό μιας ριζικής αλλαγής στη θεώρηση του φυσικού κόσμου. Η ριζοσπαστική αυτή αλλαγή απέρριψε την ιδέα της στατικής δομής της «Μεγάλης Αλυσίδας των Όντων» που εθεωρείτο θεόπεμπτη και επομένως σωστή και αναλλοίωτη. Το μεγάλο έργο του Δαρβίνου που δημοσιεύτηκε περιληπτικά το 1859 με τίτλο «Η προέλευση των Ειδών Μέσω Φυσικής Επιλογής», το οποίο προκάλεσε μια επιστημονική έκρηξη που οι κλυδωνισμοί της είναι αισθητοί μέχρι τις μέρες μας, εμπεριέχει δυο βασικές θέσεις: α) ότι όλα τα είδη προήλθαν, μέσω τροποποιήσεων, από κοινά προγονικά είδη και β) ότι οι τροποποιήσεις αυτές οφείλονται στη φυσική επιλογή που δρα πάνω στις διαφορές που υπάρχουν μεταξύ των ατόμων ενός είδους. Ενώ η ιδέα της ιστορικής πραγματικότητας της εξέλιξης έπεισε όλους τους επιφανείς επιστήμονες της εποχής, λόγω της πολύ ισχυρής επιχειρηματολογίας της, η μεγαλόπνοη δαρβινική ιδέα της «Φυσικής Επιλογής» θα είχε μια ταραχώδη ιστορία. Αμφότεροι ο Δαρβίνος και ο Wallace συνέλαβαν τη ρηξικέλευθη έννοια της φυσικής επιλογής σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα, αλλά και οι δύο από κοινού στηρίχτηκαν σε ίδια δεδομένα και κατέληξαν σε κοινά συμπεράσματα. Η φυσική επιλογή είναι ένας από τους διάφορους μηχανισμούς που μπορούν να προκαλέσουν γενετικές αλλαγές στους φυσικούς πληθυσμούς. Είναι όμως ο κύριος μηχανισμός μέσω του οποίου οι οργανισμοί ανταποκρίνονται στις αλλαγές του περιβάλλοντος. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως η φυσική επιλογή δεν είναι

εργαλείο στην εξυπηρέτηση κανενός σκοπού (Futuyma, 1995). Η φυσική επιλογή λοιπόν είναι ένας απλός μηχανισμός, όπως π.χ. η βαρύτητα, δεν μπορεί να προβλέψει ούτε να υπακούσει σε σκοπιμότητες, οραματισμούς ή ηθικές επιταγές. Είναι απλώς το στατιστικό αποτέλεσμα του αναμφισβήτητου γεγονότος ότι επειδή τα άτομα-μέλη ενός πληθυσμού δεν είναι πανομοιότυπα οι οποιοσδήποτε διαφορές τους θα οδηγήσουν τελικά σε διαφορές επιβίωσης και αναπαραγωγής ή διαφορετικά διαφορετικές αρμοστικότητες που οδηγούν στην προσαρμογή των πιο κατάλληλων (αρμοστικότερων) ατόμων. Οι διαφορές δεν «οδηγούν» στη φυσική επιλογή, *αποτελούν* τη φυσική επιλογή. Η φυσική επιλογή όπως προαναφέρθηκε, είναι η μόνη διεργασία που «προσαρμόζει» τον πληθυσμό στο διαρκώς μεταβαλλόμενο περιβάλλον του και ευκαιρίες για δράση της φυσικής επιλογής υπάρχουν όπου υπάρχουν φαινοτυπικές διαφορές που όμως μεταφράζονται σε διαφορές βιωσιμότητας και γονιμότητας. Για να φέρει αποτέλεσμα η επιλογή θα πρέπει να έχει γενετική βάση. Το γενετικό πλεονέκτημα δεν είναι απαραίτητο να εκφράζεται σε όλα τα άτομα στον ίδιο βαθμό, αρκεί να επηρεάζει την αρμοστικότητα του γονοτύπου. Μπορούμε να διακρίνουμε τρεις μορφές φυσικής επιλογής ανάλογα με τη σχέση μεταξύ φαινοτυπικής τιμής και αρμοστικότητας. Η μια είναι η κατευθύνουσα επιλογή, κατά την οποία ο ακραίος φαινότυπος έχει μεγαλύτερη αρμοστικότητα, οπότε και ευνοείται. Άλλη μορφή φυσικής επιλογής είναι η σταθεροποιούσα, κατά την οποία οι μέσες φαινοτυπικές τιμές έχουν μεγαλύτερη αρμοστικότητα από τις ακραίες, μειώνοντας τη συχνότητα των ακραίων φαινοτύπων και ευνοώντας τους μέσους φαινότυπους. Τέλος, υπάρχει και η διαφοροποιούσα ή διασπαστική επιλογή, η οποία ευνοεί τους δύο ακραίους φαινότυπους και δρα εναντίον των ενδιάμεσων τιμών. Επιπλέον υπάρχει η συχνο-εξαρτώμενη επιλογή, όπου η αρμοστικότητα ενός φαινοτύπου εξαρτάται από τη σχετική του συχνότητα μέσα στον πληθυσμό. Ένα παράδειγμα κατευθύνουσας επιλογής είναι ο βιομηχανικός μελανισμός της νυχτοπεταλούδας *Biston betularia*. Το είδος αυτό απαντά σε δυο χρώματα, το γκρίζο και το μαύρο. Από συλλογές μουσειών είναι γνωστό ότι πριν από τη Βιομηχανική Επανάσταση η συχνότητα της μαύρης μορφής στην Αγγλία ήταν περίπου 1%. Σε μερικές βιομηχανικές περιοχές είναι σήμερα πάνω από 90%. Οι δυο φαινότυποι καθορίζονται από δυο αλληλόμορφα και το μαύρο αλληλόμορφο είναι μερικώς (όχι πλήρως) επικρατές επί του γκρίζου. Από τον ρυθμό αντικατάστασης του γκρίζου από το μαύρο, υπολογίσθηκε ότι η μαύρη μορφή έχει 50% υψηλότερη βιωσιμότητα έναντι της γκρίζας (Futuyma, 1995). Σύμφωνα με τις παρατηρήσεις του Kettlewell (1955), η αλλαγή αυτή οφείλεται στη δράση της κατευθύνουσας επιλογής με τη μεσολάβηση των πουλιών που δύσκολα αναγνωρίζουν τις σκουρόχρωμες μορφές πάνω στα μαυρισμένα από τη ρύπανση κλαδιά και κορμούς δέντρων. Οι σκουρόχρωμες νυχτοπεταλούδες χάρη στο χρώμα τους καμουφλάρονται, επιβιώνουν και πολλαπλασιάζονται. Απεναντίας, οι ανοιχτόχρωμες που στις περιόδους πριν τη ρύπανση

μπορούσαν να κρύβονται καθώς αναπαύονται σε κορμούς και κλαδιά δέντρων που φυσιολογικά είναι καλυμμένα με γκριζους λειχήνες, τώρα διακρίνονται ευκολότερα και εξολοθρεύονται από τα πουλιά (εικόνα 1). Η μαύρη μορφή δεν έχει πλήρως εκτοπίσει τη γκριζα και είναι φανερό ότι οι δυνάμεις της επιλογής είναι πιο πολύπλοκες, αφού υπάρχουν διαφορές βιωσιμότητας ακόμη και στην περίπτωση που η θήρευση από πουλιά είναι μηδαμινή (Lees, 1981). Η περίπτωση της *Biston betularia* και ορισμένων άλλων ειδών είναι παραδείγματα ταχέων μεταβολών που έχει προκαλέσει σε πολλά είδη η αλλαγή του περιβάλλοντος από τον άνθρωπο (Bishop and Cook, 1981).



Εικόνα 1. Νυχτοπεταλούδες που αναπαύονται σε τρεις διαφορετικούς κορμούς δέντρων. (πάνω) Δυο πεταλούδες, μια γκριζα και μια μαύρη, σε ένα δέντρο οξιάς καλυμμένο από έναν συνδυασμό πράσινης άλγης και λειχήνων κοντά στην βιομηχανική πόλη του Λίβερπουλ (κάτω αριστερά) Οι ίδιες πεταλούδες πάνω στον σκούρο κορμό μιας παρακείμενης βελανιδιάς. (κάτω δεξιά) Δυο πεταλούδες μια γκριζα και μια μαύρη, που στέκονται σε ανοιχτού χρώματος λειχήνες πάνω σε μια βελανιδιά στην αγροτική Ουαλία. Οι σημαντικές διαφορές όσον αφορά την αποτελεσματικότητα του καμουφλάζ είναι ευδιάκριτες (Wells J., 1999).

Αν η κατευθύνουσα επιλογή είναι ο κανόνας στη φύση και ένας ομόζυγος γενότυπος έχει πάντα μεγαλύτερη αρμοστικότητα, το τελικό αποτέλεσμα θα είναι ο γενετικός μονομορφισμός. Ωστόσο, ξέρουμε ότι σχεδόν όλοι οι φυσικοί πληθυσμοί εμπεριέχουν μεγάλα ποσά γενετικής ποικιλομορφίας. Εξηγήσεις που δίνονται για αυτή την «αντίφαση» μπορούν να είναι είτε η ισορροπία

μεταξύ επιλογής και μετάλλαξης, που το έργο της επιλογής αντισταθμίζεται από τη δράση των μεταλλάξεων, είτε η γονιδιακή ροή με τη δράση της να αντισταθμίζει το έργο της επιλογής, είτε ότι η επιλογή δρα κατά τέτοιο τρόπο ώστε να επιβάλλει στον πληθυσμό έναν εξισορροπημένο πολυμορφισμό. Η πιο απλή μορφή φυσικής επιλογής που οδηγεί στη δυναμική διατήρηση ενός πολυμορφισμού είναι η επιλεκτική κυριαρχία του ετεροζυγώτη και είναι επίσης γνωστή ως επιλεκτική υπερκυριαρχία ή ετέρωση. Αν η αρμοστικότητα των ετεροζυγωτών είναι μεγαλύτερη από αυτή των δυο ομοζυγωτών, είναι φανερό ότι και οι τρεις γενότυποι θα συνυπάρχουν στον πληθυσμό, αφού οι ομοζυγώτες που απομακρύνονται από τη φυσική επιλογή επανέρχονται μέσω της διασταύρωσης των ετεροζυγωτών. Η καλύτερα διαπιστωμένη και μελετημένη περίπτωση επιλεκτικής υπερκυριαρχίας για ένα συγκεκριμένο γενετικό τόπο είναι η δρεπανοκυτταρική αναιμία. Άτομα ομόζυγα για τη μορφή Hb^S της β αιμοσφαιρίνης υποφέρουν από σοβαρή αναιμία και συνήθως πεθαίνουν πριν από την ηλικία της αναπαραγωγής. Τα ετεροζυγωτικά άτομα έχουν μια αναιμία ήπιας μορφής, όμως σε περιοχές του κόσμου όπου η ελονοσία ήταν ενδημική, η κατά μέσο όρο βιωσιμότητά τους ήταν ανώτερη των ομοζυγωτών για το κανονικό γονίδιο Hb^A με αποτέλεσμα την αυξημένη συχνότητα γεννήσεων ατόμων με δρεπανοκυτταρική αναιμία σε χώρες της δυτικής Αφρικής. Άλλες αιμοσφαιρινικές μεταλλάξεις όπως η Hb^C και οι θαλασαιμίες φαίνεται να οφείλουν τη διαίωσή τους επίσης στο ότι προσφέρουν ένα είδος αντοχής έναντι της ελονοσίας (Futuyma, 1995).

Η έννοια της προσαρμογής είναι μια από τις αρχικές ιδέες στην εξελικτική βιολογία, καθώς ο Δαρβίνος ασχολήθηκε κατά κύριο λόγο με την απόδοση μιας επιστημονικής εξήγησης για το φαινόμενο αυτό με τη δική του εξελικτική θεωρία μέσω της γενετικής ποικιλότητας και της φυσικής επιλογής (Bock, 1980). Στην εξελικτική βιολογία η προσαρμογή είναι ένας χαρακτήρας που έχει σχηματιστεί από τις ειδικές δυνάμεις της φυσικής επιλογής, οι οποίες δρουν πάνω στη γενετική ποικιλότητα του πληθυσμού αυξάνοντας την αρμοστικότητα του οργανισμού στις επόμενες γενιές. Όπως και η ετυμολογία της λέξης υποδηλώνει, μια προσαρμογή κάνει τον φορέα της περισσότερο κατάλληλο, ταιριαστό (αρμοστικότερο) προς κάτι. Για παράδειγμα ο προστατευτικός (κρυπτικός) χρωματισμός είναι συνήθως μια προσαρμογή του θηράματος για την αποφυγή του θηρευτή (Εικόνα 2). Ανάλυση της προσαρμογής σημαίνει επομένως να αποδείξουμε ότι ο χαρακτήρας έχει σχηματιστεί από τη φυσική επιλογή και να εξειδικεύσουμε τη φύση του επιλεκτικού παράγοντα (ή παραγόντων) (Futuyma D.J., 1995).



Εικόνα 2. Δημιουργία camouflage μετά από εξελικτική προσαρμογή του θηράματος για την αποφυγή του θηρευτή. Ο βάτραχος της εικόνας είναι σχεδόν αόρατος ανάμεσα στα νεκρά φύλλα μέσα στο τροπικό δάσος του Αμαζονίου στην Βραζιλία.

Δεν είναι όλοι χαρακτήρες των οργανισμών προσαρμογές. Το κρίσιμο ερώτημα που ανακύπτει είναι με ποιο τρόπο μπορεί κανείς να προσδιορίσει εάν ένας χαρακτήρας είναι πράγματι προσαρμογή ή όχι. Καταλήγουμε να θεωρούμε τους σύνθετους χαρακτήρες σαν πιθανότερες προσαρμογές, γιατί η πολυπλοκότητα απαιτεί κάποια οργανωτική δύναμη, όπως είναι η επιλογή. Το πόσο σύνθετος είναι ένας χαρακτήρας μετράται πολύ δύσκολα και συχνά σχετίζεται με την πείρα του ερευνητή, ενώ άλλες φορές η προσαρμογή δεν είναι σύνθετος χαρακτήρας. Άλλο πρόβλημα στην αναγνώριση της προσαρμογής αποτελεί η δυσκολία να αποδειχθεί ότι ο χαρακτήρας έχει κάποια λειτουργία. Σε πολλές περιπτώσεις, η προσαρμογή προϋποθέτει τη συμφωνία του τελικού σχήματος μιας δομής με τις προδιαγραφές του σχεδίου που θα καθόριζε ένας μηχανικός, ώστε να επιτελεί μια συγκεκριμένη λειτουργία. Για παράδειγμα, τα στενά αιχμηρά φτερά του κινηγετικού γερακιού συμφωνούν με τις αεροδυναμικές προδιαγραφές που απαιτούνται για μια γρήγορη πτήση. Αντιθέτως, τα κοντά και στρογγυλά φτερά του αστούριου είναι από αεροδυναμική άποψη κατάλληλα για ευελιξία και για μεγαλύτερες επιταχύνσεις. Η συγκριτική μέθοδος χρησιμοποιείται ευρύτατα από τότε που την εισήγαγε ο Δαρβίνος. Μια προσαρμογή μπορεί να αποκαλυφθεί όταν συσχετισθούν οι διαφορές μεταξύ των ειδών με οικολογικούς παράγοντες. Η μέθοδος αυτή είναι βοηθητική περισσότερο σε περιπτώσεις που υπάρχει τάση για εξελικτική σύγκλιση. Παραδείγματος χάριν, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η φυλλόπτωση είναι μια συχνή προσαρμογή στις ξερικές συνθήκες, επειδή επικρατεί σε πολλά φυτά της ερήμου που δεν

είναι συγγενή μεταξύ τους. Η συγκριτική μέθοδος χρησιμοποιείται καλύτερα σε συνδυασμό με τη φυλογενετική ανάλυση, για την απόρριψη της πιθανότητας τα είδη που μελετώνται να έχουν κάποιο κοινό πρόγονο, εφόσον αυτά τα είδη δεν μπορούν να δώσουν ανεξάρτητες ενδείξεις για το εάν οι χαρακτήρες τους είναι προσαρμογές ή όχι. Τέτοιες συγκριτικές μελέτες βοηθούν να βγάλουμε συμπεράσματα για την τιμή της αρμοστικότητας των χαρακτήρων, όμως αναγκαίες και άμεσες αποδείξεις μπορούν να προέλθουν μόνο από πειραματικές μελέτες ή από σαφείς αναλύσεις αρμοστικότητας. Σε αρκετές περιπτώσεις πάντως, ούτε οι πειραματικές μέθοδοι αποδεικνύουν εάν ένας χαρακτήρας έχει εξελιχθεί για κάποια ιδιαίτερη λειτουργία ή όχι. Το πρόβλημα εδώ είναι ότι ένας χαρακτήρας μπορεί να μπορεί να παρουσιάσει επιδράσεις άσχετες με την κύρια λειτουργία του. Ένα τέτοιο παράδειγμα αποτελούν ορισμένες φυτικές χημικές ενώσεις, όπως είναι τα τερπένια και τα αλκαλοειδή. Έχει αποδειχθεί ότι αυτά συχνά απωθούν ή δηλητηριάζουν φυτοφάγα έντομα. Αρκετοί ερευνητές όμως υποστηρίζουν ότι οι ενώσεις αυτές μπορεί να έχουν άλλες λειτουργίες στη φυσιολογία του οργανισμού ή να είναι απλώς άχρηστα παράγωγα του μεταβολισμού και η οποιαδήποτε επίδρασή τους στα έντομα να είναι απλώς τυχαία (Futuyma, 1995).

Η προσαρμογή είναι και ήταν πάντα μια ολισθηρή έννοια (Reeve and Sherman, 1995). Η θολερότητα αυτής της όχι πλήρως διασαφηνισμένης έννοιας σε συνδυασμό με το κύρος που άρχισε να αποκτά η θεωρία της φυσικής επιλογής είχε ως αποτέλεσμα να έχει θεωρηθεί από κάποιους η προσαρμογή ως η μοναδική επίδραση πάνω στην εξέλιξη και κάποιοι βιολόγοι να έχουν επικαλεστεί τη φυσική επιλογή για να εξηγήσουν σχεδόν κάθε φαινοτυπική διαφορά (Travisano et al, 1995). Υπήρξαν εξηγήσεις με ελάχιστη έρευνα των διαθέσιμων ενδείξεων και των εναλλακτικών μη προσαρμοστικών ερμηνειών. Υπήρξαν πολλοί τέτοιοι αβάσιμοι ισχυρισμοί, που χαρακτηρίστηκαν από τον Lewontin (1977) ως «επιπόλαιος Δαρβινισμός». Για παράδειγμα, κάποιοι συγγραφείς πρότειναν ότι οι γυναίκες τείνουν να μεταφέρουν τα μωρά τους στο αριστερό τους χέρι γιατί τα παιδιά ηρεμούν με τον ήχο της καρδιάς της μητέρας τους (Futuyma, 1995). Οι Gould και Lewontin (1979) παρουσίασαν μια γενικευμένη εικόνα και λεπτομερή ανάλυση μιας ανεπιτυχούς έρευνας στην οποία έδωσαν τον όρο «προσαρμογιστικό πρόγραμμα». Μια από τις πηγές των εσφαλμένων κρίσεων είναι ότι οι ερευνητές συνήθως πιστεύουν ότι κάθε ιδιαίτερο χαρακτηριστικό ενός ζώου είναι προσαρμοστικό, εξ' ορισμού όπως υποστηρίζουν, και είναι αρκετό να βρουν κάποια αιτία αυτού του προσαρμοστικού αποτελέσματος για να θεωρηθεί το πρόβλημα λυμένο. Το επόμενο χαρακτηριστικό του «προσαρμογιστικού προγράμματος» είναι η τάση να θεωρεί ένα επιφαινόμενο σαν πρωτογενή προσαρμογή. Ένα σταθερά προσαρμοστικό σύστημα συσσωρεύεται κατά τη διάρκεια της εξέλιξης επί μεγάλο χρονικό διάστημα, σταδιακά. Το να ελπίζει κάποιος ότι, έχοντας

προσφέρει μια εκδοχή του αιτίου της προσαρμογής, είναι πιθανό να «αποκρυπτογραφήσουν» την πηγή προέλευσης της σε ένα βήμα είναι αφελές, ειδικότερα από τη στιγμή που σε πολλές περιπτώσεις είναι συγκαλυμμένη από την αποπροσανατολιστική άμεση ωφελιμότητα (Dzerzhinskii, 2010).

Η προσαρμογή είναι μια ειδική και δύσκολη έννοια και δεν θα πρέπει να χρησιμοποιείται ανώφελα. Όταν αναγνωρίζεται, η προσαρμογή δεν θα πρέπει να αποδίδεται ως χαρακτηριστικό όταν δεν επαρκούν οι προαπαιτούμενες αποδείξεις (Williams, 1966). Ολόκληρη η βιολογία μας υποχρεώνει να αναγνωρίσουμε ότι πολλοί χαρακτήρες δεν είναι προσαρμοστικοί και ότι τα είδη μπορεί να διαφέρουν και για άλλες αιτίες εκτός από τη φυσική επιλογή (Futuyma, 1995). Δυο εναλλακτικοί παράγοντες μέσω των οποίων μπορούν να εξηγηθούν οι διαφορές στους οργανισμούς είναι η τύχη και η ιστορία. Οι επιδράσεις της τύχης περιλαμβάνουν τις μεταλλάξεις και την γενετική παρέκκλιση, η οποία διέπει την εμφάνιση και την ακόλουθη απομάκρυνση ή εγκαθίδρυση των νέων χαρακτηριστικών. Η τύχη συνήθως επικαλείται στο πλαίσιο των μοριακών γενετικών χαρακτηριστικών που είναι επιλεκτικά ουδέτερα. Ωστόσο η τύχη είναι το ίδιο σημαντική και για την εξέλιξη, διότι ωφέλιμες μεταλλάξεις προκύπτουν συμπτωματικά και μπορεί να χαθούν αμέσως μετά την εμφάνισή τους, ακόμα και στους μεγάλους πληθυσμούς. Οι επιδράσεις της ιστορίας ενδεχομένως να περιορίζουν ή να προωθούν συγκεκριμένα εξελικτικά αποτελέσματα σύμφωνα με την γενετική και αναπτυξιακή ενσωμάτωση του προγονικού φαινοτύπου. Κατά αυτή την άποψη το σύνολο των πιθανών προσαρμογών περιορίζεται σημαντικά από την κληρονομούμενη ιδιοσυστασία, με τέτοιο τρόπο που η πορεία της εξέλιξης εξαρτάται από προγενέστερα (ιστορικά) συμβάντα (Travisano et al, 1995).

Η προσαρμογή μπορεί να παρατηρηθεί σε διάφορα επίπεδα, από το επίπεδο του γονιδίου έως το επίπεδο του πληθυσμού, μέσω της αντίστοιχης επιλογής σε κάθε ένα από αυτά τα επίπεδα. Υπάρχει μια έντονη διαμάχη για το κατά πόσον είναι δυνατή η επικράτηση προσαρμογών στο επίπεδο της ομάδας. Ο λόγος είναι ότι ο ρυθμός με τον οποίο αλλάζει η συχνότητα των αλληλομόρφων στην ατομική επιλογή είναι συνήθως πολύ μεγαλύτερος από τον ρυθμό αλλαγής στο επίπεδο της ομάδας. Αυτό συμβαίνει γιατί ο αριθμός των ατόμων είναι πάντα πολύ μεγαλύτερος από τον αριθμό των πληθυσμών.

Συνοψίζοντας, η προσαρμογή είναι μια δύσκολη και αμφιλεγόμενη έννοια και η προσαρμοστική αξία ενός χαρακτήρα θα πρέπει να αποδεικνύεται παρά να θεωρείται δεδομένη. Αυτό συμβαίνει διότι εκτός από την προσαρμογή, πολυάριθμοι άλλοι παράγοντες είναι δυνατόν να επηρεάσουν την εξέλιξη ενός χαρακτήρα (Futuyma, 1995).

I.1.2. Προσαρμογή εξωτικών ειδών σε νέα περιβάλλοντα

Η αρμοστικότητα εξαρτάται όχι μόνο από ένα συγκεκριμένο γενότυπο, αλλά επίσης στο περιβάλλον μέσα στο οποίο υπάρχει ο γενότυπος αυτός. Παραδείγματος χάριν, σε ένα περιβάλλον η αρμοστικότητα ενός συγκεκριμένου γενότυπου μπορεί να είναι υψηλή, ενώ σε ένα άλλο περιβάλλον ο ίδιος γενότυπος να παρουσιάζει χαμηλή αρμοστικότητα. Περιβαλλοντικοί παράγοντες που ενδεχομένως να επηρεάζουν την αρμοστικότητα είναι φυσικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η υγρασία και ο τύπος του εδάφους, βιοτικοί παράγοντες όπως ο ενδοειδικός ανταγωνισμός, η σχέση θηρευτή και θηράματος, η σχέση ξενιστή και παράσιτου, και η σύνθεση του πληθυσμού που εξετάζεται ως προς τον αριθμό του πληθυσμού, την ηλικιακή κατανομή και τις αναλογίες των γονοτύπων. Σαν πρώτο βήμα για την εισαγωγή τέτοιων οικολογικών επιπτώσεων, υποθέτουμε ότι οι επιλεκτικές τιμές εξαρτώνται από το περιβάλλον και ότι το περιβάλλον μπορεί να διαφοροποιείται με το χρόνο ή στο χώρο. Μια τέτοια ανάλυση είναι ιδιαίτερα ενδεδειγμένη για την εξέταση των φυσικών οικολογικών παραγόντων. Δεύτερον, μελετούμε τις επιλεκτικές επιδράσεις διαφορετικών γονοτυπικών συχνοτήτων μέσα σε έναν πληθυσμό, που αυτό είναι η συχνο-εξαρτώμενη επιλογή. Οι επιλεκτικοί παράγοντες που προκαλούν διαφορική επιλογή σε αυτή την περίπτωση μπορεί να είναι άλλοι οργανισμοί θηρευτές, θηράματα, ξενιστές ή παράσιτα. Αρκετές προσεγγίσεις και μελέτες έχουν δείξει προφανείς συσχετισμούς μεταξύ γενετικής ποικιλότητας και περιβαλλοντικών παραγόντων. Βεβαίως τέτοιοι συσχετισμοί δεν συνεπάγονται πως το γενετικό μοτίβο προκαλείται από τον περιβαλλοντικό παράγοντα, εκτός εάν επιπρόσθετες αποδείξεις υποστηρίζουν μια σχέση αιτίου-αποτελέσματος. Εντούτοις κάποια παραδείγματα φέρουν επιπρόσθετες υποστηρικτικές αποδείξεις που συνάδουν με την υπόθεση ότι διαφορετικές επιλεκτικές πιέσεις πραγματικά λαμβάνουν χώρα σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Ένας από τους πιο διεξοδικά μελετημένους πολυμορφισμούς είναι αυτός του χρώματος και των μοτίβων των ζωνών που εμφανίζονται στο κέλυφος του σαλιγκαριού *Cepaea nemoralis* (εικόνα 3), αλλά ακόμα και σε αυτή την περίπτωση ο γενετικός- περιβαλλοντικός δεσμός δεν έχει κατανοηθεί πλήρως. Στο χερσαίο σαλιγκάρι *Cepaea nemoralis*, μια σειρά μεντελικών πολυμορφισμών που επηρεάζει τους χρωματισμούς των κελυφών και το μοτίβο των ζωνώσεων, φαίνεται να διατηρείται σε διαφορετικές περιοχές. Μελέτες υπέδειξαν ότι ο πολυμορφισμός διατηρείται λόγω της διαφορετικής θήρευσης από πουλιά, ιδιαιτέρως από τσίχλες, των σαλιγκαριών των οποίων τα χρώματα και οι ζωνώσεις στα κελύφη τους δεν ταιριάζουν κατάλληλα με το πλαίσιο των ενδιαιτημάτων τους. Για παράδειγμα, καφέ χωρίς ζωνώσεις σαλιγκάρια κρύβονται προστατευτικά σε σκούρο χώμα, ενώ κίτρινα με ζωνώσεις αναμιγνύονται οπτικά με τους μίσχους πολλών φυτών. Ωστόσο η επιλεκτική

θήρευση δεν εξηγεί ολοκληρωτικά την παρουσία αυτών των πολυμορφισμών, π.χ. σε μερικές περιοχές, οι μορφολογικές συχνότητες είναι ομοιόμορφες παρά την έκδηλη περιβαλλοντική ετερογένεια. Έχει προταθεί ότι αυτά τα φαινόμενα, οφείλονται επίσης στην περιβαλλοντική ετερογένεια των κλιματικών παραγόντων που επηρεάζουν τις ποικίλες μορφές διαφορετικά. Οι διαθέσιμες αποδείξεις υποδηλώνουν ότι η διατήρηση των πολυμορφισμών των κελυφών στο *Cepaea nemoralis* οφείλεται σε μια σύνθετη αλληλεπίδραση της περιβαλλοντικής ετερογένειας με τους γενετικούς παράγοντες και ότι η σχετική σπουδαιότητα των διαφορετικών παραγόντων διαφέρει από τοποθεσία σε τοποθεσία.



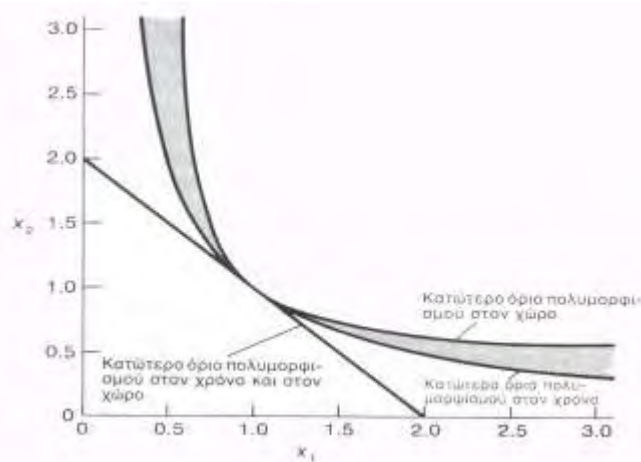
Εικόνα 3. Τα χρώματα και τα μοτίβα των ζωνών του κελύφους του σαλιγκαριού *Cepaea nemoralis*.

Στο κλασικό, των δυο αλληλομόρφων, μοντέλο της σταθερής αρμοστικότητας μόνο όταν οι αρμοστικότητες των ομοζυγωτών είναι μικρότερες από ότι αυτή του ετεροζυγώτη υπάρχει σταθερό ισοζύγιο. Γενικά, τέτοια μοντέλα επιλογής που οδηγούν στη διατήρηση ενός πολυμορφισμού αποκαλούνται μοντέλα εξισορροπητικής επιλογής. Αυτά τα μοντέλα περιλαμβάνουν και αυτό του ετεροζυγωτικού πλεονεκτήματος (Hedrick, 2000).

Η ετερογένεια του περιβάλλοντος μπορεί να οδηγήσει σε εξισορροπημένους πολυμορφισμούς, αλλά μόνο κάτω από ορισμένες συνθήκες. Ας υποθέσουμε ότι ένα έντομο έχει δυο γενιές το χρόνο, μια την άνοιξη και μια το φθινόπωρο και ότι οι αρμοστικότητες των τριών γενοτύπων είναι οι εξής:

| | AA | AA' | A'A' |
|-----------|-----|-----|------|
| Άνοιξη | 1,0 | 0,8 | 0,6 |
| Φθινόπωρο | 0,7 | 0,9 | 1,0 |

Στην περίπτωση αυτή η συχνότητα του αλληλομόρφου A' θα επαλειφθεί από τον πληθυσμό, γιατί το επιλεκτικό μειονέκτημά του στην ανοιξιότικη γενιά είναι μεγαλύτερο από το μειονέκτημα του A στην φθινοπωρινή. Αφού δεν υπάρχει μηχανισμός στη φύση που να εγγυάται την ακριβή εξισορρόπηση των επιλεκτικών πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων, συμπεραίνουμε ότι οι τυχαίες διακυμάνσεις των συντελεστών επιλογής δεν μπορούν να οδηγήσουν στη διατήρηση των πολυμορφισμών (εικόνα 5), αν και μπορούν βέβαια να επιβραδύνουν την εξαφάνισή τους. Για παράδειγμα, οι συχνότητες των χρωμοσωμικών αναστροφών της *Drosophila pseudoobscura* περνούν από εποχιακές διακυμάνσεις, αλλά οι δυνάμεις επιλογής για τις διακυμάνσεις αυτές δεν μπορούν να εξηγήσουν τη διατήρηση του πολυμορφισμού.



Εικόνα 4. Οι συνθήκες για σταθερό πολυμορφισμό λόγω περιβαλλοντικής ετερογένειας (πολλαπλές οικοθέσεις ή διακυμάνσεις του περιβάλλοντος). Οι σχετικές αρμοστικότητες των γονοτύπων AA , AA' και $A'A'$ είναι 1, 1 και x_1 στο περιβάλλον 1 και 1, 1 και x_2 στο περιβάλλον 2. Οι συνδυασμοί των x_1 και x_2 που αντιστοιχούν στις σκιασμένες περιοχές οδηγούν σε σταθερούς πολυμορφισμούς. Τέτοιοι συνδυασμοί είναι λιγότεροι όταν οι συντελεστές της επιλογής ποικίλουν στο χρόνο παρά στο χώρο.

Αν εξετάσουμε τώρα μια περίπτωση που το περιβάλλον αλλάζει στο χώρο αντί στο χρόνο, πρέπει να υποθέσουμε ότι έχουμε δυο γεωγραφικές περιοχές στις οποίες οι αρμοστικότητες των τριών γονοτύπων είναι

| | AA | AA' | $A'A'$ |
|-----------|------|-------|--------|
| Περιοχή 1 | 1,0 | 0,9 | 0,8 |
| Περιοχή 2 | 0,8 | 0,9 | 1,0 |

Αν οι δυο πληθυσμοί δεν ανταλλάσσουν μετανάστες, το αλληλόμορφο Α θα επικρατήσει στην πρώτη περιοχή και το αλληλόμορφο Α' στη δεύτερη. Σε περίπτωση όμως που υπάρχει γονιδιακή ροή μεταξύ των πληθυσμών, τότε, καθώς το ποσοστό των μεταναστών αυξάνει, η τύχη του πολυμορφισμού εξαρτάται από τη συνδυασμένη δράση των επιλεκτικών τιμών και στα δυο περιβάλλοντα. Γενικά η περιβαλλοντική ετερογένεια τείνει να διατηρήσει τον πολυμορφισμό ευκολότερα αν είναι αδρής παρά λεπτής κατανομής και γενικά αν το περιβάλλον ποικίλει στο χώρο παρά στο χρόνο. Σε όλες τις περιπτώσεις βασική προϋπόθεση είναι ότι οι διαφορές στην αρμοστικότητα είναι αρκετά μεγάλες και ότι κυμαίνονται μέσα σε όρια που καθορίζονται από τη συχνότητα των περιβαλλοντικών διακυμάνσεων. Αν τα όρια αυτά παραβιασθούν, ολόκληρος ο πληθυσμός θα οδηγηθεί στο μονομορφισμό για το ένα ή το άλλο αλληλόμορφο (Futuyma, 1995).

Μερικοί από τους διάφορους γνωστούς πολυμορφισμούς, για τους οποίους η περιβαλλοντική διακύμανση φαίνεται να έχει κυρίαρχη σημασία έχουν μελετηθεί λεπτομερώς. Μια τέτοια περίπτωση είναι η πεταλούδα *Papilio demodocus* (Clarke et al., 1963) (εικόνα 5). Οι κάμπιες του είδους αυτού που ζουν σε φυτά με σκιάδιο έχουν κατά κανόνα διαφορετικούς χρωματισμούς από τις κάμπιες που ζουν σε εσπεριδοειδή. Ο πολυμορφισμός οφείλεται στο ότι οι χρωματισμοί προσδίδουν μεγαλύτερη κρυπτική προστασία έναντι των θηρευτών (Futuyma, 1995).



Εικόνα 5. Δύο μορφές της προνύμφης της πεταλούδας *Papilio demodocus*. Η κάθε μορφή φαίνεται ότι υπόκειται σε ασθενέστερη θήρευση όταν βρίσκεται πάνω σε φυτά του τύπου στα οποία συνήθως συναντάται στη φύση.

Είναι φανερό ότι πρόσθετοι παράγοντες μπορούν να επιτείνουν τη σημασία της περιβαλλοντικής ετερογένειας στη διατήρηση της γενετικής ποικιλότητας στους φυσικούς πληθυσμούς. Έχει προαναφερθεί ήδη το συχνό-εξαρτώμενο μοντέλο της επιλογής, όπου η αρμοστικότητα ενός γονοτύπου εξαρτάται από τη συχνότητά του. Είναι πιθανόν η αρμοστικότητα του

γονοτύπου να αυξηθεί (θετικά εξαρτώμενη από τη συχνότητα) ή να μειωθεί (αρνητικά εξαρτώμενη από τη συχνότητα), καθώς η συχνότητα των γονοτύπων μέσα στον πληθυσμό αυξάνεται. Η επιλογή αυτή θεωρείται σαν ένας από τους πιο κοινούς και πιο σημαντικούς μηχανισμούς για τη διατήρηση σπουδαιών πολυμορφισμών, όπως εκείνων που καθορίζουν τις σχέσεις μεταξύ των μελών ενός πληθυσμού. Για παράδειγμα, αν δυο διαφορετικοί γονότυποι είναι εξειδικευμένοι στην αξιοποίηση διαφορετικών τύπων τροφής, ο ανταγωνισμός δίνει το προβάδισμα στον γονότυπο που είναι σπανιότερος σε σχέση με το ποσό της τροφής για την οποία είναι καταλληλότερος. Το μοντέλο της επιλογής αυτού του τύπου προϋποθέτει κάποια περιβαλλοντική ετερογένεια. Η διατήρηση του πολυμορφισμού γίνεται ακόμη ευκολότερη, αν τα άτομα των διαφόρων γονοτύπων αναζητούν ενεργά το περιβάλλον στο οποίο έχουν την μεγαλύτερη αρμοστικότητα. Το κύριο πρόβλημα στην περίπτωση αυτή είναι αν τα γονίδια που καθορίζουν αυτή την ικανότητα ανεύρεσης του καταλληλότερου περιβάλλοντος επίσης ευθύνονται για την προσαρμογή στο περιβάλλον αυτό. Ένα παράδειγμα επιλογής περιβάλλοντος είναι γνωστό στη νυχτοπεταλούδα *Biston betularia*, όπου παρατηρήθηκε ότι η μαύρη μορφή προτιμά μαύρες επιφάνειες, ενώ η γκριζα ανοιχτόχρωμες.

Ένα βασικό αντικείμενο της εξελικτικής βιολογίας είναι η κατανόηση των προσαρμογών σε πληθυσμούς που αντιμετωπίζουν νέα περιβάλλοντα. Γενετικές ποικιλομορφίες που έχουν επιλεγεί για το πλαίσιο των νέων συνθηκών έχουν διαφορετικές ιδιότητες ανάλογα με το αν είναι συνδεδεμένες με αρνητικές πλειοτροπικές επιδράσεις. Οι αρνητικές πλειοτροπικές επιδράσεις μπορεί στη συνέχεια να μειωθούν από τη φυσική επιλογή. Η μείωση αυτή, που ονομάζεται "βελτίωση" των επιβλαβών πλειοτροπικών επιπτώσεων από τους Cohan et al. (1994), θα μπορούσε να επιτευχθεί με δύο τρόπους: την αντικατάσταση του αλληλομόρφου και την αντιστάθμιση της δράσης του αλληλομόρφου. Στην πρώτη περίπτωση, μια προσαρμοστική μετάλλαξη με λιγότερο επιβλαβείς πλειοτροπικές επιπτώσεις εκτιμάται ότι θα αντικαταστήσει την προηγούμενη μετάλλαξη και θα οδηγήσει στην εγκαθίδρυσή της στον πληθυσμό. Η άλλη περίπτωση αντιστοιχεί με την εμφάνιση και την επιλογή ενός ή περισσότερων νέων γονιδίων που τροποποιούν ή αντισταθμίζουν το κόστος αρμοστικότητας. Αυτοί οι δύο τρόποι εξέλιξης, οι οποίοι έχουν προταθεί από τους Haldane (1932) και Fisher (1928; 1958), αντιστοιχώς, έχουν αποδειχθεί σε λίγες μόνο βιολογικές περιπτώσεις (π.χ., στο βακτήριο *Escherichia coli* από τους Lenski et al. 1988 και στο βακτήριο *Bacillus subtilis* από τους Cohan et al. 1994).

I.2. Το κόστος αρμοστικότητας

I.2.1. Ορισμός

Ένα σύνολο μονάδων που έχουν την ικανότητα της αναπαραγωγής και που διαφέρουν η μια από την άλλη, έτσι ώστε οι διαφορές τους να επηρεάζουν τους ρυθμούς της αναπαραγωγής τους, έχει θεωρητικά τις προϋποθέσεις για τη δράση της φυσικής επιλογής. Στο βιολογικό κόσμο τέτοιες μονάδες είναι το γονίδιο, το χρωμόσωμα, το κύτταρο, το άτομο, ο πληθυσμός και το είδος. Την κύρια μονάδα δράσης της φυσικής επιλογής, βέβαια, αποτελεί το άτομο. Σε έναν πληθυσμό οι γονότυποι των ατόμων που τον αποτελούν διαφέρουν ως προς την επιλεκτική τους τιμή ή αρμοστικότητα. Με τον όρο αυτό εννοούμε το ρυθμό με τον οποίο ο γονότυπος αυξάνει την παρουσία του στον πληθυσμό σε σχέση με το ρυθμό ενός άλλου γονοτύπου και όχι τις φυσικές ή άλλες ιδιότητες του γονοτύπου, όπως παραδείγματος χάριν μορφολογία, φυσιολογία και άλλα.

Σύμφωνα με τη θεωρία του γενετικού φορτίου, κάθε άτομο ενός πληθυσμού που δεν έχει τη μέγιστη αρμοστικότητα επιβαρύνει τον πληθυσμό με «επιβλαβή» αλληλόμορφα. Κατά τα προηγούμενα, επιβαρυντικός είναι κάθε μηχανισμός που προκαλεί αλλαγές στις γονιδιακές συχνότητες, όπως μεταλλάξεις, μεταναστεύσεις ή γενετική παρέκκλιση. Με τη λογική αυτή ο πληθυσμός θα πρέπει να πληρώσει ένα κόστος για να διατηρήσει το γενετικό του πολυμορφισμό του και ως εκ τούτου υπάρχει ένα όριο στον αριθμό των πολυμορφισμών που μπορούν να συνυπάρχουν στον πληθυσμό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί αυτό της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας, όπου έχει εκτιμηθεί ότι για να διατηρηθεί ο γενετικός πολυμορφισμός, πρέπει να πεθάνει το 13% του πληθυσμού υπό συνθήκες ελονοσίας πριν το στάδιο της αναπαραγωγής. Αυτό είναι το «κόστος» του πολυμορφισμού (Futuyma, 1995). Οι δυνάμεις που διατηρούν τα επιβλαβή αλληλόμορφα στις γονιδιακές δεξαμενές είναι οι ακόλουθες: α) η καθυστερημένη ηλικία εμφάνισης μιας ασθένειας, όπως για παράδειγμα η νόσος του Huntington που επιτρέπει την αναπαραγωγή κι έτσι την κληροδότηση της ασθένειας στους απογόνους, β) η αργή επιλογή εναντίον των υποτελών αλληλομόρφων στους διπλοειδείς οργανισμούς, διότι τα περισσότερα υποτελή αλληλόμορφα «κρύβονται» στους ετεροζυγώτες και έτσι, σπάνιες ασθένειες που προκαλούνται από υποτελή αλληλόμορφα διαιώνονται στους πληθυσμούς μέσα από ετερόζυγους φορείς, ακόμη και αν είναι θανατογόνες στους ομόζυγους, γ) η ισορροπία μεταξύ μετάλλαξης και επιλογής, κατά την οποία νέα αλληλόμορφα δημιουργούνται από μεταλλάξεις με ίδιους ρυθμούς που αποβάλλονται από τη

φυσική επιλογή και δ) η επιλεκτική υπεροχή των ετεροζυγωτών, η οποία διατηρεί και τα δυο αλληλόμορφα στη γονιδιακή δεξαμενή.

Κόστος επιλογής υπάρχει και στην περίπτωση κατευθύνουσας επιλογής, π.χ. στην περίπτωση της γενετικής βελτίωσης, όπου θα πρέπει να επιλέξουμε για διασταύρωση τα καλύτερα άτομα και συνεπώς θα πρέπει να καταδικάσουμε σε αναπαραγωγικό θάνατο το μεγαλύτερο ποσοστό του πληθυσμού (που αντιπροσωπεύει το κόστος της επιλογής). Αυτό ενδεχομένως θέτει το πείραμα σε κίνδυνο, σε περίπτωση που η αναπαραγωγή των επιλεγμένων ατόμων αποτύχει (π.χ. άτομα με μεγαλύτερη απόδοση γάλακτος, μπορεί να είναι ευπαθή σε πολλές ασθένειες). Αντίθετα, μπορούμε να αποκλείσουμε μόνο τα άτομα με πολύ χαμηλές τιμές για το χαρακτήρα που επιλέγουμε, με αποτέλεσμα να φτάσουμε αργότερα στο επιθυμητό αποτέλεσμα αλλά συνάμα με χαμηλότερο κόστος.

Διαπιστώνουμε έτσι ότι η επιτυχία κάποιου επιλεκτικού κέρδους, συνοδεύεται πάντοτε με κάποιο επιλεκτικό κόστος, που είναι το ίδιο είτε το κέρδος επιτευχθεί σε μια ή σε περισσότερες γενιές.

Ο Haldane (1957) υπολόγισε ότι για να αλλάξει η συχνότητα ενός επιλεγόμενου γονιδίου από 0,01 σε 0,99, ο συνολικός αριθμός των γενετικών θανάτων θα πρέπει να είναι 30 φορές το μέγεθος του πληθυσμού. Επειδή η αναπαραγωγική ικανότητα ενός πληθυσμού θέτει όριο στο κόστος που είναι εφικτό σε κάθε γενιά, ο πληθυσμός μπορεί να απορροφήσει μικρές αλλαγές στις συχνότητες των αλληλομόρφων πολλών γενετικών τόπων ταυτοχρόνως ή μεγάλες αλλαγές σε λίγους γενετικούς τόπους. Σύμφωνα με τον Haldane χρειάζονται περίπου 300.000 θάνατοι για την πλήρη διαφοροποίηση δύο πληθυσμών σε 1000 γενετικούς τόπους, κάτω από την παραδοχή ότι αυτοί επηρεάζουν την αρμοστικότητα ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο και ότι βρίσκονται σε κατάσταση ισορροπίας σύνδεσης. Αν οι διάφοροι γενετικοί τόποι που διατηρούνται σε κατάσταση πολυμορφισμού βρίσκονται σε ισορροπία σύνδεσης μεταξύ τους και η συμβολή τους στην μέση αρμοστικότητα είναι ανεξάρτητη, τότε υπάρχει ένα όριο στον αριθμό των πολυμορφισμών που μπορούν να συνυπάρχουν στον πληθυσμό. Με άλλα λόγια, υπάρχει ένα ανώτατο όριο στο κόστος που μπορεί ο πληθυσμός να πληρώσει για την πολυτέλεια του πολυμορφισμού. Το όριο αυτό καθορίζεται από την «αναπαραγωγική περίσσεια», μια συνάρτηση της αναπαραγωγικής ικανότητας του οργανισμού. Σε περίπτωση όπου το γενετικό φορτίο είναι μεγαλύτερο από την αναπαραγωγική περίσσεια, ο πληθυσμός τείνει σε αφανισμό (Futuyma, 1995).

Συνοψίζοντας, το κόστος αρμοστικότητας ορίζεται ως η μείωση της ικανότητας ενός οργανισμού για να επιβιώσει και να αναπαραχθεί σε

διαφορετικά περιβάλλοντα μετά από μια μετάλλαξη που συνεπάγεται ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον. Έτσι λοιπόν το κόστος, είναι η μείωση της αρμοστικότητας κάτω από τη μέγιστη δυνατή τιμή της μέσα σε έναν πληθυσμό (Hedrick, 2000).

I.2.2. Συσχέτιση του κόστους αρμοστικότητας με μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα.

Η φυσική επιλογή βελτιστοποιεί τον γενότυπο ενός οργανισμού στο πλαίσιο του περιβάλλοντός του. Προσαρμογές σε ένα περιβάλλον μπορεί να μειώσουν την αρμοστικότητα σε ένα άλλο, αποκαλύπτοντας εξελικτικές συμβιβαστικές ανταλλαγές (Lang et al., 2009). Η περιβαλλοντική αλλαγή είναι πηγή ισχυρής επιλογής στην άγρια ζωή, και η έκθεση των οργανισμών σε καινοφανείς, ανθρωπογενείς χημικές ουσίες είναι μια σχετικά νέα πίεση. Η άγρια χλωρίδα και πανίδα μπορεί να εκτεθεί σε πολλές χημικές ουσίες που έχουν τη δυνατότητα να προκαλέσουν οξεία όσο και χρόνια τοξικότητα μέσω διάφορων φυσιολογικών οδών, μερικές από τις οποίες μπορεί να προκαλέσουν χαρακτηριστικές φαινοτυπικές απαντήσεις. Σε μοριακό επίπεδο, κάθε απάντηση περιλαμβάνει την διαμόρφωση της γονιδιακής έκφρασης, και αυτό συμπεριλαμβάνει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των γονιδίων και του περιβάλλοντος. Έχει αποδειχθεί ότι η συνεχής έκθεση σε χημικές ουσίες μπορεί να επιλέξει σε πληθυσμούς της άγριας ζωής και να προωθήσει την εξέλιξη ανθεκτικών γονότυπων. Οι μελέτες των πληθυσμών που εκτίθενται σε ρύπους, όπως βαρέα μέταλλα, ανθεκτικούς οργανικούς ρύπους ή και τα δύο παρέχουν στοιχεία για αυτό. Η ταχύτερη προσαρμογή που έχει παρατηρηθεί σε πληθυσμούς είναι αυτή της εξέλιξης της ανθεκτικότητας σε παρασιτοκτόνα και αντιβιοτικά (Brown et al., 2009). Είναι ευρέως αποδεκτό στη γενετική ότι οι περισσότερες μεταλλάξεις διαταράσσουν το μεταβολισμό σε κάποιο βαθμό, και είναι, κατά συνέπεια, πιθανό να αποτελούν μειονέκτημα για τους οργανισμούς που τα κληρονομούν (Hastings and Donnelly, 2005). Ο Crow (1957) ήταν ο πρώτος που προέβλεψε πως τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα θα πρέπει αρχικά να αποτελούν μειονέκτημα κατά την απουσία επιλογής. Αυτή η πρόβλεψη από τότε έχει επαληθευτεί σε φυτά για ζιζανιοκτόνα, παθογόνους μικροοργανισμούς και φυτοφάγα ζώα, σε βακτήρια για την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά και σε πολλά είδη παρασίτων για την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (Bourguet et al., 2004). Τα γονίδια που παρέχουν ανθεκτικότητα σε καινοφανείς προκλήσεις όπως τα παρασιτοκτόνα, οι τοξίνες, οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, συχνά συνεπάγονται κόστος αρμοστικότητας σε άτομα με ανθεκτικό φαινότυπο (Raymond et al., 2005). Η ανθεκτικότητα, είτε σε ξενοβιοτικές ουσίες είτε στα παράσιτα, συχνά προβάλλεται ως ένα προφανές παράδειγμα μιας και μόνο γονιδιακής επίδρασης

που πρέπει να φέρει ένα συσχετιζόμενο με αυτή την επίδραση «κόστος» αρμοστικότητας. Ωστόσο, μια ανασκόπηση της βιβλιογραφίας της ανθεκτικότητας σε ξενοβιοτικές ουσίες, δείχνει ότι οι εμπειρικές αποδείξεις για την υπόθεση αυτή, στην πραγματικότητα, σπανίζουν. Υποθέτουμε ότι τέτοια κόστη αρμοστικότητας μπορούν να ερμηνευθούν απόλυτα υπό το φως των μοριακών μεταλλάξεων (Coustau at al., 2000). Σε μεγάλο βαθμό είναι αναμενόμενο ότι οι προσαρμογές που προσδίδουν ανθεκτικότητα σε ξενοβιοτικές ουσίες (αντιβιοτικά, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα κ.α.) θα περιλαμβάνει κάποιου είδους κόστος στην αρμοστικότητα ενός ανθεκτικού ατόμου σε ένα ελεύθερο από ξενοβιοτικά περιβάλλον. Αυτό το αναμενόμενο αποτέλεσμα έχει μια γερή θεωρητική βάση και είναι καλά υποστηριγμένο τόσο από εμπειρικά δεδομένα όσο και από εργαστηριακές μελέτες, συμπεριλαμβάνοντας ένα ευρύ φάσμα οργανισμών-στόχων και ποικιλία τοξινών που χρησιμοποιούνται εναντίον τους. Εάν δεν αντισταθμιστούν αυτά τα κόστη από μια δεύτερη μετάλλαξη η συχνότητα των ανθεκτικών ατόμων αναμένεται να μειωθεί σε περιβάλλοντα στα οποία απουσιάζουν ξενοβιοτικοί παράγοντες, με το ρυθμό και το μέγεθος της μείωσης αυτής να είναι ανάλογη με το κόστος της ανθεκτικότητας, καθώς τα ανθεκτικά άτομα εκτοπίζονται από τα ευαίσθητα που έχουν μεγαλύτερη αναπαραγωγική επιτυχία και υψηλότερο ρυθμό της αύξησης του πληθυσμού (Agnew at al., 2004).

Τα βακτήρια που είναι ανθεκτικά στα αντιβιοτικά, επιβάλλουν σημαντικό βάρος για τον ανθρώπινο πληθυσμό. Η νοσηρότητα και η θνησιμότητα που προκαλούνται από ανθεκτικούς παθογόνους μικροοργανισμούς καθιστούν σαφές ότι η ανάπτυξη ανθεκτικών παθογόνων αποτελεί κόστος από πλευράς της ανθρώπινης κοινωνίας. Ωστόσο υπάρχει και κόστος συσχετιζόμενο με την ανθεκτικότητα σε αντιβιοτικά από την πλευρά του βακτηρίου. Σε ένα περιβάλλον που περιέχει ένα αντιβιοτικό, η κατοχή του αντίστοιχου γονιδίου ανθεκτικότητας είναι σαφώς επωφελής για ένα βακτήριο. Απουσία αντιβιοτικού όμως, οι ανθεκτικοί γονότυποι ενδέχεται να έχουν χαμηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης από ότι οι ομόλογοι ευαίσθητοι. Οι μεταλλάξεις που προσδίδουν ανθεκτικότητα διαταράσσουν κάποια φυσιολογική διαδικασία του κυττάρου, προκαλώντας έτσι επιβλαβείς παρενέργειες. Στην περίπτωση που οι λειτουργίες της ανθεκτικότητας κωδικοποιούνται από πλασμίδια, τα βακτήρια θα πρέπει να συνθέσουν επιπλέον νουκλεϊκά οξέα και πρωτεΐνες. Αυτή η σύνθεση επιβάλλει ένα επιπλέον ενεργητικό φορτίο στο βακτήριο και τα προϊόντα που συντίθενται ενδέχεται να επηρεάσουν τη φυσιολογία του κυττάρου. Συνεπώς, τα ανθεκτικά βακτήρια ίσως να είναι κατώτεροι ανταγωνιστές σε σύγκριση με τους ευαίσθητους γονότυπους απουσία αντιβιοτικών (Lenski, 1998). Τακτικές

που αποσκοπούν στην καταπολέμηση του αυξανόμενου προβλήματος των ανθεκτικών παθογόνων παραγόντων στα αντιβιοτικά με τον περιορισμό της χρήσης αντιβιοτικών υποδεικνύει εμμέσως ότι η ανθεκτικότητα μειώνει τη δαρβινική αρμοστικότητα των παθογόνων οργανισμών, απουσία φαρμάκων. Ενώ τα κόστη αρμοστικότητας έχουν αποδειχθεί για βακτήρια και ιούς ανθεκτικά σε ορισμένους χημειοθεραπευτικούς παράγοντες, τα κόστη αυτά αναμένεται να μειωθούν κατά τη διάρκεια της μετέπειτα εξέλιξης. Αυτό έχει πρόσφατα παρατηρηθεί σε παθογόνα τόσο διαφορετικά όπως ο HIV και η *Escherichia coli*. Υπάρχουν αποδείξεις ότι αυτές οι γενετικές προσαρμογές στο κόστος της ανθεκτικότητας μπορεί να αποκλείσουν την επιστροφή ανθεκτικών γονοτύπων στην ευαισθησία (Schrag et al., 1997). Οπότε, όσον αφορά τα βακτήρια, παρατηρείται μια προσαρμογή στο κόστος αρμοστικότητας που επάγεται από την ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά.

Τα γονίδια ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα είναι πλέον συχνά στα γονιδιώματα των εντόμων λόγω της πρόσφατης και συχνής χρήσης χημικών ουσιών από τον άνθρωπο (Gazave et al., 2001). Δεδομένου ότι μεταχείριση των εντομοκτόνων δεν είναι συνεχής, τα έντομα θα πρέπει να προσαρμοστούν για να είναι ανταγωνιστικά σε εναλλασσόμενες περιόδους με και χωρίς χρήση εντομοκτόνων. Έτσι, η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα προσφέρει την ευκαιρία να μελετηθεί η προσαρμογή των ευκαρυωτικών οργανισμών σε ποικίλα περιβάλλοντα. Η ανθεκτικότητα μπορεί να οριστεί ως η προσαρμογή ενός πληθυσμού από ένα περιβάλλον απαλλαγμένο από εντομοκτόνο σε ένα νέο περιβάλλον μολυσμένο με νέα τοξικά μόρια (Shi et al., 2004). Ισχυρή κατευθύνουσα επιλογή για ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα σε γεωργικά συστήματα ευνοεί την αύξηση της συχνότητας του αλληλομόρφου (ή των αλληλομόρφων) που προσδίδουν ανθεκτικότητα. Εφόσον το αλληλόμορφο (ή τα αλληλόμορφα) ανθεκτικότητας έχουν αρνητικά πλειοτροπικά αποτελέσματα σε χαρακτηριστικά, μια τέτοια αλλαγή στη γονιδιακή συχνότητα αναμένεται να οδηγήσει σε σταδιακή αύξηση του κόστους αρμοστικότητας. Ως εκ τούτου, οι αρνητικές επιπτώσεις στην αρμοστικότητα θα πρέπει να αυξάνονται με το βαθμό της ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς που εκτίθενται σε διάφορα εντομοκτόνα (Carriere et al., 1994). Τα γονίδια που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα έντομα, τροποποιούν ορισμένα στοιχεία της βασικής φυσιολογίας και παρεμβαίνουν στα χαρακτηριστικά που είναι συσχετισμένα με την αρμοστικότητα, ορίζοντας έτσι ένα κόστος αρμοστικότητας (Gazave et al., 2001). Για τη μελέτη της διαδικασίας της προσαρμογής σε επίπεδο γονιδίου, είναι σημαντικό να κατανοήσουμε το πώς λειτουργεί αυτή η επίδραση του κόστους της αρμοστικότητας και το πώς θα μπορούσε να εξελιχθεί (Guillemaud et al., 1998). Δύο γενικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη του κόστους αρμοστικότητας των αλληλομόρφων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα

εντομοκτόνα (Crow, 1957). Η πρώτη περιλαμβάνει τις συνακόλουθες αλλαγές στις συχνότητες των ανθεκτικών αλληλομόρφων σε πληθυσμούς που δεν είχαν υποστεί επεξεργασία με εντομοκτόνα για πολλές γενιές (π.χ., Cochran, 1993; Zhai & Robinson, 1996), σε διαχειριζόμενους πληθυσμούς (π.χ., Daly & Fitt, 1990; McKenzie 1990; Chevillon et al., 1997) ή σε πληθυσμούς που διαμένουν στο χώρο μεταξύ περιοχών που έχουν ψεκαστεί και περιοχών που δεν έχουν ψεκαστεί (Lenormand et al., 1999). Η δεύτερη μέθοδος περιλαμβάνει τη σύγκριση των στοιχείων που συνεισφέρουν στην αρμοστικότητα μεταξύ ανθεκτικών και ευπαθών ατόμων. Αν και η πρώτη μέθοδος είναι η μόνη που μπορεί να εκτιμήσει πλήρως το κόστος αρμοστικότητας, δεν παρέχει αναλυτικές πληροφορίες για τους συγκεκριμένους μηχανισμούς που προκαλούν αυτά τα κόστη.

I.3. Ρυθμός εμφάνισης/ εξαφάνισης ενός αλληλομόρφου

I.3.1. Επίδραση της επιλογής στις συχνότητες των αλληλομόρφων

Οι μεταλλακτικοί ρυθμοί γενικά εκτιμώνται από τη συχνότητα με την οποία μια νέα μετάλλαξη εμφανίζεται στους απογόνους ενός πληθυσμού και εκφράζονται με τον αριθμό των μεταλλάξεων ανά γαμέτη και ανά γενιά (Futuyma, 1995). Όταν μια καινούρια επωφελής μετάλλαξη προκύπτει, ενδέχεται να απομακρυνθεί μέσω της γενετικής παρέκκλισης ή εναλλακτικά μπορεί να αυξήσει τη συχνότητά της και να εγκαθιδρυθεί (Johnson, 1999). Μια τέτοια μετάλλαξη εγκαθιδρύεται λόγω της θετικής επιλογής που επιδρά στο συγκεκριμένο περιβάλλον και άρα θα αυξήσει τα αλληλόμορφα της στον πληθυσμό. Σε περίπτωση που το περιβάλλον αλλάξει και η δράση της επιλογής σταματά να υπάρχει τα αλληλόμορφα αυτά καθίστανται λιγότερο ικανά να παραμείνουν στον πληθυσμό, λόγω του συναφούς κόστους που φέρουν. Έτσι λοιπόν, τα αλληλόμορφα που προσδίδουν κάποιο πλεονέκτημα, όταν βρίσκονται σε ένα περιβάλλον στο οποίο απουσιάζει η δράση της επιλογής, απομακρύνονται από τη γονιδιακή δεξαμενή, εφόσον δεν προσφέρουν πλέον κάποιο όφελος στην αρμοστικότητα. Κατά πόσο μια μετάλλαξη είναι επωφελής ή όχι, εξαρτάται από το περιβάλλον. Μια μετάλλαξη που είναι βοηθητική για τον οργανισμό σε μια περίπτωση, θα μπορούσε να βλάψει σε μια άλλη. Όταν αλλάζει το περιβάλλον οι πολυμορφισμοί που ήταν κάποτε λιγότερο προσαρμοσμένοι, ξαφνικά ευνοούνται. Δεδομένου ότι τα περιβάλλοντα μεταβάλλονται συνεχώς, η ποικιλότητα βοηθάει τους πληθυσμούς να επιβιώσουν, έστω και αν ορισμένοι από τους πολυμορφισμούς δεν είναι τόσο

προσαρμοσμένοι όσο είναι κάποιοι άλλοι. Όταν επωφελείς μεταλλάξεις εμφανίζονται σε ένα μεταβαλλόμενο περιβάλλον, εγκαθιδρύονται γρήγορα στον πληθυσμό (Helena et al., 1996).

Ο απλούστερος τρόπος για να παρακολουθήσουμε τα αποτελέσματα της επιλογής είναι να εξεταστεί ένα αλληλόμορφο a που είναι θανατηφόρο πριν την αναπαραγωγική ηλικία σε ομόζυγη κατάσταση, όπως είναι το αλληλόμορφο που οδηγεί στη νόσο Tay-Sachs. Έστω ότι, σε κάποια γενιά, η αλληλομορφική συχνότητα αυτού του γονιδίου είναι 0.10. Στη συνέχεια, σε έναν παμμεικτικό πληθυσμό, οι συχνότητες των τριών γονοτύπων μετά τη γονιμοποίηση είναι:

| Γονότυπος | A/A | A/a | a/a |
|-----------|------|------|------|
| Συχνότητα | 0.81 | 0.18 | 0.01 |

Στην αναπαραγωγική ηλικία, ωστόσο, οι ομοζυγώτες a/a θα έχουν πεθάνει, αφήνοντας τους γονοτύπους σε αυτό το στάδιο ως εξής

| Γονότυπος | A/A | A/a | a/a |
|-----------|------|------|------|
| Συχνότητα | 0.81 | 0.18 | 0.00 |

Αλλά αυτά τα ποσοστά ανέρχονται σε 0.99, διότι μόνο το 99% του πληθυσμού εξακολουθεί να επιβιώνει. Μεταξύ του πραγματικού πληθυσμού που επιβιώνει και αναπαράγεται, τα ποσοστά θα πρέπει να υπολογιστούν εκ νέου με διαίρεση διά 0.99 έτσι ώστε το συνολικό ποσοστό να έχει άθροισμα 1.00. Μετά από αυτή την αναπροσαρμογή έχουμε:

| Γονότυπος | A/A | A/a | a/a |
|-----------|-------|-------|------|
| Συχνότητα | 0.818 | 0.182 | 0.00 |

Η συχνότητα του θανατηφόρου αλληλομόρφου a μεταξύ των γαμετών που παράγονται από αυτούς τους επιζώντες είναι : $0.00 + 0.182/2 = 0.091$ και η μεταβολή της συχνότητας των αλληλομόρφων σε μια γενιά, εκφρασμένη ως η νέα τιμή μείον την παλιά, είναι $0.091 - 0.100 = -0.019$. Αυτός ο υπολογισμός μπορεί να επαναληφθεί σε κάθε γενιά για την πρόβλεψη των συχνοτήτων των θανατηφόρων και φυσιολογικών αλληλομόρφων σε μια διαδοχή μελλοντικών γενεών.

Το ίδιο είδος υπολογισμού μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και όταν κάθε γονότυπος έχει κάποια σχετική πιθανότητα επιβίωσης και όχι μόνο εάν οι γονότυποι είναι απλώς θανατηφόροι ή φυσιολογικοί. Αυτός ο γενικός υπολογισμός παρουσιάζεται παρακάτω.

Ένα γενικό μοντέλο επιλογής για δυο αλληλόμορφα σε ένα γενετικό τόπο μας δείχνει την επίδραση που έχει η επιλογή στη συχνότητα των αλληλομόρφων. Υποθέτουμε ότι σε ένα πληθυσμό τα άτομα συζευγνύονται μεταξύ τους τυχαία σχετικά με ένα δεδομένο γενετικό τόπο με δυο αλληλόμορφα και ότι αυτός ο πληθυσμός είναι πολύ μεγάλος. Αμέσως μετά την γονιμοποίηση των ωαρίων, τα ζυγωτά θα βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg:

| Γονότυπος | A/A | A/a | a/a |
|-----------|-------|-------|-------|
| Συχνότητα | p^2 | $2pq$ | q^2 |

και $p^2 + 2pq + q^2 = (p + q)^2 = 1.0$, όπου p η συχνότητα του αλληλομόρφου A και όπου q η συχνότητα του αλληλομόρφου a.

Υποθέτουμε επίσης ότι οι τρεις γονότυποι έχουν πιθανότητες επιβίωσης έως την ενηλικίωση $W_{A/A} : W_{A/a} : W_{a/a}$. Για λόγους απλοΰστευσης, ας υποθέσουμε ότι όλες οι επιλεκτικές διαφορές είναι διαφορές στην επιβίωση κατά τη φάση μεταξύ γονιμοποιημένου ωαρίου και ενηλικίου. Οι διαφορές στη γονιμότητα προκαλούν πολύ πιο περίπλοκες μαθηματικές διατυπώσεις. Στη συνέχεια, μεταξύ των απογόνων που έχουν φτάσει στην ενηλικίωση οι συχνότητες θα είναι:

| Γονότυπος | A/A | A/a | a/a |
|-----------|---------------|---------------|---------------|
| Συχνότητα | $p^2 W_{A/A}$ | $2pq W_{A/a}$ | $q^2 W_{a/a}$ |

Αυτές οι προσαρμοσμένες συχνότητες δεν προστίθενται στη μονάδα, γιατί όλα τα W είναι κλάσματα μικρότερα από 1. Ωστόσο μπορούμε να τις αναπροσαρμόσουμε αυτές τις συχνότητες ώστε το άθροισμά τους να ισούται με την μονάδα, χωρίς αλλαγή της μεταξύ τους σχέσης, διαιρώντας κάθε συχνότητα με το άθροισμα των συχνοτήτων, κατόπιν της επιλογής (\bar{W}):

$$\bar{W} = p^2 W_{A/A} + 2pq W_{A/a} + q^2 W_{a/a}$$

\bar{W} Το \bar{W} ονομάζεται μέση αρμοστικότητα του πληθυσμού επειδή είναι πράγματι ο μέσος όρος των αρμοστικότητων όλων των ατόμων μέσα στον πληθυσμό. Μετά από αυτή την αναπροσαρμογή έχουμε:

| Γονότυπος | A/A | A/a | a/a |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Συχνότητα | $p^2 \frac{W_{A/A}}{\bar{W}}$ | $2pq \frac{W_{A/a}}{\bar{W}}$ | $q^2 \frac{W_{a/a}}{\bar{W}}$ |

Μπορούμε τώρα να καθορίσουμε τη συχνότητα p' του αλληλομόρφου A στην επόμενη γενιά αθροίζοντας γονίδια:

$$p' = A/A + (\frac{1}{2})A/a = p^2 \frac{W_{A/A}}{\bar{W}} + \frac{pqW_{A/a}}{\bar{W}} = p \frac{pW_{A/A} + qW_{A/a}}{\bar{W}}$$

Τέλος, παρατηρούμε ότι ο αριθμητής: $p W_{A/A} + q W_{A/a}$, είναι η μέση αρμοστικότητα των A αλληλομόρφων, διότι από τις συχνότητες Hardy-Weinberg, ένα μέρος p από όλα τα A αλληλόμορφα είναι παρόν σε ομοζυγώτες με ακόμη ένα A και έτσι έχει μια αρμοστικότητα $W_{A/A}$ ενώ ένα μέρος q από αυτά βρίσκεται σε ετεροζυγώτες με ένα a με αρμοστικότητα $W_{A/a}$. Χρησιμοποιώντας το \bar{W}_A για να αντικαταστήσει το $p W_{A/A} + q W_{A/a}$, η τελική νέα γονιδιακή συχνότητα αποδίδεται ως:

$$p' = p \frac{\bar{W}_A}{\bar{W}}$$

Εάν αφαιρεθεί από το p' η αλληλική συχνότητα p , προκύπτει η μεταβολή της αλληλικής συχνότητας που αναμένεται να υπάρξει μέσα σε μια γενιά.

$$\Delta p = p' - p = \frac{p\bar{W}_A}{\bar{W}} - p = \frac{p(\bar{W}_A - \bar{W})}{\bar{W}}$$

Αλλά το \bar{W} , η μέση αρμοστικότητα του πληθυσμού, είναι η μέση τιμή των αλληλομορφικών αρμοστικοτήτων \bar{W}_A και \bar{W}_a , οπότε:

$$\bar{W} = p \bar{W}_A + q \bar{W}_a$$

Αντικαθιστώντας τον τελευταίο τύπο στην εξίσωση του Δp και γνωρίζοντας ότι $q = 1 - p$, λαμβάνουμε (μετά από μια σειρά αλγεβρικών πράξεων):

$$\Delta p = \frac{pq(\bar{W}_A - \bar{W}_a)}{\bar{W}}$$

Μετά από μια γενιά επιλογής, η νέα τιμή της συχνότητας του αλληλομόρφου A είναι ίση με την παλιά τιμή, p , πολλαπλασιασμένη επί τον λόγο της μέσης αρμοστικότητας των αλληλομόρφων A προς τη μέση αρμοστικότητα του συνόλου του πληθυσμού. Εάν η αρμοστικότητα των A αλληλομόρφων είναι μεγαλύτερη από την μέση αρμοστικότητα του πληθυσμού τότε το κλάσμα \bar{W}_A / \bar{W} είναι μεγαλύτερο από τη μονάδα και το p' είναι μεγαλύτερο από το p . Έτσι το αλληλόμορφο A αυξάνεται στον πληθυσμό. Αντιθέτως, εάν το \bar{W}_A / \bar{W} είναι μικρότερο από τη μονάδα, το A μειώνεται. Όμως η μέση αρμοστικότητα του πληθυσμού \bar{W} , είναι η μέση αρμοστικότητα των A αλληλομόρφων και των a αλληλομόρφων. Έτσι, εάν η \bar{W}_A είναι μεγαλύτερη από την μέση αρμοστικότητα του πληθυσμού, πρέπει να είναι και μεγαλύτερη από την \bar{W}_a , την μέση αρμοστικότητα του αλληλομόρφου a.

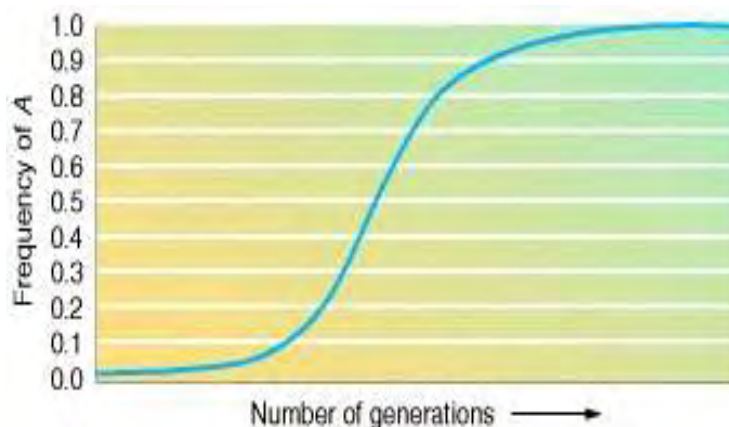
Θα πρέπει να σημειωθεί ότι οι αρμοστικότητες $W_{A/A}$, $W_{A/a}$ και $W_{a/a}$ μπορούν να εκφραστούν ως απόλυτες πιθανότητες επιβίωσης και απόλυτες τιμές αναπαραγωγής ή μπορούν όλες να τροποποιηθούν σε σχέση με μια από τις αρμοστικότητες, στην οποία δίνεται η πρότυπη τιμή 1,0. Αυτή η αναβαθμολόγηση δεν έχει καμία απολύτως επίπτωση στον τύπο του p' , διότι απαλείφεται στον ονομαστή και στον παρονομαστή.

Η πορεία της επιλογής εξαρτάται μόνο από τις σχετικές αρμοστικότητες. Η αύξηση του αλληλομόρφου του γονιδίου με την υψηλότερη αρμοστικότητα συνεπάγεται ότι η μέση αρμοστικότητα του πληθυσμού στο σύνολό του αυξάνεται, έτσι η επιλογή μπορεί επίσης να χαρακτηριστεί ως μια διαδικασία που αυξάνει τη μέση αρμοστικότητα. Ο κανόνας αυτός ισχύει αυστηρά μόνο για συχνο-ανεξάρτητες γονοτυπικές αρμοστικότητες, αλλά πλησιάζει αρκετά σε έναν γενικό κανόνα ώστε να χρησιμοποιηθεί ως μια εποικοδομητική γενίκευση. Αυτή η μεγιστοποίηση της αρμοστικότητας δεν οδηγεί αναγκαστικά σε ένα βέλτιστο χαρακτηριστικό για τα είδη στο σύνολό τους, διότι οι αρμοστικότητες καθορίζονται μόνο από τις μεταξύ τους σχέσεις μέσα σε έναν πληθυσμό. Είναι η σχετική και όχι η απόλυτη αρμοστικότητα που αυξάνεται με την επιλογή. Ο πληθυσμός δεν είναι απαραίτητο να γίνεται μεγαλύτερος ή να αναπτύσσεται ταχύτερα, ούτε είναι λιγότερο πιθανό να εξαφανιστεί (Griffiths et al., 2000).

I.3.2. Ρυθμός μεταβολής των γονιδιακών συχνοτήτων

Η εξίσωση για την αλλαγή στη συχνότητα των αλληλομόρφων, στην οποία αναφερθήκαμε πρωτύτερα, είναι ιδιαίτερα κατατοπιστική. Από αυτή την

εξίσωση συνάγεται ως συμπέρασμα ότι η μεταβολή Δp θα είναι θετική (το A θα αυξηθεί), εάν η μέση αρμοστικότητα των A αλληλομόρφων είναι μεγαλύτερη από τη μέση αρμοστικότητα από αυτή των a αλληλομόρφων. Εκτός αυτού, δείχνει επίσης ότι η ταχύτητα της αλλαγής, δεν εξαρτάται μόνο από τη διαφορά των αρμοστικοτήτων μεταξύ των αλληλομόρφων, αλλά και από τον συντελεστή pq , που είναι ανάλογος με την συχνότητα των ετεροζυγωτών ($2pq$). Για μια δεδομένη διαφορά στην αρμοστικότητα των αλληλομόρφων, η γονιδιακή συχνότητα θα αλλάξει πιο γρήγορα όταν τα αλληλόμορφα A και a βρίσκονται σε μια ενδιάμεση συχνότητα, οπότε το pq είναι μεγάλο. Εάν το p είναι κοντά στο 0 ή το 1, που σημαίνει ότι ή το A ή το a βρίσκονται κοντά στην εγκαθίδρυση, τότε το γινόμενο pq είναι σχεδόν μηδέν και η επιλογή θα προχωρήσει με πολύ αργούς ρυθμούς. Στην εικόνα 10 απεικονίζεται ένα διάγραμμα με μια σιγμοειδή καμπύλη που αντιπροσωπεύει την πορεία της επιλογής ενός νέου ευνοημένου αλληλομόρφου A που εισήλθε πρόσφατα σε ένα πληθυσμό ομοζυγωτών a/a. Αρχικά, η μεταβολή της συχνότητας είναι ελάχιστη επειδή το p εξακολουθεί να βρίσκεται κοντά στο 0. Στην συνέχεια επιταχύνεται καθώς το αλληλόμορφο A γίνεται όλο και πιο συχνό, αλλά επιβραδύνεται και πάλι καθώς το A κυριαρχεί και το a καθίσταται πολύ σπάνιο. Αυτό ακριβώς αναμένεται από μια διαδικασία επιλογής. Όταν το μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού αποτελείται από ενός τύπου αλληλόμορφο, δεν υπάρχει περιθώριο για επιλογή. Για να πραγματοποιηθεί εξέλιξη μέσω της φυσικής επιλογής πρέπει να υπάρχει γενετική ποικιλότητα. Όσο πιο μεγάλη είναι η ποικιλομορφία, τόσο πιο γρήγορη η διαδικασία.

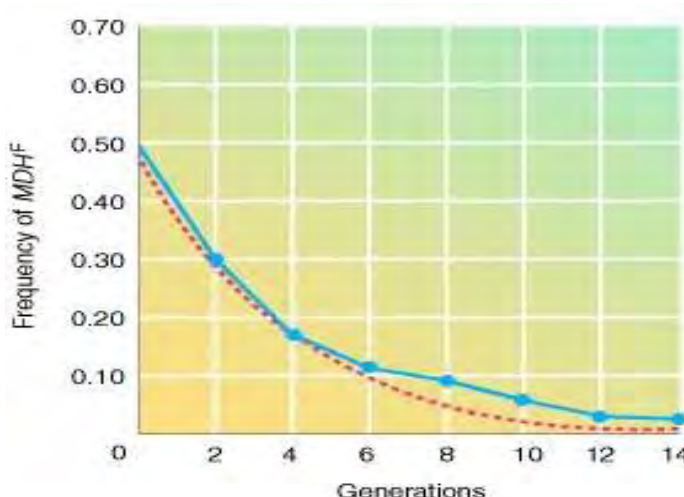


Εικόνα 10. Διαγραμματική αναπαράσταση του χρονικού μοτίβου της αυξανόμενης συχνότητας ενός νέου επωφελούς αλληλομόρφου A που έχει εισέλθει σε πληθυσμό a/a ομοζυγωτών.

Μια συνέπεια της δυναμικής που παρουσιάζεται στην εικόνα 10, αποτελεί η εξαιρετική δυσκολία να μειωθεί σημαντική η συχνότητα ενός αλληλομόρφου που είναι ήδη σπάνιο σε έναν πληθυσμό. Κατά συνέπεια, προγράμματα ευγονικής σχεδιασμένα να εξαλείψουν επιβλαβή υπολειπόμενα γονίδια από ανθρώπινους πληθυσμούς, παρεμποδίζοντας την αναπαραγωγή των ασθενών,

δεν λειτουργούν. Βέβαια, αν όλοι οι ετεροζυγώτες θα μπορούσαν να αποτραπούν να αναπαραχθούν, το γονίδιο θα μπορούσε να εξαλειφθεί, εκτός από την περίπτωση που δημιουργηθούν νέες μεταλλάξεις, στο διάστημα μιας γενιάς. Επειδή ωστόσο κάθε άνθρωπος είναι ετερόζυγος για έναν αριθμό διαφορετικών επιβλαβών γονιδίων, σε κανέναν δεν θα επιτρεπόταν να αναπαραχθεί.

Όταν τα εναλλακτικά αλληλόμορφα δεν είναι σπάνια, η επιλογή μπορεί να προκαλέσει αρκετά γρήγορες αλλαγές στη συχνότητα των αλληλομόρφων. Η εικόνα 11 παρουσιάζει την πορεία της εξάλειψης ενός αλληλομόρφου μηλικής αφυδρογονάσης σε έναν εργαστηριακό πληθυσμό της *D. melanogaster*. Οι αρμοστικότητες στην περίπτωση αυτή είναι οι εξής: $W_{A/A} = 1.0$ $W_{A/a} = 0.75$ και $W_{a/a} = 0.40$. Η συχνότητα του αλληλομόρφου *a* δεν μειώνεται στο 0 και περαιτέρω μείωση της συχνότητας θα απαιτήσει όλο και μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, όπως φαίνεται στην περίπτωση της αρνητικής ευγονικής (Griffiths et al., 2000).

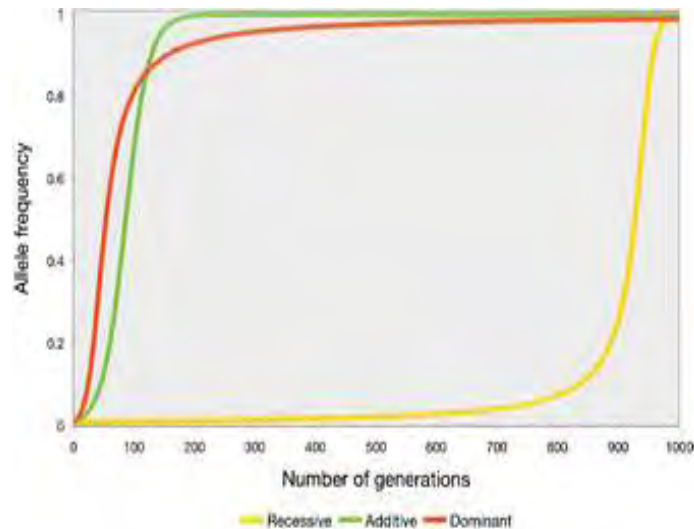


Εικόνα 11. Η απώλεια ενός αλληλόμορφου του γενετικού τόπου της μηλικής αφυδρογονάσης MDH^F λόγω της επιλογής σε ένα εργαστηριακό πληθυσμό *Drosophila melanogaster*. Η κόκκινη διακεκομμένη γραμμή δείχνει την αλλαγή που υπολογίστηκε για τις αρμοστικότητες $W_{A/A} = 1.0$ $W_{A/a} = 0.75$ και $W_{a/a} = 0.40$. (Lewontin, 1974)

Έτσι λοιπόν, βλέπουμε πως η επιλογή έναντι των υπολειπόμενων αλληλομόρφων είναι πολύ αργή στην αρχή, ενώ σταδιακά γίνεται πιο αργή, επειδή το μεγαλύτερο ποσοστό των αλληλομόρφων προστατεύεται στην ετερόζυγη κατάσταση καθώς η συχνότητα του αλληλομόρφου μειώνεται. Ως εκ τούτου η φυσική επιλογή από μόνη της δεν μπορεί να εξαλείψει εντελώς το

υποτελής αλληλόμορφο ακόμα κι αν αυτό είναι θανατηφόρο. Αυτό είναι ένα παράδειγμα κατευθύνουσας επιλογής.

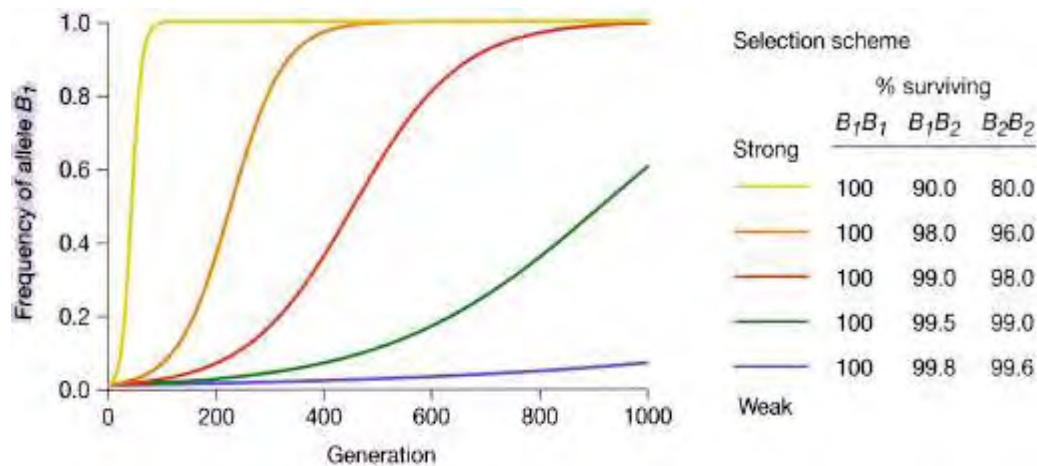
Η κατευθύνουσα επιλογή οδηγεί σε αύξηση της συχνότητας ενός πλεονεκτικού αλληλομόρφου. Εξετάζονται οι τρεις περιπτώσεις που υπάρχουν κατά την διαδικασία της κατευθύνουσας επιλογής, δηλαδή τις περιπτώσεις που το πλεονεκτικό αλληλόμορφο είναι κυρίαρχο, υποτελής ή ενδιάμεσο. Υποθέτουμε ότι έχουμε τρεις γονότυπους AA, AA' και A'A' με ποικίλες αρμοστικότητατες. Σε κάθε περίπτωση, το A είναι το πλεονεκτικό αλληλόμορφο και εξετάζουμε τις αλληλομορφικές συχνότητες ως προς αυτό. Υποθέτουμε ότι η επιλεκτική δράση παραμένει σταθερή και ότι αυτή είναι η μόνη παραβίαση των προϋποθέσεων της ισορροπίας Hardy-Weinberg, το αλληλόμορφο A θα γίνεται συχνότερο κάθε γενιά και θα γινόταν τελικά θα εγκαθιδρυθεί στον πληθυσμό. Ο ρυθμός με τον οποίο ένα πλεονεκτικό αλληλόμορφο προσεγγίζει την εγκαθίδρυση εξαρτάται από τις σχέση κυριαρχίας μεταξύ των αλληλομόρφων στον εξεταζόμενο γενετικό τόπο (εικόνα 12). Η αρχική αύξηση της συχνότητας ενός σπάνιου, πλεονεκτικού κυρίαρχου αλληλομόρφου είναι ταχύτερη από εκείνη ενός σπάνιου, πλεονεκτικού, υποτελούς αλληλομόρφου. Η νέα υπολειπόμενη μετάλλαξη παραμένει σε χαμηλή συχνότητα για έναν μεγάλο αριθμό γενιών, διότι η συχνότητα της ομοζυγωτίας είναι πολύ χαμηλή. Ως εκ τούτου, η φυσική επιλογή δεν μπορεί να εντοπίσει μια νέα υπολειπόμενη μετάλλαξη έως ότου αυτή φθάσει σε αρκετά υψηλή συχνότητα και να αρχίσει να εμφανίζεται σε ομοζυγώτες. Σε αντίθεση, μια νέα κυρίαρχη μετάλλαξη είναι άμεσα ορατή στη φυσική επιλογή, επειδή η επίδρασή της στην αρμοστικότητα φαίνεται στους ετεροζυγώτες. Στην ενδιάμεση κατάσταση το πλεονεκτικό αλληλόμορφο A εγκαθιδρύεται στον πληθυσμό ταχύτερα από ότι στην κατάσταση επικράτησης ή υποτέλειας, γιατί στην περίπτωση επικράτησης, τα λίγα πια A' «ξεφεύγουν» την εναντίον τους επιλογή, επειδή τα περισσότερα είναι σε κατάσταση ετεροζυγωτίας με το A. Έτσι, η ολική απομάκρυνση των A' είναι μια αργή διαδικασία. Αντίθετα, η τελική φάση της εγκαθίδρυσης του A όταν είναι υπολειπόμενο είναι πολύ γρήγορη γιατί το A' είναι πάντοτε εκτεθειμένο στην επιλογή (Futuyma, 1995; Andrews, 2010).



Εικόνα 12. Απεικόνιση της αλλαγής της συχνότητας για τις περιπτώσεις που το πλεονεκτικό αλληλόμορφο A είναι επικρατές ως προς την αρμοστικότητα (κόκκινη καμπύλη), ενδιάμεσο (πράσινη καμπύλη) ή υπολειπόμενο (κίτρινη καμπύλη) σε σχέση με το «αντίπαλο» αλληλόμορφο A' (Hancock et al., 2008).

Η επιλογή μπορεί να είναι ισχυρή (δριμεία επιλογή) ή πιο ασθενής (ήπια επιλογή). Στην δριμεία επιλογή η επιβίωση ή η γονιμότητα ενός γονοτύπου είναι σταθερή και ανεξάρτητη του μεγέθους του πληθυσμού. Στην περίπτωση αυτή το αποτέλεσμα της επιλογής αντανακλά την αυξομείωση του μεγέθους του πληθυσμού. Για παράδειγμα όταν ένας πληθυσμός εντόμων εκτίθεται σε ένα εντομοκτόνο, η θνησιμότητα κάθε γονοτύπου (ευαίσθητου ή ανθεκτικού) είναι ανεξάρτητη της πυκνότητας του πληθυσμού. Το μέγεθος του πληθυσμού θα υποστεί αρχικά μια ουσιαστική μείωση, αλλά με την εμφάνιση και τον πολλαπλασιασμό των ανθεκτικών ατόμων το μέγεθος θα αυξηθεί μέχρι να φτάσει στο σημείο ισορροπίας με το περιβάλλον. Αντίθετα κάτω από τη δράση της ήπιας επιλογής, το μέγεθος του πληθυσμού παραμένει στο επίπεδο ισορροπίας που του επιβάλλουν οι οικολογικές συνθήκες και οι παράγοντες που καθορίζονται από την πυκνότητα του πληθυσμού. Ο ρυθμός αύξησης του πληθυσμού είναι μηδέν και τα περισσότερα άτομα πεθαίνουν πριν αφήσουν απογόνους. Μαθηματικά, τόσο η δριμεία όσο και η ήπια επιλογή αυξάνουν το \bar{W} , αλλά η πρώτη αυξάνει και το ρυθμό αύξησης του πληθυσμού. Στην δεύτερη περίπτωση, η μέση αρμοστικότητα αυξάνει αλλά μόνο υπό την έννοια ότι τα άτομα με μικρότερες τιμές γίνονται σπανιότερα (Futuyma, 1995). Η εικόνα 13 δείχνει τη μεταβολή των αλληλομορφικών συχνοτήτων, οι οποίες μπορούν να αυξηθούν από τη δράση της επιλογής. Το διάγραμμα είναι βασισμένο σε έναν πληθυσμό που για έναν συγκεκριμένο γενετικό τόπο φέρει τα αλληλόμορφα B1 και B2. Οι αρχικές συχνότητες των αλληλομόρφων είναι 0.01 για το B1 και 0.99 για το B2. Η κίτρινη γραμμή, που αναφέρεται σε

ισχυρή επιλογή για το αλληλόμορφο B1 εναντίων του B2, δείχνει την αλλαγή στις συχνότητες των αλληλομόρφων όταν τα ποσοστά επιβίωσης είναι 100% για τον γονότυπο B1B1, 90% για τον B1B2 και 80% για τον B2B2. Η συχνότητα του αλληλομόρφου B1 αυξάνεται από 0.01 σε 0.99 σε λιγότερο από 100 γενιές. Κάτω από ασθενέστερες επιλογές, η συχνότητα των αλληλομόρφων B1 αυξάνεται με αργότερο ρυθμό, αλλά εξακολουθεί να αυξάνεται.



Εικόνα 13. Η συνεχής επιλογή μπορεί να επιφέρει σημαντικές αλλαγές στις συχνότητες των αλληλομόρφων με την πάροδο του χρόνου.

Έτσι λοιπόν, οι αλλαγές στις αλληλομορφικές συχνότητες είναι ικανές να οδηγήσουν στην εγκαθίδρυση ή στην απομάκρυνση ενός αλληλομόρφου. Στην περίπτωση που ένα αλληλόμορφο έχει εγκαθιδρυθεί στον πληθυσμό επειδή προσφέρει ένα επιλεκτικό πλεονέκτημα σε ένα συγκεκριμένο περιβάλλον, όταν το περιβάλλον αυτό αλλάξει και σταματήσει να υπάρχει η επίδραση της επιλογής στις αλληλομορφικές συχνότητες, το αλληλόμορφο μπορεί να απομακρυνθεί με τη διαδικασία της φυσικής επιλογής κατά του αλληλομόρφου αυτού που δεν προσδίδει πλέον κάποιο πλεονέκτημα. Εφόσον το επιλεκτικό πλεονέκτημα είναι συνδεδεμένο με κάποιο κόστος αρμοστικότητας, τότε το αλληλόμορφο αυτό θεωρείται λιγότερο προσαρμοστικό και για αυτό τον λόγο απομακρύνεται από τον πληθυσμό, με ταυτόχρονη αύξηση της συχνότητας του «ανταγωνιστικού» αλληλομόρφου.

Μοριακά εργαλεία, όπως οι μοριακοί δείκτες που καθιστούν δυνατή την παρακολούθηση πολυμορφικών αλληλομόρφων στους πληθυσμούς, είναι πλέον διαθέσιμα να διασαφηνίσουν τη γενετική βάση νέων προσαρμογών, δίνοντας την ευκαιρία για νέες γνώσεις για την κατανόηση των εξελικτικών μηχανισμών (Guillemaud et al., 1998).

I.4. Μοριακοί δείκτες κατάλληλοι για την παρακολούθηση προσαρμογής

I.4.1. Ορισμός, ιδιότητες και εφαρμογές των μοριακών δεικτών

Οι μοριακοί δείκτες αντιπροσωπεύουν ένα από τα πιο ισχυρά εργαλεία για τη γονιδιωματική ανάλυση και καθιστούν ικανή τη συσχέτιση κληρονομικών χαρακτηριστικών που εμφανίζουν γενετική ποικιλότητα. Η τεχνολογία των μοριακών δεικτών αναπτύχθηκε ραγδαία κατά την τελευταία δεκαετία παρέχοντας νέα μέσα για την απάντηση εξελικτικών, οικολογικών και ταξινομικών ερευνητικών ερωτημάτων. Η ποικιλομορφία στις αλληλουχίες του DNA μπορεί να παρατηρηθεί με ακρίβεια και απόδοση που παλαιότερα ήταν αδύνατη. Το μεγαλύτερο μέρος της ποικιλομορφίας σε νουκλεοτιδικό επίπεδο είναι μη ορατό σε φαινοτυπικό επίπεδο (Duran et al., 2009), οπότε οι μοριακοί δείκτες είναι απαραίτητοι για την ανάλυση της τέτοιου είδους ποικιλομορφίας. Επιπροσθέτως οι μοριακοί δείκτες προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τους παραδοσιακούς φαινοτυπικούς δείκτες, δεδομένου ότι παρέχουν αρκετά στοιχεία που μπορούν να αναλυθούν αντικειμενικά. Η περιγραφή των μορφολογικών χαρακτήρων άλλωστε εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από την υποκειμενικότητα του ερευνητή, χωρίς να είναι πάντοτε δυνατή η σαφής διάκριση των καταστάσεων τους. Μετά την άνθιση μοριακών τεχνικών όπως η PCR, που αποτελεί ορόσημο για τη γονιδιωματική ανάλυση και κατέστησε δυνατό τον προσδιορισμό αλληλουχιών DNA σε μεγάλη κλίμακα, η εφαρμογή των μοριακών δεικτών είναι τώρα πλέον καθιερωμένη (Joshi et al., 1999).

Ένας μοριακός δείκτης ορίζεται ως μια μικρή, συγκεκριμένη περιοχή του DNA που είναι αντιπροσωπευτικό των διαφορών στο επίπεδο του γονιδιώματος. Οι μοριακοί δείκτες προσφέρουν πολυάριθμα πλεονεκτήματα και μερικά από αυτά είναι τα εξής : α) ενυπάρχουν στα άτομα που σημαίνει ότι δεν μπορούν να χαθούν, β) είναι κληρονομήσιμοι καθιστώντας δυνατή την ταυτοποίηση απογόνων, γ) είναι σταθεροί και ανιχνεύσιμοι σε όλους τους ιστούς ανεξάρτητα από το μέγεθος, τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη του κυττάρου, δ) δεν διαταράσσονται από το περιβάλλον, από φαινόμενα πλειοτροπισμού ή επιστάσεων και τέλος ε) δεν καταστρέφεται το δείγμα για τις γενετικές αναλύσεις που σημαίνει ότι δεν απαιτείται θανάτωση του ζώου (Agarwal et al., 2008).

I.4.2. Μοριακοί δείκτες και τεχνικές

Κατά τη διάρκεια των δυο τελευταίων δεκαετιών, οι νέες μοριακές γενετικές τεχνικές είχαν σπουδαίες επιπτώσεις στους τομείς της οικολογίας, της εξέλιξης και της διατήρησης (Morin et al., 2004). Τα τελευταία χρόνια εμφανίστηκαν πολυάριθμοι μοριακοί δείκτες και χρησιμοποιούνται για διαφορετικούς σκοπούς στη γενετική έρευνα. Η χρήση μοριακών δεικτών αποτελεί την πιο σύγχρονη και αποτελεσματική τεχνική για τη μέτρηση της γενετικής ποικιλότητας. Οι τεχνικές τους προσφέρουν τρόπους εντοπισμού των πολυμορφισμών στο επίπεδο του γονιδιώματος και έτσι είναι εξαιρετικά χρήσιμοι για την παρακολούθηση της προσαρμογής πληθυσμών. Μερικές από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται αναπτύσσονται παρακάτω.

Οι μοριακοί δείκτες λοιπόν διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: οι κυρίαρχοι (dominant) και οι συγκυρίαρχοι (co-dominant). Ουσιαστικά οι κυρίαρχοι δείκτες μας επιτρέπουν την ανάλυση πολλών γενετικών τόπων την ίδια στιγμή, ενώ οι συγκυρίαρχοι μόνο ενός. Οι συγκυρίαρχοι μας δίνουν την δυνατότητα να αναγνωρίζουμε όλα τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα σε ένα γενετικό τόπο, ενώ οι κυρίαρχοι αποκαλύπτουν μόνο ένα. Αυτό βέβαια έχει ως αποτέλεσμα, τα δεδομένα των συγκυρίαρχων δεικτών να είναι πιο ακριβή από τα αντίστοιχα των κυρίαρχων, αν και οι κυρίαρχοι δείκτες απαιτούν λιγότερο χρόνο ανάπτυξης και ως εκ τούτου είναι πιο κατάλληλοι για τη γρήγορη συγκέντρωση δεδομένων. Οι συγκυρίαρχοι δείκτες είναι προτιμότεροι από τους κυρίαρχους κυρίως λόγω της μεγαλύτερης περιεκτικότητας πληροφοριών. Ένας συγκυρίαρχος μοριακός δείκτης επιτρέπει τον αδιαμφισβήτητο διαχωρισμό των ομόζυγων και ετερόζυγων γενοτύπων σε ένα ηλεκτροφορητικό πήκτωμα. Σε αντίθεση, για τους κυρίαρχους δείκτες, τα κυρίαρχα ομόζυγα και ετερόζυγα άτομα δεν μπορούν να διακριθούν με βάση την παρουσία ή απουσία ζωνών σε ένα πήκτωμα. Παρ' όλα αυτά, οι κυρίαρχοι δείκτες συνεχίζουν να είναι αρκετά δημοφιλείς, κυρίως για οικονομικούς λόγους (Piepho & Koch, 2000).

Παρακάτω αναπτύσσονται μερικές από τις τεχνικές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παρακολούθηση της προσαρμογής διαφόρων ειδών, όπως για παράδειγμα των εισβλητικών ειδών σε νέα περιβάλλοντα, είτε αυτές οι τεχνικές κάνουν χρήση συγκυρίαρχων είτε κυρίαρχων δεικτών.

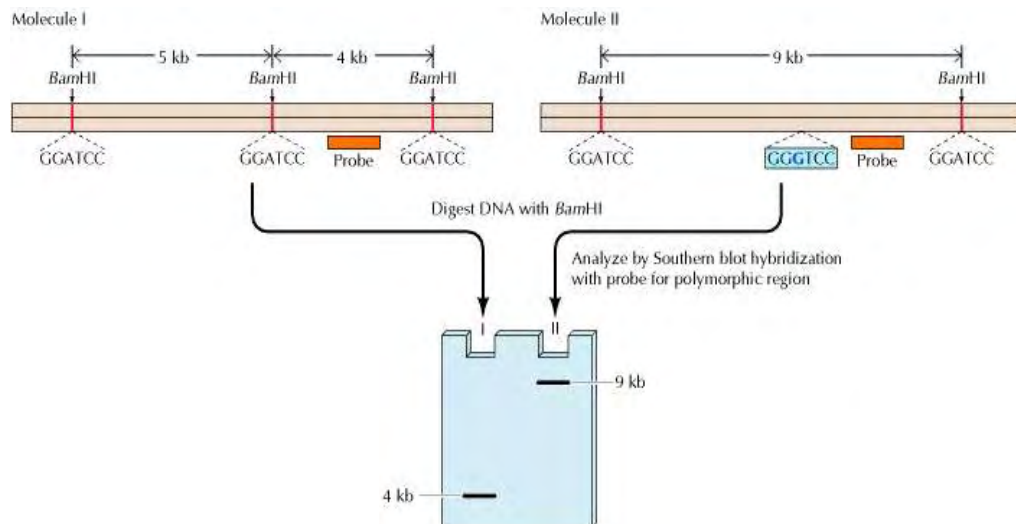
I.4.2.1. Συγκυρίαρχοι μοριακοί δείκτες

Στους διπλοειδείς οργανισμούς τέτοιου τύπου δείκτες θα αναγνωρίσουν ένα αλληλόμορφο στα ομόζυγα άτομα και δύο στα ετερόζυγα άτομα. Αυτή η ιδιότητα της διάκρισης ανάμεσα σε ομόζυγα και ετερόζυγα άτομα είναι από τις πιο σημαντικές αυτών των δεικτών αφού μας επιτρέπουν να υπολογίσουμε τη συχνότητα των αλληλομόρφων μέσα σε ένα δείγμα ατόμων (π.χ. πληθυσμό).

- Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων ή RFLP (Restriction fragment length polymorfism)

Ένα υποσύνολο των πολυμορφισμών φέρει διαφορές στην αλληλουχία του που καταστρέφουν ή δημιουργούν ένα σημείο αναγνώρισης από ένα ένζυμο περιορισμού, που οφείλεται σε απλές αλλαγές ενός μόνο νουκλεοτιδίου. Οι RFLPs αναφέρονται σε μια διαφορά μεταξύ τμημάτων ομόλογων μορίων DNA που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές αναγνώρισης περιοριστικών ενζύμων καθώς και στη σχετική εργαστηριακή τεχνική από την οποία μπορούν να παρατηρηθούν τα τμήματα αυτά (εικόνα 6). Η βασική τεχνική της ανίχνευσης RFLPs περιλαμβάνει τον τεμαχισμό του δείγματος DNA από περιοριστικά ένζυμα, τα οποία μπορούν να αναγνωρίσουν και να κόψουν το DNA σε όποια σημεία εμφανίζεται μια συγκεκριμένη σύντομη ακολουθία. Τα τμήματα του DNA που προκύπτουν κατόπιν διαχωρίζονται ανάλογα με το μήκος τους με ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων αгарόζης και μεταφέρονται σε μια μεμβράνη με τη διαδικασία αποτύπωσης κατά Southern. Η υβριδοποίηση της μεμβράνης με έναν ανιχνευτή με σημασμένο DNA καθορίζει το μήκος των τμημάτων που είναι συμπληρωματικά με τον ανιχνευτή. Εάν είναι γνωστή η αλληλουχία του DNA εκατέρωθεν του πολυμορφικού σημείου τότε είναι γενικά πιο εύκολη και πιο γρήγορη η ανάλυση ενός RFLP με την τεχνική της PCR. Για την ανάλυση αυτή, η PCR γίνεται με εκκινήτες εκατέρωθεν του πολυμορφικού σημείου αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού. Το προϊόν της PCR επωάζεται στη συνέχεια με το αντίστοιχο περιοριστικό ένζυμο και τα μεγέθη των τμημάτων που προκύπτουν αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα (Gelehrter et al., 2003).

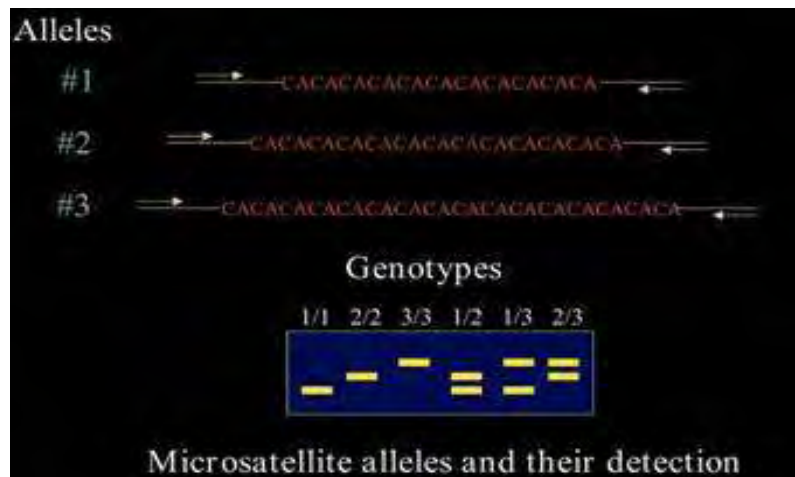
Ένας πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων υπάρχει όταν το μήκος ενός τμήματος που ανιχνεύεται ποικίλλει μεταξύ των ατόμων του πληθυσμού. Το κάθε μήκος θραυσμάτων που προκύπτει θεωρείται ως αλληλόμορφο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη γενετική ανάλυση.



Εικόνα 6. Ένας πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP). Η περιοχή του DNA που φαίνεται, έχει τρεις περιοχές πέψης για το *Bam*HI στο μόριο I. Στο μόριο II, μια από αυτές τις περιοχές έχει μεταλλαχθεί από A σε G, οπότε δεν αναγνωρίζεται πλέον από την ενδονουκλεάση περιορισμού. Η μετάλλαξη δημιουργεί ένα RFLP, που μπορεί να ανιχνευθεί με υβριδοποίηση κατά Southern του DNA που έχει υποστεί πέψη με ανιχνευτή προερχόμενο από την πολυμορφική περιοχή. Στο μόριο I, ο ανιχνευτής υβριδίζεται σε ένα τμήμα *Bam*HI 4kb, ενώ στο μόριο II, ο ανιχνευτής υβριδίζεται σε ένα τμήμα *Bam*HI 9kb διότι μια από τις *Bam*HI περιοχές έχει χαθεί (Cooper, 2000).

- Μικροδορυφόροι ή επαναλήψεις απλών αλληλουχιών ή SSR (simple sequence repeats)

Αυτή η κατηγορία πολυμορφισμών περιέχει εν σειρά επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες με τη βασική επαναλαμβανόμενη μονάδα να αποτελείται από 2, 3 ή 4 ζεύγη βάσεων. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων ετών η ταυτοποίηση περισσότερων από 10.000 δεικτών αυτού του είδους έχει διευκολύνει σημαντικά τη χαρτογράφηση και τις μελέτες σύνδεσης σε ανθρώπους αλλά και σε έναν αριθμό άλλων οργανισμών. Είναι απλοί και πολυποίκιλοι δείκτες με διακριτούς πολυμορφισμούς. Χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση DNA, έρευνες συγγένειας ή για πληθυσμιακές μελέτες, αλλά επίσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν και για μελέτη μεταλλάξεων διπλασιασμού ή διαγραφής γονιδίων. Τα αλληλόμορφα για τον πολυμορφισμό των SSRs είναι πολλά και καθένα από αυτά φέρει έναν διαφορετικό αριθμό αντιγράφων της απλής επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας. Οι μικροδορυφόροι μπορούν να αναλυθούν με την τεχνική της PCR. Όταν ο γενετικός τόπος πολλαπλασιαστεί με την χρησιμοποίηση εκκινητών το προϊόν διαφόρων αλληλομόρφων διαφέρει σε μήκος σε πολλαπλάσια της επαναλαμβανόμενης ομάδας. Αυτά τα διαφορετικά μεγέθη μπορούν να αναλυθούν εύκολα με ηλεκτροφορητική ανάλυση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Gelehrter et al., 2003) (εικόνα 7).



Εικόνα 7. Μικροδορυφόροι ως μοριακοί δείκτες. Απεικόνιση 3 πολυμορφικών αλληλομόρφων ως προς τους μικροδορυφόρους τους. Μετά από PCR και ηλεκτροφόρηση, διακρίνονται εύκολα τα πολυμορφικά αλληλόμορφα με βάση το μήκος τους δίνοντας έτσι τους γενότυπους των ατόμων.

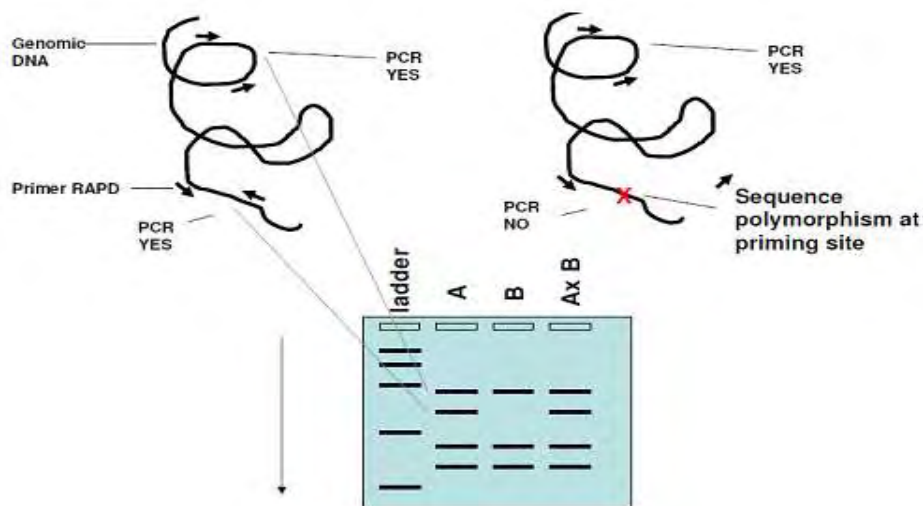
I.4.2.2. Κυρίαρχοι μοριακοί δείκτες

Οι κυρίαρχοι γενετικοί δείκτες επιτρέπουν την ταυτόχρονη παραγωγή δεδομένων από πολλούς γενετικούς τόπους (περισσότερων του ενός). Σε γενικές γραμμές σε αυτούς τους δείκτες γίνεται χρήση τυχαίων εκκινήτων για τον πολλαπλασιασμό «ανώνυμων» περιοχών του γονιδιώματος, παράγοντας ένα πρότυπο με πολυάριθμες ζώνες για κάθε άτομο. Για τους δείκτες αυτούς δεν απαιτείται η προγενέστερη γνώση της αλληλουχίας του DNA και ο χρόνος εφαρμογής τους είναι σχετικά μικρός αφού οι εκκινήτες που χρησιμοποιούνται για τον πολλαπλασιασμό του DNA είναι τυχαίοι. Επιπλέον, επειδή οι κυρίαρχοι δείκτες στοχεύουν πολλές και διαφορετικές περιοχές του γονιδιώματος, εμφανίζουν υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού και είναι χρήσιμοι για τη διερεύνηση στενά συγγενικών ατόμων. Ωστόσο το μεγάλο τους μειονέκτημα έγκειται στην ίδια τους τη φύση, αφού δεν μπορούμε να διακρίνουμε τα ετερόζυγα από τα ομόζυγα άτομα.

- Τυχαία ενισχυμένα πολυμορφικά DNA ή RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)

Τα RAPDs είναι τμήματα DNA που ενισχύονται με PCR χρησιμοποιώντας μικρούς, συνθετικούς εκκινήτες (~ 10 bp) με τυχαίες αλληλουχίες. Αυτά τα ολιγονουκλεοτίδια χρησιμεύουν και ως ευθείς και ως αντίστροφοι εκκινήτες και συνήθως ενισχύουν τμήματα από έναν έως 10 γενετικούς τόπους ταυτόχρονα (Spooner et al., 2005). Αυτοί οι εκκινήτες ανιχνεύουν

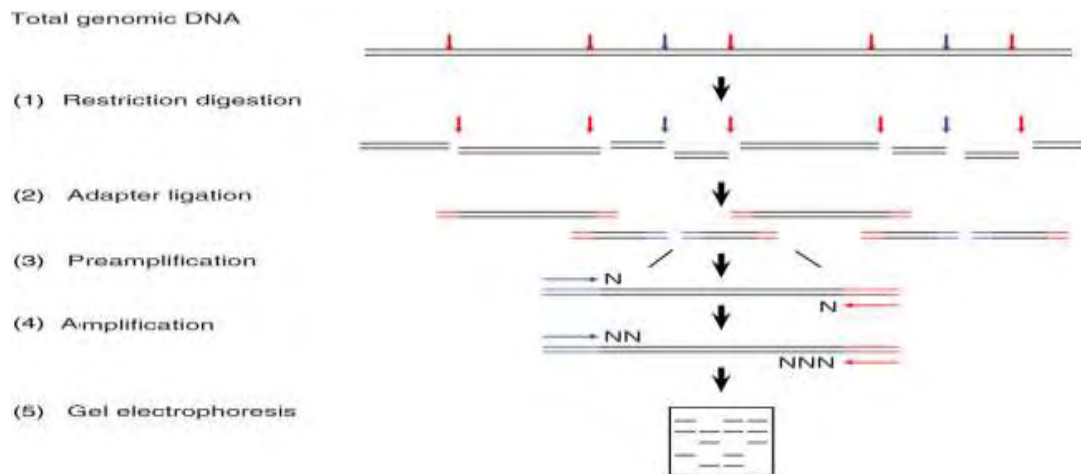
πολυμορφισμούς απουσία πληροφοριών για συγκεκριμένες νουκλεοτιδικές αλληλουχίες (Williams et al., 1990). Τα ενισχυμένα τμήματα, που συνήθως κυμαίνονται σε μεγέθη 0.5-5 kb, διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης και οι πολυμορφισμοί ανιχνεύονται, μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο, ως η παρουσία ή απουσία ζωνών συγκεκριμένων μεγεθών. Αυτοί οι πολυμορφισμοί θεωρούνται να οφείλονται κυρίως σε ποικιλότητα στις περιοχές δέσμευσης των εκκινήτων, αλλά μπορούν επίσης να δημιουργούνται από τις διαφορές στα μήκη των ενισχυμένων αλληλουχιών, μεταξύ των περιοχών προσκόλλησης των εκκινήτων (εικόνα 7). Το κύριο προσόν των RAPDs είναι ότι αποτελεί μια γρήγορη και εύκολη στην ανάλυσή της τεχνική. Τα βασικά προβλήματα των RAPDs είναι η επιμόλυνση και η επαναληψιμότητα (Melake- Berhan et al., 1993; Spooner et al., 2005).



Εικόνα 8. Στην εικόνα φαίνεται ο τρόπος με τον οποίο λειτουργεί μια ανάλυση RAPD. Δυο ομόλογοι γενετικοί τόποι εμφανίζουν πολυμορφισμό στην αλληλουχία που αποτελεί και σημείο δέσμευσης του τυχαίου εκκινήτη. Έτσι, μετά από PCR, στο αριστερό DNA θα ενισχυθούν δυο περιοχές, ενώ στο δεξιό ενισχύεται μόνο μια περιοχή, διότι η αλληλουχία προσκόλλησης του εκκινήτη είναι μεταλλαγμένη. Στο πήκτωμα αγαρόζης βλέπουμε τα προϊόντα της PCR για τις δυο ομόζυγες (A για το DNA που φαίνεται στα αριστερά της εικόνας και B για το DNA που φαίνεται στα δεξιά) και την ετερόζυγη κατάσταση (Ax B) ως προς τον πολυμορφισμό. Οι δυο πρώτες ζώνες του A αντιπροσωπεύουν τα δυο τμήματα που απεικονίζονται να ενισχύονται και στο B, εφόσον δεν ενισχύεται η μια απ τις δυο περιοχές που φαίνονται, δεν υπάρχει η δεύτερη ζώνη. Στην ετερόζυγη περίπτωση (Ax B) η δεύτερη ζώνη φαίνεται καθώς υπάρχουν και τα δυο αλληλόμορφα και η ζώνη σχηματίζεται από το προϊόν της PCR το αλληλομόρφου A.

- Πολυμορφισμός μεγέθους ενισχυμένων τμημάτων PCR ή AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism PCR)

Η AFLP είναι μια τεχνική που βασίζεται στην PCR και χρησιμοποιείται στη γενετική έρευνα, στη «δακτυλική αποτύπωση» του DNA όπως επίσης και στη γενετική μηχανική. Η τεχνική AFLP αποτελεί συνδυασμό της RFLP και της PCR και παρέχει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα σε σχέση με την RAPD. Επίσης είναι πιο απαιτητική τεχνική από την RAPD αφού χρειάζεται καλύτερης ποιότητας DNA. Τα AFLP είναι τμήματα DNA (80-500 bp) που προέρχονται από πέψη με περιοριστικά ένζυμα, ακολούθως συνδέονται με ολιγονουκλεοτιδικούς προσαρμογείς που φέρουν κολλώδη άκρα συμπληρωματικά με αυτά που δημιουργούνται από τα περιοριστικά ένζυμα στο DNA και τέλος επιλεκτική ενίσχυση με PCR. Το πρότυπο των ζωνών καθορίζεται από το μέγεθος των αλληλουχιών μεταξύ των προσαρμογέων, που ουσιαστικά αντιπροσωπεύουν τις αποστάσεις των περιοριστικών θέσεων. Η τεχνική AFLP δημιουργεί ταυτόχρονα τμήματα από πολλούς γενετικούς τόπους (συνήθως 50-100 τμήματα) που διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Όπως και στα RAPDs, το πρότυπο των ζωνών είναι τυχαίο, αλλά σε αντίθεση με τα RAPDs ως τεχνική εμφανίζει υψηλή επαναληψιμότητα και για αυτό είναι η πιο δημοφιλής μέθοδος εντός των κυριάρχων δεικτών (Spooner et al., 2005). Στην εικόνα 9 απεικονίζεται η τεχνική AFLP σε στάδια.



Εικόνα 9. Στην εικόνα διακρίνονται συνοπτικά τα βήματα της εργαστηριακής τεχνικής AFLP. (1) Πέψη του γονιδιακού DNA με ένζυμα περιορισμού (στην εικόνα δυο διαφορετικά ένζυμα περιορισμού) τα οποία απεικονίζονται με κόκκινα και μπλε βέλη. (2) Ένωση των κλασμάτων του DNA που δημιουργούνται μετά τη δράση των ενζύμων περιορισμού με προσαρμογείς συγκεκριμένους για τα άκρα κάθε τμήματος. (3) Ένα στάδιο πριν την ενίσχυση, είναι η χρήση εκκινήτων που είναι συμπληρωματικοί των αλληλουχιών των προσαρμογέων και φέρουν από ένα επιλεκτικό νουκλεοτίδιο ο καθένας (στην εικόνα φαίνεται ως N) στο 3' άκρο τους (4) Ενίσχυση των τμημάτων του DNA που έχουν διαμορφωθεί από τα ένζυμα περιορισμού με PCR κατά την οποία προστίθενται επιπλέον νουκλεοτίδια. (5) Εμφάνιση των προϊόντων της ενίσχυσης μετά τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης.

Η ανίχνευση προσαρμοστικών γενετικών τόπων στο γονιδίωμα έχει ουσιαστική σημασία, εφόσον παρέχει την δυνατότητα κατανόησης του τι ποσοστό του γονιδιώματος ή ποια γονίδια διαμορφώνονται κάτω από την επίδραση της φυσικής επιλογής (Joost et al., 2007). Από τις διάφορες τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί και μερικές από τις οποίες αναλύθηκαν παραπάνω, μπορούν να μας αποκαλύψουν ποιές είναι οι περιοχές του γονιδιώματος που υφίστανται τις δυνάμεις της επιλογής, με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η παρακολούθηση της προσαρμογής.

1.5. Ο δάκος *Bactrocera oleae*, σαν οργανισμός-παράδειγμα για τη μελέτη της προσαρμογής του ευκαρυωτικού γονιδιώματος σε νέα περιβάλλοντα.

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι ένα χαρακτηριστικό που αναπτύσσουν τα έντομα το οποίο διευκολύνει τη μελέτη δαρβινικών διεργασιών, όπως η προσαρμογή στους φυσικούς πληθυσμούς για δύο κύριους λόγους: η επιλογή είναι ισχυρή και η εξέλιξη ταχεία. Για να κατανοήσουμε τις παραμέτρους που επιτρέπουν ταχεία προσαρμογή στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, στην παρούσα εργασία μελετάμε την εξέλιξη της ανθεκτικότητας στο δάκο της ελιάς *Bactrocera oleae*. Ο δάκος είναι το πλέον καταστροφικό παράσιτο της ελιάς. Είναι είδος ενδημικό στη Μεσογειακή λεκάνη και τη Μέση Ανατολή όπου η εξάπλωσή του ακολουθεί την εξάπλωση της καλλιέργειας της ελιάς. Την τελευταία εικοσαετία έχει εισβάλει και στην Αμερικανική ήπειρο και πιο συγκεκριμένα στην πολιτεία της Καλιφόρνια. Ωστόσο, στα φυσικά του ενδιαίτηματα, πριν την μετανάστευσή του, ανέπτυξε ανθεκτικά στελέχη λόγω της συνεχούς και εκτεταμένης χρήσης οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων. Ο κύριος στόχος των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων είναι η ακετυλοχολινεστεράση (AChE). Η ανθεκτικότητα του δάκου στα οργανοφωσφορικά έχει αποδειχθεί ότι συσχετίζεται με τρεις σημειακές μεταλλάξεις, G488S, I214V και Δ3Q στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης (Vontas et al., 2002; Kakani et al., 2008; 2011). Τα αλληλόμορφα που φέρουν αυτές τις μεταλλάξεις, είτε ξεχωριστά την καθεμία είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους έχουν βρεθεί σε φυσικούς πληθυσμούς ανά τον κόσμο. Οι μεταλλάξεις G488S και I214V βρίσκονται στο ενεργό κέντρο της AChE (Vontas et al., 2002) και ήταν οι πρώτες που συσχετίστηκαν με την ανθεκτικότητα του δάκου στα OPs. Παρουσία οργανοφωσφορικών, η αντικατάσταση γλυκίνης-σερίνης (G488S) προκαλεί ελάττωση της ευαισθησίας της ακετυλοχολινεστεράσης στα εντομοκτόνα. Η

μετάλλαξη I214V σε συνδυασμό με την G488S δημιουργεί 16πλάσια μείωση της ευαισθησίας στα εντομοκτόνα (Vontas et al., 2002). Η Δ3Q μετάλλαξη βελτιώνει τη μετα-μεταφραστική τροποποίηση της προσθήκης άγκυρας στο ένζυμο με αποτέλεσμα να εντοπίζονται περισσότερα μόρια στη συναπτική σχισμή, αντισταθμίζοντας με αυτόν τον τρόπο την αναστολή μεγάλου μέρους των ενζύμων από την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων εντομοκτόνου (Kakani et al., 2008;2011).

Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκαν φυσικοί πληθυσμοί από την Καλιφόρνια όπου η αντιμετώπιση του δάκου δεν πραγματοποιείται με οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, ώστε να μελετήσουμε την προσαρμογή των πληθυσμών αυτών σε νέα περιβάλλοντα, απουσία επιλεκτικών δυνάμεων. Η μελέτη της συχνότητας των ανθεκτικών αλληλομόρφων των τριών μεταλλάξεων I214V, G488S και Δ3Q σε συγκεκριμένους πληθυσμούς θα καταδείξει εάν είναι συσχετισμένο κάποιο κόστος με τις μεταλλάξεις ανθεκτικότητας και σε ποιο βαθμό συμβαίνει αυτό.

ΣΚΟΠΟΣ

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο την μελέτη της προσαρμογής φυσικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς στην Καλιφόρνια μέσω της ανάλυσης του ρυθμού απώλειας ανθεκτικών αλληλομόρφων του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης. Η επιλογή της ακετυλοχολινεστεράσης και της περιοχής της Καλιφόρνια αποτελεί έναν ιδανικό συνδυασμό για τη μελέτη της προσαρμογής ενός οργανισμού σε περιβάλλοντα χωρίς επιλεκτική πίεση. Αυτό συμβαίνει διότι ο δάκος της ελιάς, ο οποίος στα φυσικά του ενδιαιτήματα ανέπτυξε ανθεκτικά στελέχη λόγω της συνεχούς και εκτεταμένης χρήσης οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, έχει πρόσφατα μεταναστεύσει στην Καλιφόρνια όπου η αντιμετώπιση του πραγματοποιείται χωρίς τη χρήση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

Ο έλεγχος του ρυθμού απώλειας των ανθεκτικών αλληλομόρφων πραγματοποιήθηκε με την παρατήρηση των αλληλομορφικών συχνοτήτων του πληθυσμού μέσω μιας μοριακής δοκιμασίας η οποία βασίζεται σε συνδυασμό PCR/RFLP για την ανίχνευση των μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα και καθιστά δυνατή την απόδοση των γενοτυπικών συχνοτήτων των ανθεκτικών ή ευαίσθητων ατόμων που εξετάζονται. Τα δείγματα των φυσικών πληθυσμών του δάκου που μελετήθηκαν συλλέχθηκαν σε διαφορετικές χρονολογίες έτσι ώστε να γίνει σύγκριση των αλληλομορφικών συχνοτήτων σε διαδοχικές γενιές και όταν αυτά δεν βρίσκονται υπό την επιλεκτική πίεση των οργανοφωσφορικών. Από τη σύγκριση αυτή μπορεί να προσδιορίστηκε εάν η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου μειώνεται υπό την απουσία επιλογής.

Η μελέτη της προσαρμογής μέσω του ρυθμού της απώλειας ανθεκτικών αλληλομόρφων δίνει τη δυνατότητα πρόβλεψης μελλοντικών αλλαγών στην ανθεκτικότητα και μελέτες σαν και αυτή μπορούν να συνδράμουν στο σχεδιασμό νέων αποτελεσματικών στρατηγικών αντιμετώπισης και ελέγχου των παρασιτικών οργανισμών. Επίσης, τέτοιου είδους ερευνητικές εργασίες μπορούν να συνεισφέρουν στην κατανόηση και γνώση των εξελικτικών φαινομένων στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς.

II. ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ

II.1. Βιολογικό Υλικό

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας προήλθε από συλλογή ατόμων του δάκου της ελιάς *Bactrocera oleae* από φυσικούς του πληθυσμούς. Η συλλογή των πληθυσμών πραγματοποιήθηκε στις περιοχές San Diego, San Luis Obispo και Napa της Καλιφόρνια. Στον πίνακα 1 φαίνονται οι χρονολογίες της συλλογής των δειγμάτων όπως επίσης και ο αριθμός των δειγμάτων κάθε χρονιάς. Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε το γονιδιωματικό DNA αυτών των εντόμων για ανίχνευση τριών μεταλλάξεων (I214V, G488S, Δ3Q) στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και περαιτέρω ανάλυση του ρυθμού απώλειας των ανθεκτικών αλληλομόρφων των μεταλλάξεων αυτών.

Πίνακας 1. Περιοχή προέλευσης, χρονολογία συλλογής και αριθμός ατόμων *Bactrocera oleae* που μελετήθηκαν για μεταλλάξεις ανθεκτικότητας.

| Περιοχή | Χρονολογία συλλογής | Αριθμός ατόμων |
|-----------------|---------------------|----------------|
| San Diego | 2002 | 32 |
| San Diego | 2005 | 30 |
| San Diego | 2009 | 30 |
| San Luis Obispo | 2002 | 18 |
| San Luis Obispo | 2004 | 30 |
| San Luis Obispo | 2006 | 30 |
| San Luis Obispo | 2008 | 26 |
| Napa | 2004 | 27 |
| Napa | 2008 | 30 |

II.2. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Με τον όρο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction- PCR) αναφερόμαστε στην τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* παραγωγή μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (Mullis et al., 1986). Η τεχνική PCR αποτελεί ένα γρήγορο και εύκολο μέσο παραγωγής επαρκούς ποσότητας δείγματος για

περαιτέρω ανάλυση. Ο κυριότερος λόγος της ευρύτατης εφαρμογής της PCR έγκειται στο γεγονός ότι είναι από τις λίγες τεχνικές που συνδυάζουν εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία και μικρή χρονική διάρκεια.

Υλικά

Σε μια τυπική αντίδραση PCR, είναι απαραίτητα τα ακόλουθα συστατικά:

DNA μήτρα: Μια αρχική ποσότητα DNA η οποία περιέχει την αλληλουχία που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί

Εκκινητές (primers): Ένα ζεύγος ολιγονουκλεοτιδίων το οποίο χρησιμεύει στην έναρξη της αντιγραφής. Η πρωτοταγής του δομή πρέπει να είναι τέτοια που να μην επιτρέπει τον αυτοδιμερισμό ή τον αυτόματο σχηματισμό δευτεροταγών δομών. Ακόμη, οι εκκινητές πρέπει να μην είναι συμπληρωματικοί μεταξύ τους σε πολλές βάσεις και ιδιαίτερος στα άκρα, ώστε να μην ετεροδιμερίζονται.

Taq DNA πολυμεράση: Η θερμοσταθερή DNA πολυμεράση απομονώθηκε για πρώτη φορά από το θερμόφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus*. Η Taq πολυμεράση έχει ταχύτητα αντιγραφής περίπου 30 βάσεις ανά δευτερόλεπτο ανά μόριο και βέλτιστη θερμοκρασία πολυμερισμού στους 72-75°C, χωρίς να αποδιατάσσεται μέχρι τους 95°C. Αυτές οι χαρακτηριστικές ιδιότητες κάνουν την Taq πολυμεράση κατάλληλη για την αντίδραση της PCR, καθώς οι υψηλές θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται στην αντίδραση, είναι απαγορευτικές για DNA πολυμεράσες από άλλους οργανισμούς.

5' τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια(dNTPs): Αποτελούν τους δομικούς λίθους για τους νεοσυντιθέμενους κλώνους. Τα δεοξυριβονουκλεοτίδια αντιστοιχούν στις βάσεις A,T,G,C, που στρατολογούνται από την πολυμεράση για την επέκταση των εκκινητών.

Διάλυμα MgCl₂: Τα ιόντα Mg⁺⁺ δεν συμμετέχουν άμεσα στον πολυμερισμό, βοηθούν όμως στη σύνδεση της πολυμεράσης με το σύμπλοκο εκκινητή-DNA και την προσέλκυση των dNTPs στην αντιγραφόμενη περιοχή.

Ρυθμιστικό διάλυμα (reaction buffer): Η χημική του σύσταση, που ποικίλει αρκετά, έχει πάντα ως βάση το Tris- HCl για τη σταθερότητα του pH.

Το τελικό διάλυμα της PCR συνήθως κυμαίνεται από 20-50 μl και η όλη διαδικασία διενεργείται σε πλήρως αυτοματοποιημένο, προγραμματιζόμενο θερμικό κυκλοποιητή (PCR thermal cycler).

Αρχή μεθόδου

Η τεχνική PCR εφαρμόζεται για να ενισχύσει ένα τμήμα DNA που βρίσκεται ανάμεσα σε δυο περιοχές γνωστής αλληλουχίας. Η PCR αποτελείται από τρία διακριτά στάδια τα οποία επαναλαμβάνονται σε 30-40 κύκλους:

- την αποδιάταξη (denaturation) των δίκλωνων μορίων DNA που οδηγεί στην δημιουργία μονόκλωνων αλυσίδων. Η ολική αποδιάταξη του DNA στόχου και του προϊόντος σε κάθε κύκλο συνήθως λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες 94-95°C. Πριν από τον πρώτο κύκλο συνήθως προηγείται ένα στάδιο αποδιάταξης με μεγαλύτερη χρονική διάρκεια.
- την υβριδοποίηση (annealing) του αποδιατεταγμένου DNA με τους εκκινητές. Η θερμοκρασία και ο χρόνος που χρειάζεται για την υβριδοποίηση εξαρτάται από τη συγκέντρωσή τους στην αντίδραση, το μήκος και την αλληλουχία των βάσεων τους. Η θερμοκρασία της αντίδρασης για την υβριδοποίηση ρυθμίζεται περίπου στους 5°C χαμηλότερα από το σημείο τήξης (T_m^1).
- την επιμήκυνση (extension) κατά την οποία η θερμοκρασία αυξάνεται στους 72°C ώστε η Taq πολυμεράση να επιμηκύνει τους εκκινητές προσθέτοντας τα κατάλληλα dNTPs, συμπληρωματικά με την αλληλουχία της αλυσίδας-μήτρας. Με το τέλος του τρίτου σταδίου ολοκληρώνεται ο πρώτος κύκλος της PCR, καταλήγοντας στη δημιουργία δυο νέων, θυγατρικών, δίκλωνων αλυσίδων DNA.

Μέθοδος

1. Προσθέτουμε τα αντιδραστήρια της αντίδρασης σε σωληνάκι-PCR (200μl). Στην παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε επιλεκτική ενίσχυση των εξονίων 3, 6 και 10 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης *ace* του εντόμου *B. oleae*. Για την κάθε αντίδραση PCR ανά δείγμα, με τελικό όγκο 20 μl, χρησιμοποιούνται τα αντιδραστήρια και οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

¹ Το T_m ορίζεται ως η θερμοκρασία στην οποία το 1/2 των κλώνων DNA βρίσκονται στην δομή διπλής έλικας ενώ το υπόλοιπο 1/2 είναι αποδιαταγμένο. Το T_m ορίζεται από τη σχέση: $T_m = 4*(G+C) + 2*(A+T)$

Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για διεξαγωγή της αντίδρασης PCR.

| Αντιδραστήρια | Τελικές συγκεντρώσεις |
|--|------------------------------|
| Γονιδιακό DNA | 5-50 ng |
| Buffer (10x) | 1x |
| MgCl₂ (50μM) | 1.5 mM |
| dNTPs (10mM/2.5mM each) | 0.8mM/0.2mM each |
| Forward primer (10pmol/μl ή 10μM) | 0.45μM |
| Reverse primer (10pmol/μl ή 10μM) | 0.45μM |
| Taq πολυμεράση (5u/μl) | 1u |

Εφόσον η αντίδραση PCR πραγματοποιείται για ενίσχυση γονιδιωματικού DNA, η καθορισμένη τυπική συγκέντρωση στην αντίδραση είναι 5-50ng. Προκειμένου να υπολογίσουμε τον αρχικό όγκο του κάθε αντιδραστηρίου που θα προστεθεί, εκτός της *Taq* πολυμεράσης, χρησιμοποιούμε την εξίσωση $c_1 * V_1 = c_2 * V_2$ (όπου c_1 η αρχική συγκέντρωση, c_2 η τελική συγκέντρωση, V_1 ο αρχικός όγκος και V_2 ο τελικός όγκος). Για τον υπολογισμό του αρχικού όγκου της *Taq* πολυμεράσης που πρέπει να προστεθεί, χρησιμοποιούμε μια απλή εξίσωση αναλογίας (5u σε 1μl, 1u σε χμl).

Οι ειδικά σχεδιασμένοι ολιγονουκλεοτιδικοί εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για τα εξόνια 3, 6 και 10 παρουσιάζονται στον Πίνακα 3. Παρουσιάζονται επιπλέον στον ίδιο πίνακα τα μεγέθη των προϊόντων της αντίδρασης PCR των ενισχυμένων εξονίων.

Πίνακας 3. Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για την ενίσχυση των αντιστοιχων εξονίων και μέγεθος προϊόντος PCR.

F: forward (εμπρόσθιος), **R:** reverse (ανάστροφος)

| Εξόνια γονιδίου <i>Ace</i> | PCR εκκινητές | Μέγεθος προϊόντος PCR |
|----------------------------|---|-----------------------|
| Εξόνιο 3 | Boace 3F : 5'GCTTACCCGTGCTTATTTGG3' Boace 3R: 5'AGCCAACGTATAGCCAATGC3' | 232 kb |
| Εξόνιο 6 | D6F: 5'TATTATACACACCAGCTGGGTTGGTAATCCG3' D6R: 5'ATATTTATAAGGGCAGGTGAAGAAITGACCGC3' | 100 kb |
| Εξόνιο 10 | Boace10F: 5'TGAAGTCAAACCATCATCCG3' Boace10R: 5'GACAGCGCCAACATGAACG3' | 96 kb |

2. Τοποθετούμε τα σωληνάκια τύπου PCR σε κυκλικό κυκλοποιητή που προγραμματίζεται κατάλληλα ανάλογα με την αλληλουχία στόχο που θέλουμε να ενισχύσουμε. Προκειμένου να επιτευχθεί ο πολλαπλασιασμός των υπό μελέτη εξονίων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα πρωτόκολλα θερμοκρασιών- χρόνων της PCR:

- Για το εξόνιο 3 του γονιδίου *ace*:

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-----------------------------|-------------|--------|----------------|
| Επώαση | 94 °C | 5min | 1 |
| Αποδιάταξη | 95 °C | 15sec | |
| Υβριδοποίηση | 60 °C | 30sec | 30 |
| Πολλαπλασιασμός | 72 °C | 45sec | |
| Τελική επέκταση | 72 °C | 5min | 1 |
| Θερμοκρασία αναμονής | | 4°C | |

- Για το εξόνιο 6 του γονιδίου *ace*:

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-----------------------------|-------------|--------|----------------|
| Επώαση | 94 °C | 5min | 1 |
| Αποδιάταξη | 94 °C | 30sec | |
| Υβριδοποίηση | 60 °C | 30sec | 30 |
| Πολλαπλασιασμός | 72 °C | 30sec | |
| Τελική επέκταση | 72 °C | 5min | 1 |
| Θερμοκρασία αναμονής | | 4°C | |

- Για το εξόνιο 10 του γονιδίου *ace*:

| | Θερμοκρασία | Χρόνος | Αριθμός κύκλων |
|-----------------------------|-------------|--------|----------------|
| Επώαση | 94 °C | 4min | 1 |
| Αποδιάταξη | 94 °C | 30sec | |
| Υβριδοποίηση | 51°C | 30sec | 30 |
| Πολλαπλασιασμός | 72 °C | 30sec | |
| Τελική επέκταση | 72 °C | 7min | 1 |
| Θερμοκρασία αναμονής | | 4°C | |

3. Τα προϊόντα των αντιδράσεων PCR για τα τρία εξόνια ηλεκτροφορούνται σε πήκτωμα αγαρόζης 1%(w/v) για έλεγχο.

II.3. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης είναι η κύρια μέθοδος για το διαχωρισμό, τον χαρακτηρισμό και την απομόνωση DNA μορίων (Lees & Bahaman, 2010). Η τεχνική είναι απλή, γρήγορη και ικανή να διαχωρίζει

μίγματα κομματιών DNA που δεν είναι εφικτό να διαχωριστούν με άλλες τεχνικές. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται συνήθως σε οριζόντιο επίπεδο υπό ηλεκτρικό πεδίο σταθερής τάσης. Το πήκτωμα είναι ένα δίκτυο από πόρους μέσα από τους οποίους τα μόρια DNA, που είναι αρνητικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH, μετακινούνται προς το θετικό ηλεκτρόδιο. Τα μικρότερα μόρια εμποδίζονται λιγότερο από τους πόρους σε σχέση με τα μεγαλύτερα και ως εκ τούτου κινούνται στο πήκτωμα ταχύτερα. Σχηματίζονται συνεπώς στο πήκτωμα ζώνες (bands) από τα μόρια διαφορετικού μεγέθους οι οποίες μπορούν να ανιχνευθούν με χρήση υπεριώδους φωτός.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA στα πήκτωμα αгарόζης εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος του DNA, τη συγκέντρωση αгарόζης, τη στερεοδιάταξη του DNA και την ένταση του ρεύματος.

Υλικά

Αγαρόζη: Η συγκέντρωση της αгарόζης λειτουργεί αντιστρόφως ανάλογα με την κινητικότητα ενός κομματιού DNA. Πηκτώματα με διαφορετική συγκέντρωση αгарόζης έχουν διαφορετική διαχωριστική ικανότητα γραμμικών μορίων DNA. Σε πήκτωμα αгарόζης διαφόρων συγκεντρώσεων μπορούν να διαχωριστούν τμήματα DNA μεγέθους από 100bp έως 50kb.

Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5x: 1 λίτρο ρυθμιστικού διαλύματος περιέχει 54g Tris-base, 27.5g Boric Acid και 20ml EDTA (pH 8.0). Το διάλυμα αυτό κρατά το DNA αποπρωτονιωμένο και διαλυτό στο νερό. Ο ρόλος του EDTA, ως χηλικός υποκαταστάτης δισθενών κατιόντων, είναι η προστασία των νουκλεϊνικών κατά της ενζυμικής δράσης.

Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 10x: περιέχει 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανού της ξυλόλης και 15% φικκόλη σε νερό. Φορτώνεται μαζί με το DNA για να διευκολύνει την καθίζησή του στο πηγαδάκι και να υπάρχει ένα μέτρο του σημείου που βρίσκεται το DNA ανά πάσα στιγμή στο πήκτωμα.

Βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr): Χρησιμοποιείται για την οπτικοποίηση των προϊόντων της PCR σε ορατές ζώνες. Έχει την ιδιότητα να παρεμβάλλεται στη διπλή έλικα του DNA και φθορίζει σε ανοιχτό κόκκινο με την ακτινοβόληση υπεριώδους φωτός.

Μάρτυρας (Ladder): Χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό του μεγέθους DNA αντιστοιχώντας τη ζώνη που βρίσκεται προς εξέταση με ζώνες του μάρτυρα.

Μέθοδος

- Παρασκευή 100ml πηκτώματος αγαρόζης 1% και 3,5%
1. Ζυγίζουμε την απαιτούμενη ποσότητα σκόνης αγαρόζης. Για την παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν πηκτώματα αγαρόζης 1% και 3.5%. Για 100ml πηκτώματος αγαρόζης 1% ζυγίζουμε 1g αγαρόζης και για 100ml πηκτώματος αγαρόζης 3,5% ζυγίζονται 3,5g αγαρόζης.
 2. Σε κωνική φιάλη προσθέτουμε την αγαρόζη και 100ml ρυθμιστικού διαλύματος TBE (0.5x ή 1x)
 3. Το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης θερμαίνεται και ανά τακτά χρονικά διαστήματα ανακινείται μέχρις ότου το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια κατεβάζουμε τη θερμοκρασία κάτω από νερό ώστε το ζεστό διάλυμα να μην επηρεάσει την πλαστική βάση.
 4. Προσθέτουμε βρωμιούχο αιθίδιο έτσι ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση 0.5μg/ml και ανακινούμε την κωνική φιάλη.
 5. Μεταφέρουμε το διάλυμα της αγαρόζης στη βάση της ηλεκτροφορητικής συσκευής όπου θα στερεοποιηθεί το πήκτωμα, στην οποία προηγουμένως έχουμε τοποθετήσει στην κατάλληλη θέση τα χτενάκια που θα δημιουργήσουν θήκες για τη φόρτωση των δειγμάτων ή πηγαδάκια.
 6. Ελέγχουμε το διάλυμα αγαρόζης για φυσαλίδες που θα δημιουργούσαν πρόβλημα στην πορεία της ηλεκτροφόρησης. Το διάλυμα στερεοποιείται για περίπου 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
 7. Όταν πήξει εντελώς η αγαρόζη, αφαιρούμε προσεκτικά τα χτενάκια.

- Ηλεκτροφόρηση
1. Βυθίζουμε το στερεοποιημένο πήκτωμα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης που έχει πληρωθεί με το ρυθμιστικό διάλυμα TBE ίδιας συγκέντρωσης με αυτή που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή του πηκτώματος. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης προϋποθέτει την πλήρη κάλυψη του πηκτώματος από το ρυθμιστικό διάλυμα.
 2. Προετοιμάζουμε τα δείγματά μας με ανάμιξη διαλύματος φόρτωσης.
 3. Τα δείγματα και ο μάρτυρας φορτώνονται στα πηγαδάκια.
 4. Η ηλεκτροφορητική συσκευή τροφοδοτείται με ρεύμα τάσης περίπου 100V.

Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης μπορούμε να παρατηρήσουμε το διαχωρισμό των ζωνών του DNA, με έκθεση του πηκτώματος σε υπεριώδη ακτινοβολία. Επίσης, χρησιμοποιώντας υπεριώδες φως μπορούμε να φωτογραφήσουμε το πήκτωμα.

II.4. Πέψη DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Οι ενδονουκλεάσες περιορισμού, οι οποίες απομονώνονται από φυσικές πηγές (βακτήρια), αναγνωρίζουν μικρές αλληλουχίες DNA και πέπτουν το δίκλωνο DNA σε συγκεκριμένες θέσεις εντός της αλληλουχίας αναγνώρισης ή σε γειτονικό της σημείο (Bloch & Grossmann, 2001). Ο φυσικός τους ρόλος είναι η καταστροφή κάθε ξένου μορίου DNA που εισβάλει στο βακτήριο, έτσι με αυτόν τον τρόπο το προστατεύει. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης έχουν συνήθως μήκος 4-8 νουκλεοτίδια και συχνά είναι παλίνδρομες. Τα τμήματα του DNA που παράγονται από την πέψη με την ενδονουκλεάση περιορισμού έχουν πάντα τα ίδια άκρα, είτε αυτά είναι προεξέχοντα μονόκλινα είτε είναι τυφλά. Μια μονάδα (1U) ενδονουκλεάσης περιορισμού ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την πλήρη πέψη 1μg DNA φάγου λ σε χρόνο 60min. Οι αντιδράσεις πέψης, πραγματοποιούνται σε συγκεντρώσεις άλατος και θερμοκρασίες που αναγράφονται κάθε φορά στα συνοδευτικά φυλλάδια των ενζύμων της κατασκευάστριας εταιρίας και είναι ειδικές για κάθε ενδονουκλεάση περιορισμού.

Υλικά

Δείγματα DNA: τα δείγματα των PCR ενισχυμένων εξονίων 3, 6 και 10 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του εντόμου *B. oleae*.

Ρυθμιστικό διάλυμα επώασης (Buffer 10x): Το κάθε ένζυμο περιορισμού απαιτεί το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα για την επαγωγή της βέλτιστης δραστηριότητάς του, ώστε να πέπτει αποτελεσματικά τα δείγματα του δίκλωνου DNA.

Ένζυμο περιορισμού: Ο όγκος του ενζύμου περιορισμού δεν πρέπει να ξεπερνά το 1/10 του τελικού όγκου της αντίδρασης, ώστε η τελική συγκέντρωση της γλυκερόλης, που περιέχεται στο διάλυμα φύλαξης του ενζύμου, να παραμείνει χαμηλή και να μην επηρεάσει την αντίδραση. Η ενεργότητα των ενζύμων επηρεάζεται επίσης από τη σύσταση του διαλύματος

επώασης, αφού κάθε ένζυμο εμφανίζει διαφορετικές συνθήκες ως βέλτιστες για την ενεργότητά του.

Μέθοδος

Για μια αντίδραση πέψης χρησιμοποιούνται οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που φαίνονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων για την αντίδραση πέψης με ένζυμο περιορισμού.

| Αντιδραστήρια | Τελικές συγκεντρώσεις |
|-----------------------------|-----------------------|
| Buffer (10x) | 1x |
| Ένζυμο περιορισμού (10u/μl) | 5u/μl |

Ο υπολογισμός του αρχικού όγκου του ρυθμιστικού διαλύματος επώασης που θα προστεθεί πραγματοποιείται από την εξίσωση που ισχύει για τις αραιώσεις $C_1 * V_1 = C_2 * V_2$, ενώ ο υπολογισμός του αρχικού όγκου του ενζύμου περιορισμού προκύπτει από μια εξίσωση αναλογίας.

1. Σε ένα σωληνάκι τύπου eppendorf τοποθετούμε το δείγμα DNA, το ρυθμιστικό διάλυμα (1x), το διπλά αποστειρωμένο νερό μέχρι να συμπληρωθεί ο τελικός όγκος της αντίδρασης και τελευταίο το ένζυμο.
2. Με ελαφρά ανάδευση ομογενοποιούμε το μίγμα της αντίδρασης και ακολουθεί επώαση για 1-2 ώρες στη θερμοκρασία που είναι κατάλληλη για τη δράση του κάθε ενζύμου, που συνήθως βρίσκεται στους 37°C.
3. Ο έλεγχος των αντιδράσεων πέψης πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση του δείγματος από το μίγμα της αντίδρασης σε πήκτωμα αγαρόζης.

Τα ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της ύπαρξης μεταλλάξεων στα εξόνια 3, 6 και 10 της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου είναι τα: *AccI* για το εξόνιο 3, *MblI* για το εξόνιο 6 και *MwoI* για το εξόνιο 10. Οι αλληλουχίες αναγνώρισης και οι θέσεις κοπής αυτών των ενδονουκλεασών περιορισμού φαίνονται στον Πίνακα 5. Επίσης στον πίνακα αυτό παρέχονται και πληροφορίες για τις συνθήκες επώασης των ενζύμων καθώς επίσης αναφέρονται και οι οργανισμοί από τους οποίους προέρχονται οι συγκεκριμένες ενδονουκλεάσες περιορισμού.

Πίνακας 5. Ιδιότητες ενζύμων περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη πολυμορφισμών του εξονίου 3, του εξονίου 6 και του εξονίου 10. (όπου M= A/C, K= G/T, N= A/C/G/T)

| Ενδονουκλεάση περιορισμού | Οργανισμός προέλευσης | Αλληλουχία αναγνώρισης | Χρόνος επώασης (h) | Βέλτιστη θερμοκρασία δράσης |
|---------------------------|------------------------------------|--|--------------------|-----------------------------|
| <i>AccI</i> | <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> | 5'...GT [^] MKAC...3' 3'...CAKM _^ TG...5' | 1-16 | 37°C |
| <i>MbI</i> | <i>Moraxella bovis</i> | 5'...CCG [^] CTC...3' 3'...GGC _^ GAG...5' | 1-16 | 37°C |
| <i>MwoI</i> | <i>Methanobacterium wolfeii</i> | 5'...GCNNNNN [^] NNGC...3' 3'...CGNN _^ NNNNNCG...5' | 1-16 | 50°C |

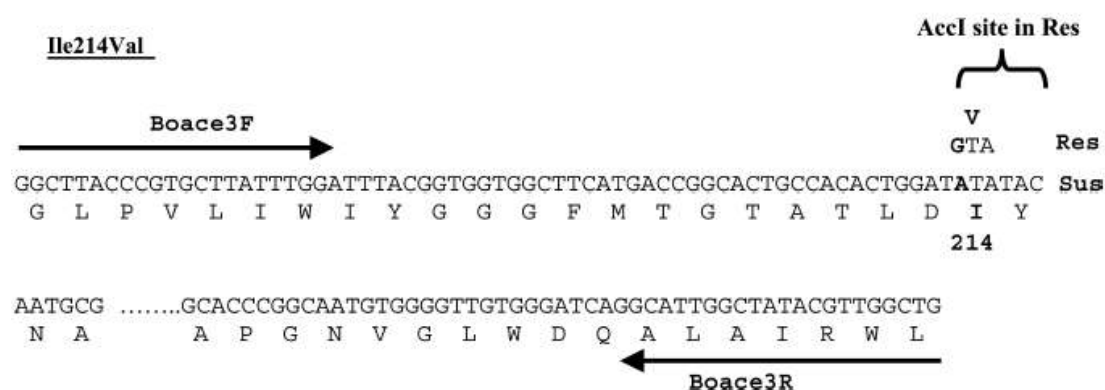
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

III.1. Μοριακός έλεγχος παρουσίας μεταλλάξεων

Στην παρούσα πειραματική εργασία μελετήθηκαν τρεις μεταλλάξεις του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης (*ace*) που έχει αποδειχθεί ότι προσδίδουν ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα στο *Bactrocera oleae*. Ο έλεγχος της παρουσίας ή απουσίας των μεταλλάξεων πραγματοποιείται με PCR-RFLP δοκιμασία που περιλαμβάνει την PCR ενίσχυση σε τμήματα των εξονίων 3, 6 και 10 του γονιδίου *ace* με τη χρήση των κατάλληλα σχεδιασμένων εκκινήτων για το κάθε ένα εξόνιο και την πέψη των προϊόντων με τα ένζυμα περιορισμού *AccI*, *Mbl* και *Mwo* αντίστοιχα. Συνολικά αναλύθηκαν 253 δείγματα DNA ατόμων που συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικές περιοχές της Καλιφόρνια (San Diego, San Luis Obispo, Napa) σε διαφορετικές χρονολογίες και όλα εξετάστηκαν για την παρουσία των τριών αυτών μεταλλάξεων που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα και στα τρία εξόνια του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης.

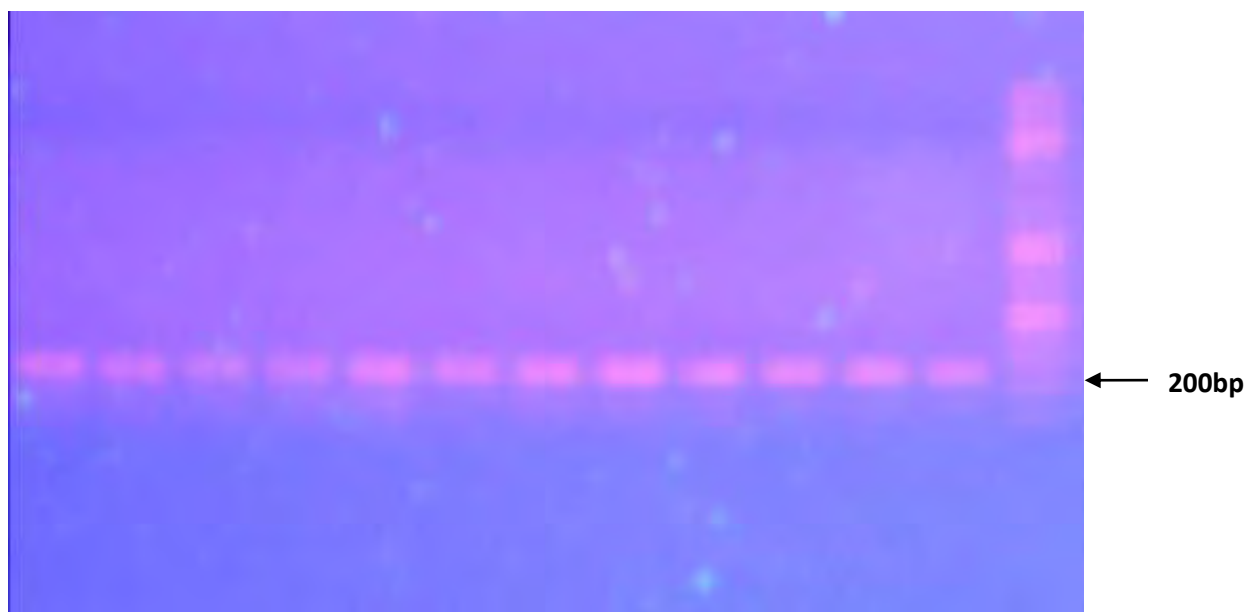
III.1.1. Έλεγχος παρουσίας της μετάλλαξης Ile214Val

Η μετάλλαξη του γονιδίου *ace* Ile214Val είναι μια από τις δυο πρώτες που ανακαλύφθηκαν σε ένα ανθεκτικό στέλεχος *B. oleae* από την Αττική (Vontas et al., 2002). Η μετάλλαξη εντοπίζεται στο τρίτο εξόνιο του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης (II), αλλάζοντας ένα κωδικόνιο ATA σε GTA και οδηγώντας στην αντικατάσταση μιας ισολευκίνης από μια βαλίνη. Η μετάλλαξη I214V δημιουργεί μια θέση αναγνώρισης για το ένζυμο περιορισμού *AccI* (εικόνα 14).



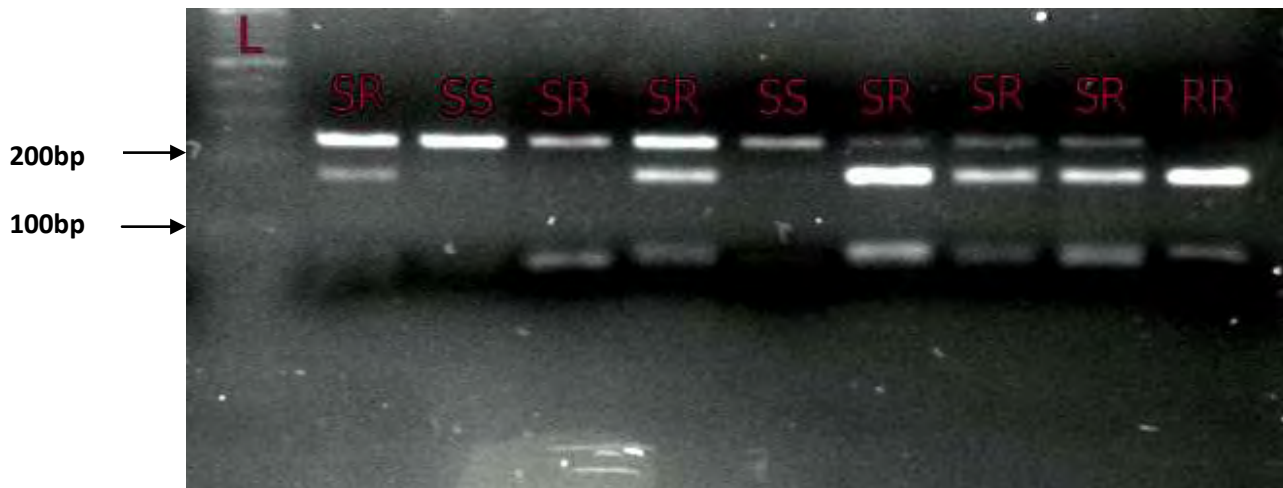
Εικόνα 14. Διαγραμματική αναπαράσταση της τοποθεσίας των εκκινήτων και της θέσης αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού που δημιουργείται από τη μετάλλαξη I214V στο εξόνιο 3 του γονιδίου *ace* του *B. oleae*.

Από την PCR ενίσχυση του εξονίου 3 του γονιδίου *ace* με εκκινητές τους Boace 3F και 3R, προκύπτουν προϊόντα των 232 bp. Αυτά έπειτα ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (εικόνα 15).



Εικόνα 15. Προϊόντα PCR ενίσχυσης τμήματος του εξονίου 3 του γονιδίου *ace* του δάκου με τους εκκινητές Boace 3F και 3R.

Η παρουσία των ανθεκτικών και των ευαίσθητων αλληλομόρφων του τρίτου εξονίου, καθορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (2,0%) του PCR ενισχυμένου εξονίου που υπέστη πέψη με το ένζυμο *AccI*. Τα ευαίσθητα αλληλόμορφα έχουν το πλήρες μήκος του εξονίου εφόσον δεν υπάρχει θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού δίνοντας μια ηλεκτροφορητική ζώνη μεγέθους 232 bp, ενώ τα ανθεκτικά αλληλόμορφα με πέψη από το ένζυμο περιορισμού δίνουν δύο ηλεκτροφορητικές ζώνες μία των 168 και μία των 64 βάσεων (Εικόνα 16). Με αυτόν τον τρόπο ανιχνεύεται η παρουσία της συγκεκριμένης μετάλλαξης στο γονιδίωμα του δάκου.



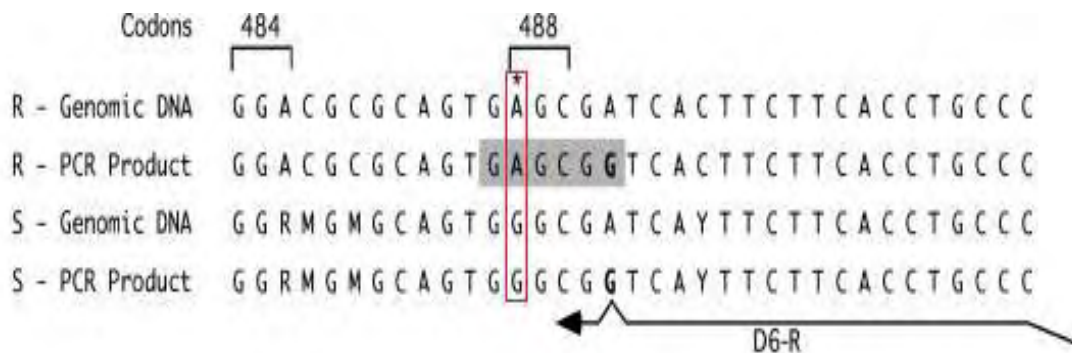
Εικόνα 16. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πέψεων των προϊόντων ενίσχυσης του τρίτου εξονίου του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του *B. oleae* με το ένζυμο *AccI*. Τα άτομα, τα οποία δεν φέρουν τη μετάλλαξη (SS) παρουσιάζουν μόνο τη ζώνη των 232bp. Τα άτομα που είναι ομοζυγωτικά ως προς τη μετάλλαξη (RR) παρουσιάζουν δυο ζώνες των 168 και 64bp. Όπου υπάρχουν και οι τρεις ζώνες εντοπίζονται τα άτομα που φέρουν τη μετάλλαξη σε ετεροζυγωτία (SR). Με L συμβολίζεται ο μάρτυρας και με τα βέλη φαίνονται οι ζώνες των 100 και 200bp.

III.1.2. Έλεγχος παρουσίας της μετάλλαξης Gly488Ser

Η μετάλλαξη του γονιδίου *ace* Gly488Ser ανακαλύφθηκε στο προαναφερθέν ανθεκτικό στέλεχος της Απτικής και μαζί με την I214V του προσδίδουν 16-πλάσια ανθεκτικότητα (Vontas et al., 2002). Η γλυκίνη στη θέση 488 του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης του *B. oleae* είναι ένα εξαιρετικά συντηρημένο κατάλοιπο ανά τα είδη, υποδηλώνοντας ότι κατέχει ένα σπουδαίο ρόλο στην πρωτεΐνη, που είναι είτε δομικός είτε λειτουργικός. Η μετάλλαξη Gly488Ser εντοπίζεται στο έκτο εξόνιο (VI) του γονιδίου του *B. oleae* και είναι επακόλουθο της μεταβολής του GGC σε AGC.

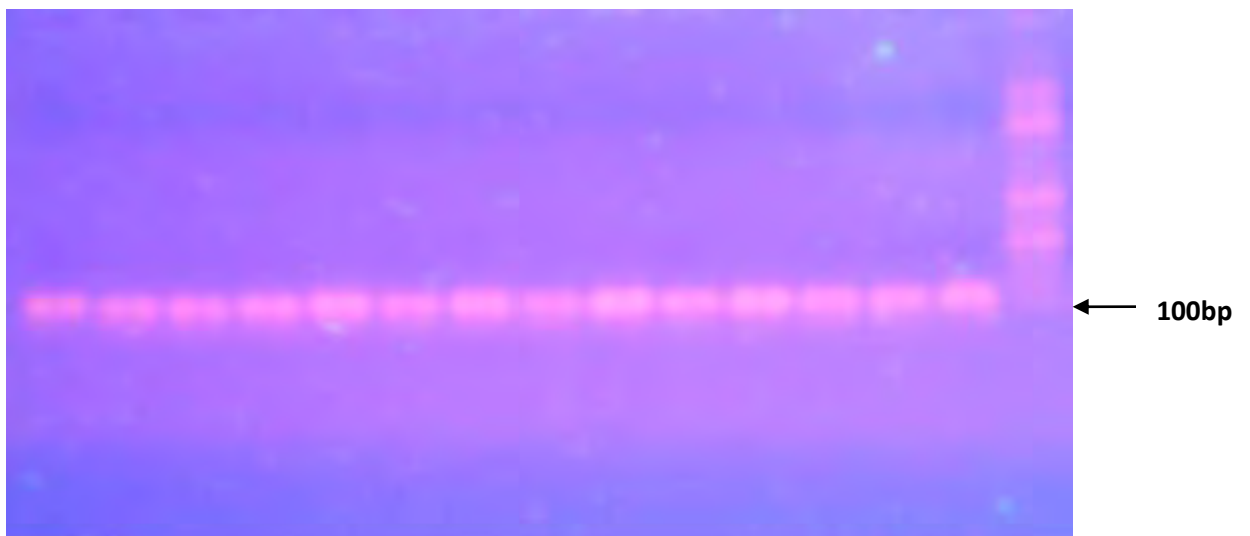
Με βάση την ακολουθία του εξονίου 6 του γονιδίου της *ace* σχεδιάστηκαν οι εκκινητές: D6F-5' TATTATACACACCGCTGGGTTGGTAATCCG 3' και D6R- 5' ATATTTATAAGGGCAGGTGAAGAAITGACCGC 3'. Μια ινοσίνη έχει εισαχθεί στη θέση 8 του εκκινητή D6R για την αντιμετώπιση του πολυμορφισμού (C/T) που υπάρχει σε αυτή τη θέση στους φυσικούς πληθυσμούς παγκοσμίως. Τα υπογραμμισμένα νουκλεοτίδια αντιστοιχούν σε ουρές που έχουν προστεθεί για να αυξηθεί το μέγεθος των προϊόντων της PCR και για να διευκολύνουν την ανίχνευση των τμημάτων χαμηλού μοριακού βάρους που παράγονται από την πέψη που ακολουθεί την αντίδραση PCR. Ο αντίστροφος εκκινητής έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να εισάγει μια βάση (το νουκλεοτίδιο C με έντονους και πλάγιους χαρακτήρες αντικαθιστά το

νουκλεοτίδιο T) στο προϊόν της PCR των 90bp. Εξαιτίας αυτής της υποκατάστασης, δημιουργείται μια περιοχή αναγνώρισης του ενζύμου *Mbl* (5' GAGCGG 3') στο PCR ενισχυμένο ανθεκτικό αλληλόμορφο (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Στην εικόνα παρουσιάζεται τμήμα του εξονίου 6 της ακετυλοχολινεστεράσης από γονιδιωματικό DNA και από PCR ενισχυμένα προϊόντα, τόσο για το ανθεκτικό (R) όσο και για το ευαίσθητο (S) αλληλόμορφο. Η θέση της μετάλλαξης που σχετίζεται με την ανθεκτικότητα απεικονίζεται με έναν αστερίσκο. Η PCR έγινε με χρήση των εκκινητών D6-F και D6-R. Η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού επισημαίνεται με γκρι πλαίσιο.

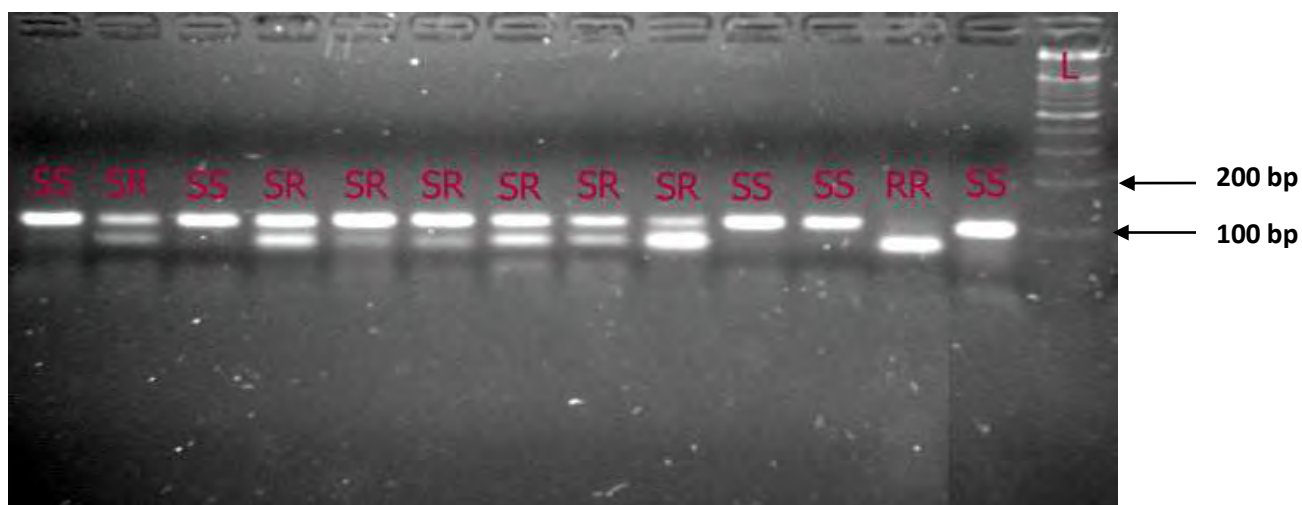
Από την PCR ενίσχυση του εξονίου 6 του γονιδίου *ace* με εκκινητές τους D6-F και D6-R, προκύπτουν προϊόντα των 100 bp. Έλεγχος των προϊόντων αυτών πραγματοποιείται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (εικόνα 18).



Εικόνα 18. Προϊόντα PCR ενίσχυσης τμήματος του εξονίου 6 του γονιδίου *ace* με τους εκκινητές D6-F και D6-R.

Η μετάλλαξη G488S βρίσκεται στη θέση αναγνώρισης του ενζύμου *Mbl* και η παρουσία της έχει σαν αποτέλεσμα την αναγνώριση και κοπή της

συγκεκριμένης αλληλουχίας από το ένζυμο αυτό. Η παρουσία των ανθεκτικών και των ευαίσθητων αλληλομόρφων του έκτου εξονίου, καθορίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (3,5%) του προϊόντος PCR που υπέστη πέψη με *Mbl*. Τα ευαίσθητα αλληλόμορφα εμφανίζουν το πλήρες μήκος του εξονίου εφόσον δεν υπάρχει θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού δίνοντας μια ηλεκτροφορητική ζώνη μεγέθους 100 bp. Τα ανθεκτικά αλληλόμορφα με πέψη από το ένζυμο περιορισμού δίνουν δύο ηλεκτροφορητικές ζώνες μια 69 bp και μια 31 bp (Εικόνα 19). Έτσι, καθίσταται δυνατός ο έλεγχος της παρουσίας της μετάλλαξης Gly488Ser στο γονίδιο *ace* του *B. oleae*.

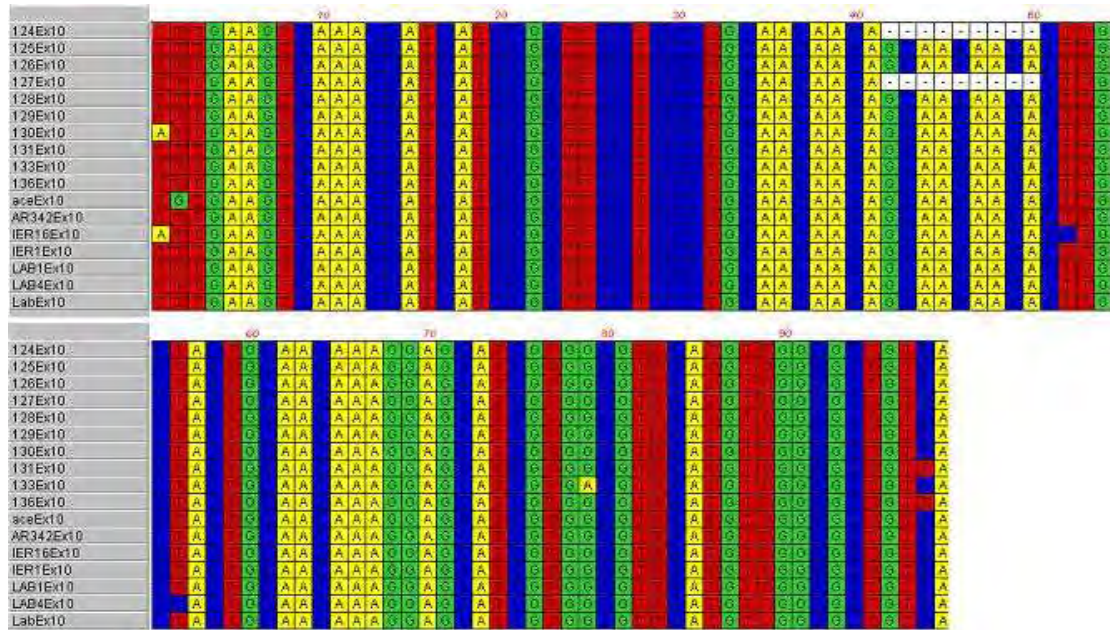


Εικόνα 19. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πέψεων των προϊόντων ενίσχυσης του έκτου εξονίου του γονιδίου της AChE του *B. oleae* με το ένζυμο *Mbl*. Οι ομοζυγώτες για το ευαίσθητο αλληλόμορφο συμβολίζονται με SS και παρουσιάζουν μια ηλεκτροφορητική ζώνη των 100bp, με RR συμβολίζεται ο ομοζυγώτης για το ανθεκτικό αλληλόμορφο που εμφανίζει δυο ζώνες 69 και 31bp και τέλος οι ετεροζυγώτες συμβολίζονται με SR και εμφανίζουν και τις τρεις ζώνες. Στην εικόνα φαίνεται και ο μάρτυρας μοριακού βάρους (L) και καταδεικνύεται η ζώνη των 100bp και η ζώνη των 200bp.

III.1.3. Έλεγχος παρουσίας της μετάλλαξης Δ3Q

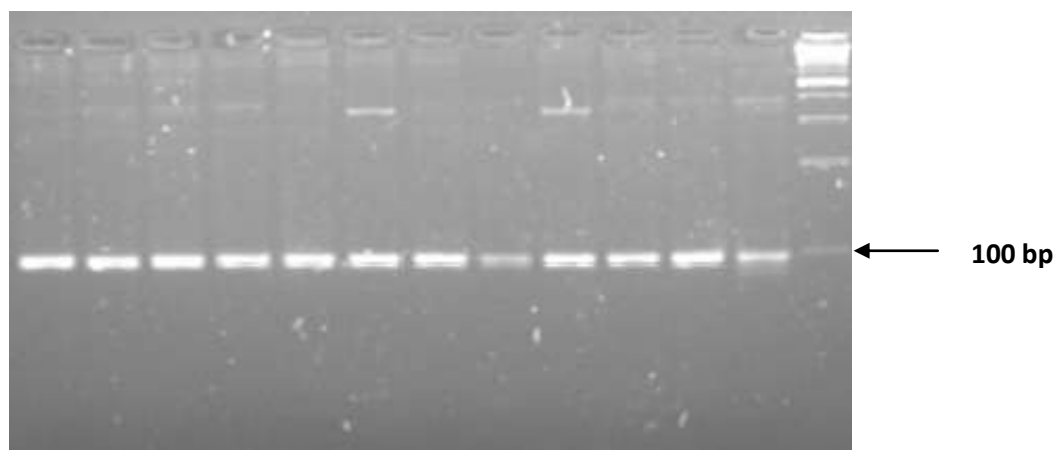
Η ανακάλυψη της μετάλλαξης Δ3Q του γονιδίου *ace* προέκυψε μετά από έρευνα για παράγοντες που πιθανώς να εμπλέκονται στη διακύμανση της ανθεκτικότητας που είχε παρατηρηθεί σε φυσικούς πληθυσμούς. Η μετάλλαξη Δ3Q του γονιδίου *ace* του δάκου της ελιάς αφορά μια μικρή έλλειψη στο καρβοξυτελικό άκρο της AChE και εδράζεται στο δέκατο εξόνιο (X). Η μετάλλαξη αυτή, η οποία βρίσκεται εκτός του καταλυτικού κέντρου της AChE, αφορά την έλλειψη τριών γλουταμινών στις θέσεις 642 έως 644 και επηρεάζει

την προσθήκη της GPI- άγκυρας στην ώριμη πρωτεΐνη (Kakani et al. 2008; 2011) (εικόνα 20).



Εικόνα 20. Απεικόνιση της αλληλουχίας του δέκατου εξονίου του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης σε διάφορα άτομα *B. oleae*. Στο πρώτο και στο τέταρτο δείγμα παρουσιάζεται η μετάλλαξη της έλλειψης εννέα νουκλεοτιδίων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την έλλειψη τριών αμινοξέων γλουταμίνης.

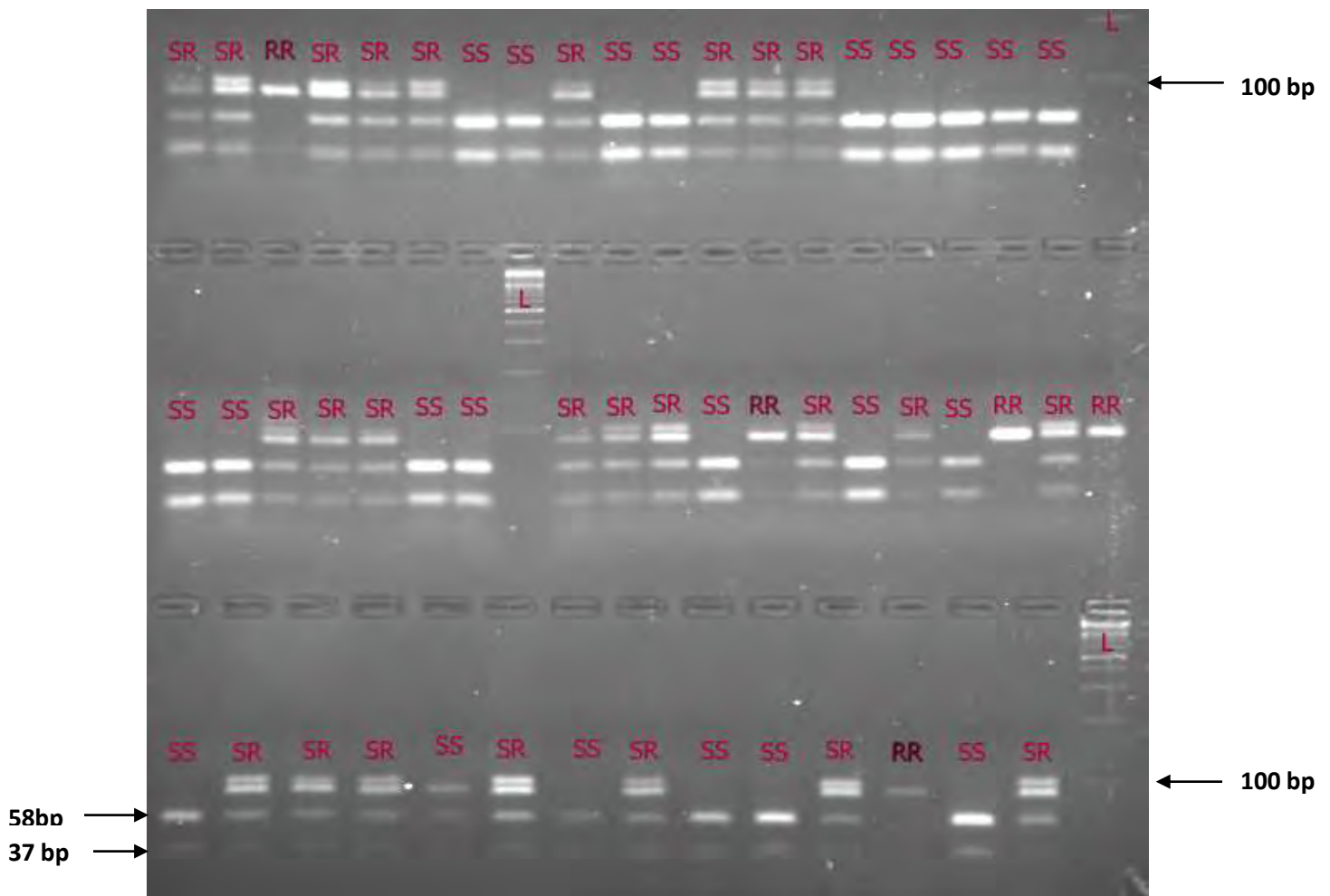
Η PCR ενίσχυση του δέκατου εξονίου του γονιδίου *ace* με εκκινητές τους Boace 10F και 10R παράγει προϊόντα των 96 bp. Αυτά έπειτα ελέγχονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1% (εικόνα 21).



Εικόνα 20. Προϊόντα PCR ενίσχυσης τμήματος του εξονίου 10 του γονιδίου *ace* με τους εκκινητές Boace 10F και 10R.

Η έλλειψη εννέα νουκλεοτιδίων στο εξόνιο 10 που οδηγεί στην έλλειψη τριών αμινοξέων γλουταμίνης, έχει ως αποτέλεσμα την καταστροφή της θέσης

αναγνώρισης του ένζυμου περιορισμού *MwoI*. Βάσει αυτού του γεγονότος μπορεί να ανιχνευθεί η μετάλλαξη με την εφαρμογή μιας PCR-RFLP δοκιμασίας. Με ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της πέψης του ενισχυμένου εξονίου 10 μετά από PCR, τα ανθεκτικά άτομα εμφανίζουν μια ζώνη ολόκληρου του προϊόντος της PCR των 96 ζευγών βάσεων, εφόσον έχει καταστραφεί η θέση αναγνώρισης του ενζύμου περιορισμού. Αντίθετα, τα ευαίσθητα άτομα που δεν φέρουν τη μετάλλαξη εμφανίζουν δυο ζώνες των 58bp και των 37bp, επειδή το ένζυμο αναγνωρίζει μια θέση ώστε να δράσει.



Εικόνα 22. Αποτελέσματα ηλεκτροφόρησης πέψεων των προϊόντων ενίσχυσης του δέκατου εξονίου του γονιδίου της *ace* με το ένζυμο *MwoI*. (SS: ομοζυγώτες για το ευαίσθητο αλληλόμορφο, RR: ομοζυγώτες για το ανθεκτικό αλληλόμορφο, SR: ετεροζυγώτες, L: μάρτυρας μοριακού βάρους).

III.2. Πληθυσμιακή ανάλυση

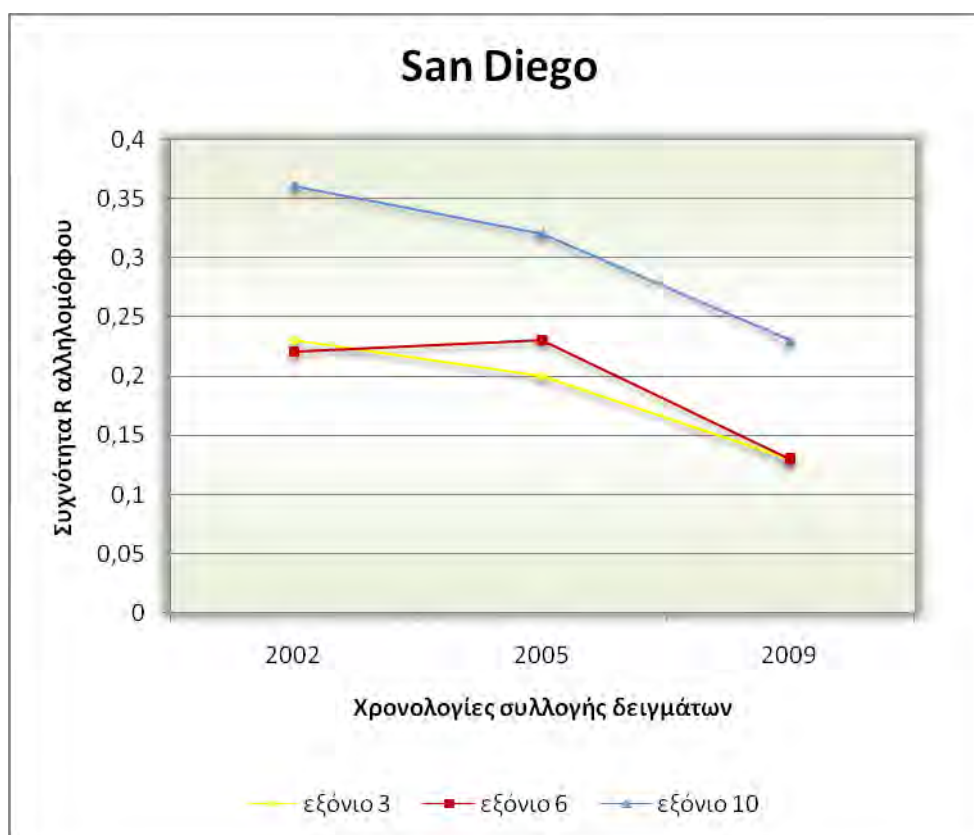
III.2.1. Έλεγχος συχνότητας ανθεκτικών αλληλομόρφων στους πληθυσμούς

Οι PCR-RFLP αναλύσεις που διεξήχθησαν κατέστησαν δυνατή την ταυτοποίηση των γενοτύπων των δειγμάτων, οι οποίοι φαίνονται στον Πίνακα 6. Στον πίνακα παρουσιάζονται αναλυτικά οι συχνότητες των αλληλομόρφων S και R στο σύνολο των ατόμων του πειράματος, όπως επίσης και σε ποσοστό επί τοις εκατό.

Πίνακας 6. Συχνότητες αλληλομόρφων των δειγμάτων από διαφορετικές περιοχές και σε διαφορετικές χρονολογίες.

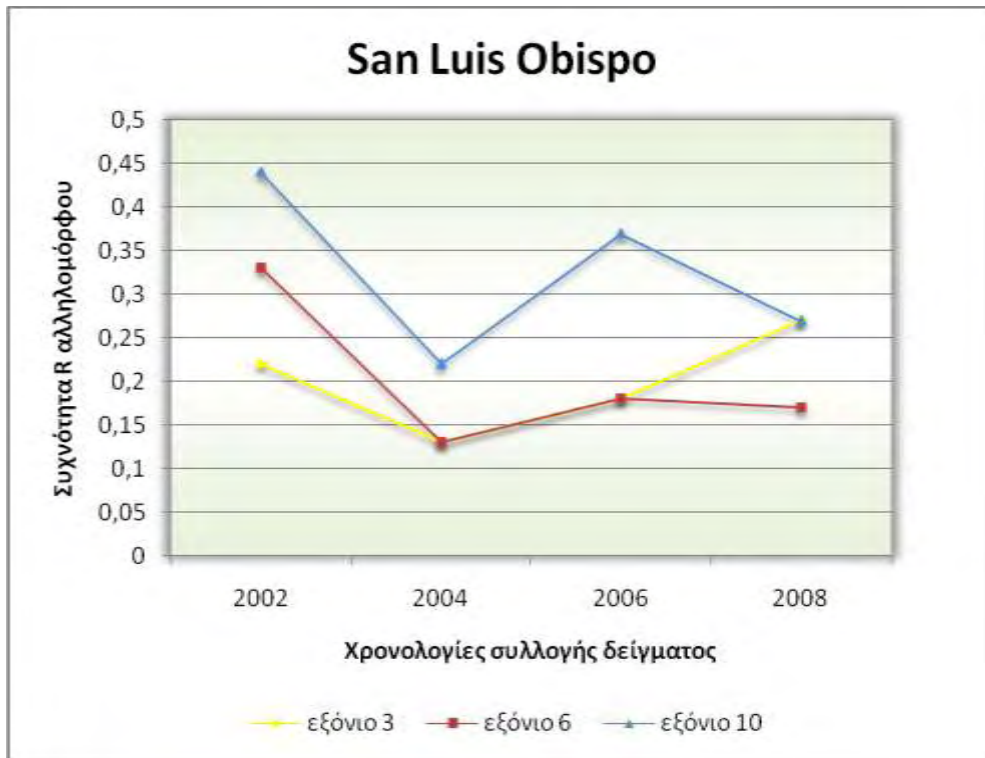
| Περιοχή | Αριθμός ατόμων | Εξόνιο 3 | | Εξόνιο 6 | | Εξόνιο 10 | |
|-----------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | Συχνότητα S αλληλομόρφου | Συχνότητα R αλληλομόρφου | Συχνότητα S αλληλομόρφου | Συχνότητα R αλληλομόρφου | Συχνότητα S αλληλομόρφου | Συχνότητα R αλληλομόρφου |
| San Diego 2002 | 32 | 49 (77%) | 15 (23%) | 50 (78%) | 14 (22%) | 41 (64%) | 23 (36%) |
| San Diego 2005 | 30 | 48 (80%) | 12 (20%) | 4 (77%) | 14 (23%) | 42 (70%) | 19 (32%) |
| San Diego 2009 | 30 | 52 (87%) | 8 (13%) | 52 (87%) | 8 (13%) | 46 (77%) | 14 (23%) |
| San Luis Obispo 2002 | 18 | 28 (78%) | 8 (22%) | 24 (67%) | 12 (33%) | 20 (56%) | 16 (44%) |
| San Luis Obispo 2004 | 30 | 52 (87%) | 8 (13%) | 52 (87%) | 8 (13%) | 45 / 58 (78%) | 13 / 58 (22%) |
| San Luis Obispo 2006 | 30 | 50 (83%) | 10 (17%) | 49 (82%) | 11 (18%) | 38 (63%) | 22 (37%) |
| San Luis Obispo 2008 | 26 | 38 (73%) | 14 (27%) | 43 (83%) | 9 (17%) | 38 (73%) | 14 (27%) |
| Napa 2004 | 27 | 38 (70%) | 16 (30%) | 45 (83%) | 9 (17%) | 33 (61%) | 22 (41%) |
| Napa 2008 | 30 | 53 (88%) | 7 (12%) | 51 / 58 (84%) | 9 / 58 (16%) | 45 / 58 (74%) | 15 / 58 (26%) |

Από τα αποτελέσματα του παραπάνω πίνακα σχεδιάστηκαν τα επόμενα διαγράμματα για την πορεία της απώλειας του R αλληλομόρφου των τριών μεταλλάξεων για κάθε περιοχή στην πορεία του χρόνου.



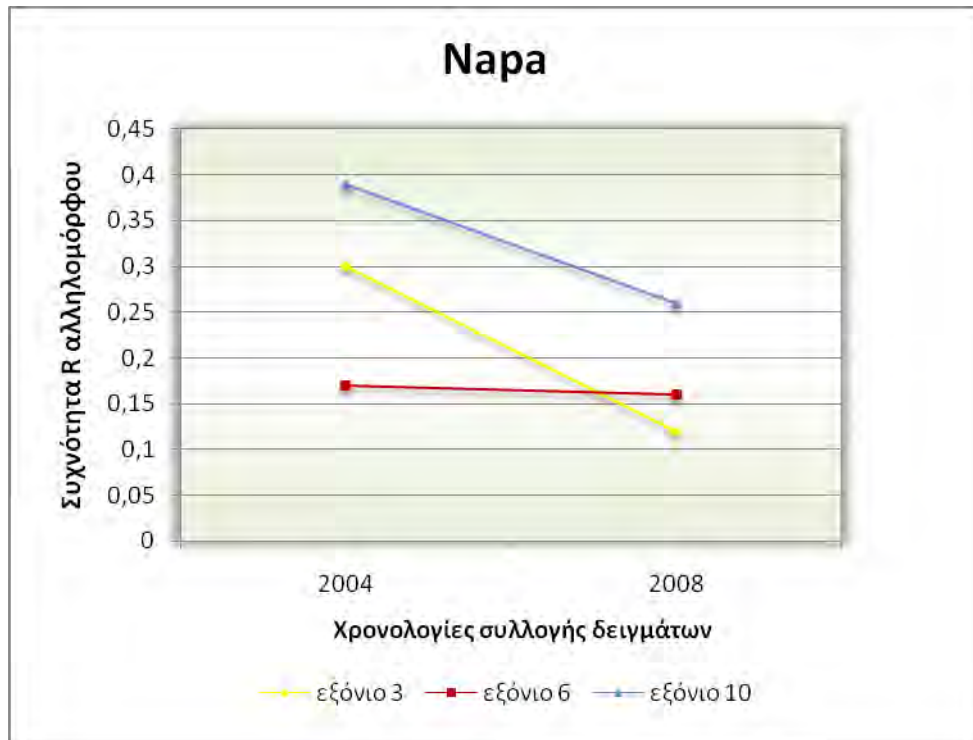
Εικόνα 23. Διάγραμμα της συχνότητας του ανθεκτικού αλληλομόρφου σε διαδοχικές χρονιές για την περιοχή San Diego για τα εξόνια 3, 6 και 10.

Στην εικόνα 23 παρουσιάζονται με τη μορφή διαγράμματος οι συχνότητες των αλληλομόρφων των τριών μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα εξόνια 3, 6 και 10 δειγμάτων που συλλέχθηκαν σε διαδοχικές χρονικές περιόδους στην περιοχή San Diego της Καλιφόρνια. Όσον αφορά το εξόνιο 10, παρατηρείται δραστική μείωση της συχνότητας του ανθεκτικού αλληλομόρφου με την πάροδο του χρόνου. Η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου της μετάλλαξης του τρίτου εξονίου επίσης μειώνεται, αλλά αυτή η μείωση είναι σχετικά μικρή. Η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου της μετάλλαξης στο εξόνιο 6 φαίνεται να έχει μικρή άνοδο τη χρονιά 2005 σε σύγκριση με το 2002, από 22% σε 23% ενώ τη χρονιά 2009 μειώνεται.



Εικόνα 24. Διάγραμμα της συχνότητας του ανθεκτικού αλληλομόρφου σε διαδοχικές χρονιές για την περιοχή San Luis Obispo για τα εξόνια 3, 6 και 10.

Στην εικόνα 24 απεικονίζεται το διάγραμμα με τις συχνότητες των αλληλομόρφων των τριών μεταλλάξεων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα εξόνια 3, 6 και 10, δειγμάτων που συλλέχθηκαν σε διαδοχικές χρονικές περιόδους στην περιοχή San Luis Obispo της Καλιφόρνια. Η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου για τη μετάλλαξη του εξονίου 10, το διάστημα 2002-2004 εμφανίζει δριμεία μείωση, ενώ αντίθετα αυξάνεται μέχρι το 2006. Από τη χρονιά 2006 έως τη χρονιά 2008 παρατηρείται ακόμη μια φορά μείωση της συχνότητας του αλληλομόρφου. Η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου της μετάλλαξης του τρίτου εξονίου μειώνεται από το 2002 έως το 2004 ενώ από το 2004-2006 παρατηρείται αύξηση από 13% σε 17% και περαιτέρω αύξηση παρατηρείται τη χρονιά 2008. Η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου της μετάλλαξης του έκτου εξονίου φαίνεται να έχει κάθοδο τη χρονιά 2004 σε σύγκριση με το 2002, ενώ παρατηρείται αύξηση από 13% σε 18% τις χρονιές 2004 και 2006 αντίστοιχα. Τη χρονιά 2008 σημειώνεται ελάχιστη μείωση της συχνότητας του ανθεκτικού αλληλομόρφου από 18% σε 17%.



Εικόνα 25. Διάγραμμα της συχνότητας του ανθεκτικού αλληλομόρφου σε διαδοχικές χρονιές για την περιοχή Napa για τα εξόνια 3, 6 και 10.

Στην εικόνα 25 απεικονίζεται το διάγραμμα των συχνοτήτων του ανθεκτικού αλληλομόρφου των τριών μεταλλάξεων στα εξόνια 3, 6 και 10 σε δείγματα που συλλέχθηκαν τις χρονιές 2004 και 2009 στην περιοχή Napa της Καλιφόρνια. Παρατηρείται σημαντική μείωση της συχνότητας του ανθεκτικού αλληλομόρφου της μετάλλαξης του εξονίου 10 της τάξης του 13%. Η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου της μετάλλαξης του τρίτου εξονίου παρουσιάζει δραστική μείωση μεταξύ των δυο ετών, που ανέρχεται στο 18%. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί όμως ότι η μετάλλαξη Δ30 είχε αρχικά, το 2004, συχνότητα 39% ενώ η συχνότητα της I214V ήταν 30%. Η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου της μετάλλαξης του έκτου εξονίου φαίνεται να έχει ελάχιστη μείωση (1%) από 17% σε 16%.

III.2.2. Ανάλυση ρυθμού απώλειας των ανθεκτικών αλληλομόρφων

Προκειμένου να υπολογιστεί το κόστος που επέρχεται με την απομάκρυνση μιας επιλεκτικής πηγής, συγκεκριμένα μιας πηγής που επιλέγει θετικά την ανθεκτικότητα, όπως τα OPs που συνεισφέρουν στην επιλογή ανθεκτικών ατόμων *B. oleae*, πρέπει να υπολογιστεί ο ρυθμός της απαλοιφής του πλέον επιβλαβούς αλληλομόρφου που επηρεάζεται από το συντελεστή

επιλογής s . Ο συντελεστής επιλογής s είναι εναλλακτικός όρος για το φαινόμενο της αρμοστικότητας, ο οποίος δείχνει κατά πόσο η επιλογή είναι ενάντια σε ένα συγκεκριμένο αλληλόμορφο. Η τιμή 1 υποδηλώνει μέγιστη αρνητική επιλογή ($w=0$) και κανένα άτομο του πληθυσμού δεν επιβιώνει για να αναπαραχθεί. Στο άλλο άκρο, όταν το s πάρει την τιμή 0 αυτό σημαίνει ότι δεν υπάρχει αρνητική επιλογή σε σχέση με τα αρμοστικότερα άτομα ($w=1.0$, όπου w : αρμοστικότητα). Οπότε υπολογίζοντας το συντελεστή επιλογής προσδιορίζεται η αριθμητική έκφραση της δύναμης που απομακρύνει τα ανθεκτικά αλληλόμορφα του πληθυσμού.

Εφόσον είναι γνωστός ο αριθμός των αλληλομόρφων R και S στον πληθυσμό του San Diego, μπορεί να υπολογιστεί ο ρυθμός της απώλειας των ανθεκτικών αλληλομόρφων του εξονίου 10 καθώς και ο συντελεστής επιλογής για το χρονικό διάστημα μεταξύ 2002-2005. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 7.

Πίνακας 7. Δεδομένα και υπολογισμός αρμοστικότητας και συντελεστή επιλογής για το ανθεκτικό αλληλόμορφο του εξονίου 10 στους φυσικούς πληθυσμούς της περιοχής San Diego μεταξύ των ετών 2002 και 2005.

| San Diego | Ανθεκτικό αλληλόμορφο R | Ευαίσθητο αλληλόμορφο S | Σύνολο |
|--|-------------------------|-------------------------|--------|
| Αριθμός αλληλομόρφων 2002 | 24 | 40 | 64 |
| Αριθμός αλληλομόρφων 2005 | 19 | 41 | 60 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2002 | $24/64 = 0.38 (=p)$ | $40/64 = 0.62 (=q)$ | 1.0 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2005 | $18/60 = 0.32(=p')$ | $41/60 = 0.68(=q')$ | 1.0 |
| Σχετική επιβίωση | $0.32/0.38 = 0.84$ | $0.68/0.62 = 1.10$ | |
| Μέση αρμοστικότητα \bar{W} | $0.84/1.10 = 0.76$ | $1.10/1.10 = 1.0$ | |
| Συντελεστής επιλογής s | $1-0.76 = 0.24$ | $1-1 = 0$ | |

Ο ρυθμός της απώλειας των R αλληλομόρφων δίνεται από τον τύπο: $\Delta p = p' - p$, οπότε ο ρυθμός της απώλειας για το χρονικό διάστημα 2002-2005 στους πληθυσμούς του San Diego είναι $\Delta p = 0.32 - 0.38 = -0.06$ με συντελεστή επιλογής $s = 1 - \bar{W} = 0.24$. Η αρμοστικότητα των R αλληλομόρφων καθορίζεται σε σχέση με την επιβίωση των ατόμων που φέρουν το επιβλαβές

αλληλόμορφο, ενώ η αρμοστικότητα του S καθορίζεται ως 1, εξ' ορισμού, αφού είναι το αρμοστικότερο.

Για την ίδια περιοχή κατά το διάστημα 2005-2009 ο υπολογισμός του ρυθμού της απώλειας των ανθεκτικών αλληλομόρφων του εξονίου 10 καθώς και ο συντελεστής επιλογής, πραγματοποιείται με τρόπο όμοιο με τον παραπάνω. Τα αποτελέσματα βρίσκονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Δεδομένα και υπολογισμός αρμοστικότητας και συντελεστή επιλογής για το ανθεκτικό αλληλόμορφο του εξονίου 10 στους φυσικούς πληθυσμούς της περιοχής San Diego μεταξύ των ετών 2005 και 2009.

| San Diego | Ανθεκτικό αλληλόμορφο R | Ευαίσθητο αλληλόμορφο S | Σύνολο |
|--|-------------------------|-------------------------|--------|
| Αριθμός αλληλομόρφων 2005 | 19 | 41 | 60 |
| Αριθμός αλληλομόρφων 2009 | 14 | 46 | 60 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2005 | $19/60 = 0.32 (=p)$ | $41/60 = 0.68 (=q)$ | 1.0 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2009 | $14/60 = 0.23 (=p')$ | $46/60 = 0.77 (=q')$ | 1.0 |
| Σχετική επιβίωση | $0.23/0.32 = 0.77$ | $0.77/0.68 = 1.13$ | |
| Μέση αρμοστικότητα \bar{W} | $0.77/1.13 = 0.72$ | $1.13/1.13 = 1.0$ | |
| Συντελεστής επιλογής s | $1-0.72 = 0.28$ | $1-1 = 0$ | |

Ο ρυθμός της απώλειας των R αλληλομόρφων δίνεται από τον τύπο: $\Delta p = p' - p$, οπότε ο ρυθμός της απώλειας για το χρονικό διάστημα 2005-2009 στους πληθυσμούς του San Diego είναι $\Delta p = 0.23 - 0.32 = -0.09$ με συντελεστή επιλογής $s = 1 - \bar{W} = 0.28$.

Τέλος, για την περιοχή του San Diego ελέγχουμε το ρυθμό απώλειας των ανθεκτικών αλληλομόρφων του δέκατου εξονίου συνολικά για το διάστημα 2002-2009. Επίσης υπολογίζεται και ο συντελεστής επιλογής. Τα αποτελέσματα βρίσκονται στον πίνακα 9.

Πίνακας 9. Δεδομένα και υπολογισμός αρμοστικότητας και συντελεστή επιλογής για το ανθεκτικό αλληλόμορφο του εξονίου 10 στους φυσικούς πληθυσμούς της περιοχής San Diego συνολικά για τα έτη από 2002 έως 2009.

| San Diego | Ανθεκτικό αλληλόμορφο R | Ευαίσθητο αλληλόμορφο S | Σύνολο |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| Αριθμός αλληλομόρφων 2002 | 24 | 40 | 64 |
| Αριθμός αλληλομόρφων 2009 | 14 | 46 | 60 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2002 | $24/64 = 0.38 (=p)$ | $40/64 = 0.62 (=q)$ | 1.0 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2009 | $14/60 = 0.23 (=p')$ | $46/60 = 0.77 (=q')$ | 1.0 |
| Σχετική επιβίωση | $0.23/0.38 = 0.61$ | $0.77/0.62 = 1.24$ | |
| Μέση αρμοστικότητα \bar{W} | $0.61/1.24 = 0.49$ | $1.24/1.24 = 1.0$ | |
| Συντελεστής επιλογής s | $1-0.49 = 0.51$ | $1-1 = 0$ | |

Ο ρυθμός της απώλειας των R αλληλομόρφων δίνεται από τον τύπο: $\Delta p = p' - p$, οπότε ο συνολικός ρυθμός της απώλειας για το χρονικό διάστημα 2002-2009 στους πληθυσμούς του San Diego είναι $\Delta p = 0.23 - 0.38 = -0.15$ με συντελεστή επιλογής $s = 1 - \bar{W} = 0.51$.

Για την περιοχή του San Luis Obispo πραγματοποιείται έλεγχος του ρυθμού απώλειας του ανθεκτικού αλληλομόρφου για το διάστημα 2002-2004 τα δεδομένα και τα αποτελέσματα των υπολογισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10. Δεδομένα και υπολογισμός αρμοστικότητας και συντελεστή επιλογής για το ανθεκτικό αλληλόμορφο του εξονίου 10 στους φυσικούς πληθυσμούς της περιοχής San Luis Obispo μεταξύ των ετών 2002 και 2004.

| San Luis Obispo | Ανθεκτικό αλληλόμορφο R | Ευαίσθητο αλληλόμορφο S | Σύνολο |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| Αριθμός αλληλομόρφων 2002 | 16 | 20 | 36 |
| Αριθμός αλληλομόρφων 2004 | 13 | 47 | 60 |

| | | | |
|--|-------------------|-------------------|-----|
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2002 | 16/36= 0.44 (=p) | 20/36= 0.56 (=q) | 1.0 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2004 | 13/60= 0.22 (=p') | 47/60= 0.78 (=q') | 1.0 |
| Σχετική επιβίωση | 0.22/0.44= 0.5 | 0.78/0.56= 1.4 | |
| Μέση αρμοστικότητα \bar{W} | 0.5/1.4= 0.36 | 1.4/1.4= 1.0 | |
| Συντελεστής επιλογής s | 1-0.36= 0.64 | 1-1= 0 | |

Ο ρυθμός της απώλειας των R αλληλομόρφων που δίνεται από τον τύπο: $\Delta p = p' - p$, υπολογίζεται να είναι για το χρονικό διάστημα 2002-2005 στους πληθυσμούς του San Luis Obispo: $\Delta p = 0.22 - 0.44 = -0.22$ με συντελεστή επιλογής $s = 1 - \bar{W} = 0.64$.

Για την περιοχή του San Luis Obispo την περίοδο 2002-2004 τα δεδομένα και τα αποτελέσματα των υπολογισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11. Δεδομένα και υπολογισμός αρμοστικότητας και συντελεστή επιλογής για το ανθεκτικό αλληλόμορφο του εξονίου 10 στους φυσικούς πληθυσμούς της περιοχής San Luis Obispo μεταξύ την περίοδο 2004 και 2006

| San Luis Obispo | Ανθεκτικό αλληλόμορφο R | Ευαίσθητο αλληλόμορφο S | Σύνολο |
|--|--------------------------------|--------------------------------|---------------|
| Αριθμός αλληλομόρφων 2004 | 13 | 45 | 58 |
| Αριθμός αλληλομόρφων 2006 | 22 | 38 | 60 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2004 | 13/58= 0.22 (=p) | 45/58= 0.76 (=q) | 1.0 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2006 | 22/60= 0.37 (=p') | 38/60= 0.63 (=q') | 1.0 |
| Σχετική επιβίωση | 0.37/0.22= 1.68 | 0.63/0.76= 0.83 | |
| Μέση αρμοστικότητα \bar{W} | 1.68/1.68= 1.0 | 0.83/1.4= 0.6 | |
| Συντελεστής επιλογής s | 1-1= 0 | 1-0.6= 0.4 | |

Από την εξίσωση $\Delta p = p' - p$ προκύπτει ότι $\Delta p = 0.37 - 0.22 = 0.15 > 0$, οπότε το ανθεκτικό αλληλόμορφο δεν χάνεται, αντίθετα αυξάνεται σε συχνότητα στον

πληθυσμό. Επίσης $s=0$, εφόσον προσφέρει περισσότερη αρμοστικότητα, έτσι δεν επιλέγεται αρνητικά.

Για το διάστημα 2006-2008 των δειγμάτων του San Luis Obispo όσον αφορά το R αλληλόμορφο με τη μετάλλαξη $\Delta 3Q$, τα δεδομένα και τα αποτελέσματα των υπολογισμών παρουσιάζονται στον πίνακα 12.

Πίνακας 12. Δεδομένα και υπολογισμός αρμοστικότητας και συντελεστή επιλογής για το ανθεκτικό αλληλόμορφο του εξονίου 10 στους φυσικούς πληθυσμούς της περιοχής San Luis Obispo μεταξύ των ετών 2006 και 2008.

| San Luis Obispo | Ανθεκτικό αλληλόμορφο R | Ευαίσθητο αλληλόμορφο S | Σύνολο |
|--|-------------------------|-------------------------|--------|
| Αριθμός αλληλομόρφων 2006 | 22 | 38 | 60 |
| Αριθμός αλληλομόρφων 2008 | 14 | 38 | 52 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2006 | $22/60 = 0.37 (=p)$ | $38/60 = 0.63 (=q)$ | 1.0 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2008 | $14/52 = 0.27 (=p')$ | $38/52 = 0.73 (=q')$ | 1.0 |
| Σχετική επιβίωση | $0.27/0.37 = 0.73$ | $0.73/0.63 = 1.16$ | |
| Μέση αρμοστικότητα \bar{W} | $0.73/1.16 = 0.63$ | $1.16/1.16 = 1.0$ | |
| Συντελεστής επιλογής s | $1-0.63 = 0.37$ | $1-1 = 0$ | |

Ο ρυθμός της απώλειας των R αλληλομόρφων δίνεται από τον τύπο: $\Delta p = p' - p$, οπότε ο ρυθμός της απώλειας για το χρονικό διάστημα 2006-2008 στους πληθυσμούς του San Diego είναι $\Delta p = p' - p = 0.27 - 0.37 = -0.10$ με συντελεστή επιλογής $s = 1 - \bar{W} = 0.37$. Παρατηρούμε ότι ο ρυθμός της απώλειας του R αλληλομόρφου των πληθυσμών του San Luis Obispo για τη συγκεκριμένη περίοδο είναι αρκετά μεγαλύτερος από ότι ο ρυθμός απώλειας στην περιοχή San Diego.

Τέλος, για την περιοχή του San Luis Obispo ελέγχουμε τον ρυθμό απώλειας των ανθεκτικών αλληλομόρφων του δέκατου εξονίου συνολικά για το διάστημα 2002 έως και 2008, καθώς υπολογίζεται και ο συντελεστής επιλογής. Τα αποτελέσματα βρίσκονται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13. Δεδομένα και υπολογισμός αρμοστικότητας και συντελεστή επιλογής για το ανθεκτικό αλληλόμορφο του εξονίου 10 στους φυσικούς πληθυσμούς της περιοχής San Luis Obispo συνολικά για τα έτη από 2002 έως 2008.

| San Luis Obispo | Ανθεκτικό αλληλόμορφο R | Ευαίσθητο αλληλόμορφο S | Σύνολο |
|------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| Αριθμός αλληλομόρφων 2002 | 16 | 20 | 36 |
| Αριθμός αλληλομόρφων 2008 | 14 | 38 | 52 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2002 | $16/36 = 0.39 (=p)$ | $20/36 = 0.56 (=q)$ | 1.0 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2008 | $14/52 = 0.27 (=p')$ | $38/52 = 0.73 (=q')$ | 1.0 |
| Σχετική επιβίωση | $0.27/0.39 = 0.69$ | $0.73/0.56 = 1.30$ | |
| Μέση αρμοστικότητα \bar{W} | $0.69/1.30 = 0.53$ | $1.30/1.30 = 1.0$ | |
| Συντελεστής επιλογής s | $1-0.53 = 0.47$ | $1.0-1.0 = 0$ | |

Ο ρυθμός της απώλειας των R αλληλομόρφων δίνεται από τον τύπο: $\Delta p = p' - p$, οπότε ο συνολικός ρυθμός της απώλειας για το χρονικό διάστημα 2002-2008 στους πληθυσμούς του San Luis Obispo είναι $\Delta p = 0.27 - 0.39 = -0.12$ με συντελεστή επιλογής $s = 1 - \bar{W} = 0.47$.

Για τον πληθυσμό της περιοχής Napa, υπολογίζεται ο ρυθμός της απώλειας των R αλληλομόρφων με τη μετάλλαξη $\Delta 3Q$ καθώς και ο συντελεστής επιλογής για το χρονικό διάστημα μεταξύ 2004-2008. Τα αποτελέσματα φαίνονται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14. Δεδομένα και υπολογισμός αρμοστικότητας και συντελεστή επιλογής για το ανθεκτικό αλληλόμορφο του εξονίου 10 στους φυσικούς πληθυσμούς της περιοχής San Luis Obispo μεταξύ των ετών 2004 και 2008.

| Napa | Ανθεκτικό αλληλόμορφο R | Ευαίσθητο αλληλόμορφο S | Σύνολο |
|---------------------------|-------------------------|-------------------------|--------|
| Αριθμός αλληλομόρφων 2004 | 22 | 32 | 54 |
| Αριθμός αλληλομόρφων 2008 | 15 | 43 | 58 |

| | | | |
|--|----------------------|----------------------|-----|
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2004 | $22/54 = 0.41 (=p)$ | $32/54 = 0.59 (=q)$ | 1.0 |
| Συχνότητα αλληλομόρφων 2008 | $15/58 = 0.26 (=p')$ | $43/58 = 0.74 (=q')$ | 1.0 |
| Σχετική επιβίωση | $0.26 / 0.39 = 0.63$ | $0.74 / 0.59 = 1.25$ | |
| Μέση αρμοστικότητα \bar{W} | $0.67 / 1.25 = 0.54$ | $1.25 / 1.25 = 1.0$ | |
| Συντελεστής επιλογής s | $1 - 0.54 = 0.46$ | $1.0 - 1.0 = 0$ | |

Ο ρυθμός της απώλειας των R αλληλομόρφων για το χρονικό διάστημα 2004-2008 στους πληθυσμούς της περιοχής Napa είναι $\Delta p = p' - p = 0.26 - 0.39 = -0.13$ με συντελεστή επιλογής $s = 1 - \bar{W} = 0.46$.

IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η εξέλιξη της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα προσφέρει μερικά από τα πιο εντυπωσιακά παραδείγματα δαρβινικής εξέλιξης που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια του προσδόκιμου μιας ανθρώπινης ζωής. Ο προσδιορισμός των γονιδίων ανθεκτικότητας δημιουργεί ένα εξαιρετικό πλαίσιο για τη μελέτη της εξέλιξης των προσαρμοστικών μεταλλάξεων από την εφαρμογή των εντομοκτόνων. Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας γίνεται προσπάθεια να καταδειχθεί ότι γονίδια ανθεκτικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως δείκτες για την ανάλυση των εξελικτικών διαδικασιών των πληθυσμών σε μικρο-εξελικτική κλίμακα (Lenormand, 1999). Συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε ανάλυση σε διαδοχικές γενιές των συχνότητων των τριών μεταλλάξεων του γενετικού τόπου της ακετυλοχολινεστεράσης *ace* του δάκου που από προηγούμενες έρευνες έχει αποδειχθεί ότι σχετίζονται με την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (Vontas et al., 2002; Kakani et al., 2008; 2011). Επειδή η εξελικτική θεωρία προβλέπει ότι οι μεταλλάξεις σημαντικών φαινοτυπικών επιδράσεων, όπως μεταλλάξεις ανθεκτικότητας, είναι πιθανόν να φέρουν κάποιο κόστος στους κατόχους τους σε περιβάλλοντα όπου δεν επιλέγονται (Berticat, 2008), μελετήθηκαν πληθυσμοί από την Καλιφόρνια όπου ο έλεγχος του δάκου δεν πραγματοποιείται με οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έτσι ώστε να μελετηθεί η προσαρμογή των φυσικών αυτών πληθυσμών του εντόμου στην περιοχή και να διερευνηθεί εάν υπάρχει το αντίστοιχο γενετικό κόστος για κάθε μετάλλαξη που προσδίδει ανθεκτικότητα.

Από τα αποτελέσματα των μοριακών δοκιμών βασισμένων στις αλληλομορφικές συχνότητες, που διεξήχθησαν βρέθηκε ότι η συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου (R) της μετάλλαξης Δ3Q στο εξόνιο 10 μειώνεται στο πέρασμα του χρόνου. Οι υπολογισμοί που πραγματοποιήθηκαν για την παραπάνω διαπίστωση, ήταν: 1) ο προσδιορισμός του ρυθμού με τον οποίο απαλείφεται το R αλληλόμορφο χρησιμοποιώντας τον τύπο: $\Delta p = p' - p$ και 2) ο καθορισμός της δύναμης με την οποία η επιλογή απομακρύνει τα ανθεκτικά αλληλόμορφα του πληθυσμού, με τον υπολογισμό του συντελεστή s .

Η μετάλλαξη Δ3Q που αφορά σε έλλειψη 3 γλουταμινών εκτός του καταλυτικού κέντρου της ακετυλοχολινεστεράσης βελτιώνει την προσθήκη της της GPI-άγκυρας στην ώριμη πρωτεΐνη με αποτέλεσμα περισσότερα μόρια να εντοπίζονται στη συναπτική σχισμή (Kakani et al., 2008; 2011). Η πιθανότερη εξήγηση που συνδέει τη μετάλλαξη Δ3Q με την ανθεκτικότητα είναι ότι παρουσία εντομοκτόνων παρόλο που αναστέλλεται η φυσιολογική λειτουργία ενός αριθμού μορίων του ενζύμου, (λόγω της βελτιωμένης GPI αγκυροβόλησης) παραμένουν και μόρια ελεύθερα τα οποία μπορούν να

υδρολύουν κανονικά την ακετυλοχολίνη. Το γενετικό κόστος που φαίνεται να παρουσιάζει η μετάλλαξη Δ3Q ίσως να είναι απότοκος του αυξημένου αριθμού μορίων ακετυλοχολινεστεράσης, τα οποία ενώ παρουσία του εντομοκτόνου βοηθούν στην αποκατάσταση της υδρολυτικής ικανότητας του ενζύμου ώστε το έντομο να επιβιώνει, σε περιβάλλοντα ελεύθερα από εντομοκτόνα η αυξημένη συγκέντρωση του ενζύμου στη χολινεργική σύναψη, υδρολύοντας όλο και περισσότερα μόρια ακετυλοχολίνης, επηρεάζει τη μεταβίβαση του σήματος (Kakani & Mathiopoulos, 2008; Kakani et al., 2008;2011). Πειραματικές μελέτες υπέδειξαν ότι η χρόνια υπερέκφραση της ακετυλοχολινεστεράσης μπορεί να επάγει ανωμαλίες την νευρομυϊκής φυσιολογίας, όπως η συγγενής μυασθένεια, η Νωτιαία Μυϊκή Ατροφία (SMA) και η Αμυοτροφική Πλάγια Σκλήρυνση (ALS) (Farchi, 2002).

Ωστόσο, στις γενοτυπικές αναλύσεις των δειγμάτων από τις περιοχές της Καλιφόρνια παρατηρήθηκε απροσδόκητα μεγάλη συχνότητα του ανθεκτικού αλληλομόρφου. Η παρατήρηση αυτή αντιτίθεται με τα αποτελέσματα μελετών που πραγματοποιήθηκαν σε δείγματα ευρωπαϊκών χωρών, κατά τις οποίες τα αλληλόμορφα που προσδίδουν ανθεκτικότητα με μεταλλάξεις του δέκατου εξονίου εμφανίζουν χαμηλή συχνότητα στους φυσικούς πληθυσμούς. Η μεγάλη αυτή συχνότητα των ανθεκτικών αλληλομόρφων στους φυσικούς πληθυσμούς της Αμερικανικής ηπείρου ενδεχομένως να οφείλεται στο φαινόμενο της «αρχής του ιδρυτή», μια ειδική κατηγορία της γενετικής παρέκκλισης. Κατά την «αρχή του ιδρυτή» μια μικρή ομάδα αποσπάται- συνήθως γεωγραφικά- από ένα μεγάλο πληθυσμό και δημιουργεί ένα καινούριο, με αποτέλεσμα να μη εκπροσωπούνται τα αλληλόμορφα του νέου πληθυσμού με τις ίδιες συχνότητες όπως στον αρχικό πληθυσμό.

Οι αντίστοιχες μοριακές αναλύσεις για τα εξόνια 3 και 6 του γονιδίου της ακετυλοχολινεστεράσης του δάκου, έδειξαν μικρή μείωση στις συχνότητες του ανθεκτικού αλληλομόρφου των μεταλλάξεων I214V, για το εξόνιο 3, και G488S, για το εξόνιο 6. Οι δυο αυτές μεταλλάξεις, που εντοπίζονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, είναι γνωστό ότι προσδίδουν ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, ωστόσο οι διακυμάνσεις των συχνοτήτων των αλληλομόρφων υποδεικνύουν ότι οι συγκεκριμένες μεταλλάξεις έχουν μικρή επίδραση στη φυσιολογική λειτουργία της ακετυλοχολινεστεράσης, οπότε δεν επιφέρουν σημαντικό γενετικό κόστος με αποτέλεσμα τη διατήρησή τους στους φυσικούς πληθυσμούς. Τα αποτελέσματά μας συνάδουν με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών, κατά τα οποία καταδεικνύεται ότι δεν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της συχνότητας των μεταλλάξεων I214V και G488S και τα υψηλά επίπεδα ανθεκτικότητας (Skouras et al., 2007; Kakani et al., 2008). Δηλαδή, οι δυο μεταλλάξεις I214V και G488S ενώ είναι απαραίτητες για

την ανάπτυξη της ανθεκτικότητας, δεν είναι αυτές που προκαλούν την αύξηση της ανθεκτικότητας σε υψηλά επίπεδα. Επομένως, οι μεταλλάξεις αυτές δεν φέρουν υψηλό γενετικό κόστος και έτσι δεν παρατηρείται σημαντική απώλεια των ανθεκτικών τους αλληλομόρφων. Η συχνότητα των μεταλλαγμένων αλληλομόρφων που προσδίδουν ανθεκτικότητα αναμένεται να ελαττώνεται δραστικά σε διαδοχικές γενιές του *B. oleae* που βρίσκονται σε περιβάλλον χωρίς εντομοκτόνα, όπως συμβαίνει με τη μετάλλαξη Δ3Q. Ωστόσο, τα ανθεκτικά αλληλόμορφα των μεταλλάξεων I214V και G488S δεν εξαφανίζονται ολοκληρωτικά, συνεχίζουν να υπάρχουν έστω και σε μικρές συχνότητες στο περιβάλλον με έλλειψη OP εντομοκτόνων, λόγω του ότι προκαλούν μικρή αλλαγή στην πρωτεΐνη. Γεγονός που έρχεται σε συμφωνία με τον ισχυρισμό των Shi et al. (2004) ότι οι μεταλλάξεις που έχουν τη λιγότερο δραστική επιρροή στη σταθερότητα και δραστηριότητα της πρωτεΐνης, ενώ παράλληλα προσδίδουν ανθεκτικότητα με το μικρότερο κόστος, έχουν την ικανότητα να διατηρούνται κατά την έλλειψη επιλογής από εντομοκτόνα.

Εντούτοις, μια μη αναμενόμενη αύξηση της συχνότητας των ανθεκτικών αλληλομόρφων με μεταλλάξεις στα εξόνια 3 και 6 σημειώθηκε στην περιοχή του San Luis Obispo. Η αλλαγή των αλληλομορφικών συχνοτήτων δεν είναι δυνατόν να προέρχονται από επιλεκτικές πιέσεις, αφού στην ευρύτερη περιοχή της Καλιφόρνια απουσιάζουν τα εντομοκτόνα. Άλλοι παράγοντες που μεταβάλλουν τη γενετική δομή εκτός της φυσικής επιλογής είναι νέες μεταλλάξεις, γενετική απόκλιση, μη τυχαίο ζευγάρωμα ή μεταναστεύσεις που προκαλούν γονιδιακή ροή. Πράγματι, μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, παρουσίασαν ενδείξεις για μια δεύτερη εισβολή του δάκου στην αμερικανική ήπειρο όσον αφορά τα δείγματα της περιοχής του San Luis Obispo. Ενδέχεται, λοιπόν, η αύξηση της συχνότητας των αλληλομόρφων των δειγμάτων αυτής της περιοχής να είναι απόρροια μιας δεύτερης εισβολής του *B. oleae*, με συνέπεια την εισαγωγή νέων αλληλομόρφων στη γονιδιακή δεξαμενή.

Μια επιπλέον παρατήρηση που προκύπτει από τη γενοτυπική ανάλυση των δειγμάτων είναι ότι κάθε ομοζυγώτης για το ανθεκτικό αλληλόμορφο RR της μετάλλαξης Δ3Q στο εξόνιο 10, εμφανίζει πάντα ομοζυγωτία ως προς τα ευαίσθητα αλληλόμορφα SS των μεταλλάξεων I214V και G488S στα εξόνια 3 και 6, αντίστοιχα. Το γεγονός αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι η μετάλλαξη αυτή σχετίζεται με υψηλό γενετικό κόστος και δεν μπορεί να συνυπάρξει με περισσότερες μεταλλάξεις στο ίδιο γονίδιο που θα είχαν ως αποτέλεσμα την προσαύξηση του ήδη υψηλού γενετικού κόστους. Ενώ, όταν ένα άτομο είναι ετερόζυγο ως προς το ανθεκτικό αλληλόμορφο (SR) του

εξονίου 10 παρατηρείται, όχι πάντα, αλλά σε μερικές περιπτώσεις ετεροζυγωτία και στα εξόνια 3 και 6 ως προς το ανθεκτικό αλληλόμορφο (SR).

Γενικά, γενετικές αλλαγές που επάγουν την προσαρμογή των οργανισμών σε νέα περιβάλλοντα ενδέχεται να επιφέρουν ένα κόστος αρμοστικότητας όταν αυτοί βρεθούν σε περιβάλλοντα χωρίς άσκηση επιλεκτικής πίεσης. Παρά το γεγονός ότι η πρόβλεψη αυτή έχει επαληθευτεί σε συνθήκες εργαστηρίου, λίγες μελέτες έχουν προσπαθήσει να τεκμηριώσουν αυτό το κόστος άμεσα σε φυσικούς πληθυσμούς. Μια ανάλογη μελέτη με την παρούσα, πραγματοποιήθηκε για την αξιολόγηση των πλειοτροπικών επιπτώσεων της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα σε υποθετικούς παράγοντες της αρμοστικότητας στο κουνούπι *Culex pipiens* (Bourguet et al., 2004). Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με διαφορετικές προνυμφικές πυκνότητες κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού σε δύο φυσικές περιοχές αναπαραγωγής. Εξετάστηκαν δύο γενετικοί τόποι που φέρουν αλληλόμορφα ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα: ο γενετικός τόπος *ace-1* που κωδικοποιεί μια ακετυλοχολινεστεράση και ο *Ester*, ένας γενετικός τόπος που περιλαμβάνει δυο στενά συνδεδεμένα γονίδια που κωδικοποιούν τις υπεροικογένειες εστερασών A και B. Ανθεκτικά *ace-1* αλληλόμορφα που κωδικοποιούν μια τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση συσχετίστηκαν με μεγαλύτερο αναπτυξιακό διάστημα και μικρότερο μήκος φτερών. Οι πλειοτροπικές επιδράσεις των δύο αλληλομόρφων ανθεκτικότητας *Ester1* και *Ester4* τα οποία κωδικοποιούν τις εστεράσες A1 και A4-B4, αντίστοιχα, εμφάνισαν μεγαλύτερη ποικιλομορφία. Τόσο οι A1 όσο και οι A4-B4 εστεράσες μείωσαν το μήκος των φτερών, αν και μόνο η A1 συνδέθηκε με το μεγαλύτερο προνυμφικό στάδιο. Δεν παρουσιάστηκε διακύμανση της ασυμμετρίας των φτερών ως απόκριση στην παρουσία ή στην αλληλεπίδραση των γονιδίων ανθεκτικότητας στους δύο τόπους σε οποιοδήποτε επίπεδο πυκνότητας δοκιμάστηκε. Αντίθετα, το μήκος των φτερών μειώθηκε όταν η πυκνότητα των προνυμφών αυξήθηκε. Αυτό μπορεί να είναι η συνέπεια μιας επιλογής εναντίον των αναπτυξιακά σταθερών ατόμων (Bourguet et al., 2004).

Συμπερασματικά, η παρακολούθηση της προσαρμογής και η εκτίμηση της επίδρασης επιλεκτικών πιέσεων στα αλληλόμορφα που προσδίδουν ανθεκτικότητα είναι χρήσιμη, αφού με αυτό τον τρόπο είναι πιθανό να προβλεφθούν οι αλλαγές των αλληλομορφικών συχνοτήτων στις μελλοντικές γενιές δίνοντας έδαφος για μελέτες τρόπων ελαχιστοποίησης της ανάπτυξης ανθεκτικότητας. Οι μελέτες τέτοιου είδους λοιπόν βοηθούν στην ανακάλυψη αποτελεσματικότερων μεθόδων αντιμετώπισης από αυτές που υπάρχουν σήμερα. Οι μελέτες με βάση την ανθεκτικότητα επίσης παρέχουν ένα πολύ

χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη της προσαρμογής του ευκαρυωτικού γονιδιώματος σε νέα περιβάλλοντα.

V. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, M., Shrivastava, N., & Pahd, H. (2008). Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep* , 27, σσ. 617-631.
- Agnew, P., Berticat, C., Bedomme, S., Sidobre, C., & Michalakis, Y. (2004). Parasitism increases and decreases of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution* , 58 (3), σσ. 579-586.
- Andrews, C. A. (2010). Natural Selection, Genetic Drift, and Gene Flow do not act in isolation in Natural Populations. *Nature Education Knowledge* , 1 (10), σ. 5.
- Berhan, A. M., Hulbert, S. H., Butler, L. G., & Bennetzen, J. L. (1993). Structure and evolution of the genomes of Sorghum bicolor and Zea mays. *Theor. Appl. Gent.* , 86, σσ. 598-604.
- Berticat, C., Bonnet, J., Duchon, S., Agnew, P., Weill, M., & Corbel, V. (2008). Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for Culex quinquefasciatus mosquitoes. *BMC Evolutionary Biology* , 8, σ. 104.
- Bishop, J. A., & Cook, L. M. (1981). *Genetic consequences of man-made change*. London: Academic Press.
- Bloch, K. D., & Grossmann, B. (2001). Digestion of DNA with restriction endonucleases. Στο K. D. Bloch, *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Bock, W. (1980). the definition and recognition of biological adaptation. *Amer.Zool.* , 20, σσ. 217-227.
- Bourguet, D., Guillemaud, T., Chevillon, C., & Raymond, M. (2004). Fitness cost of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito Culex pipiens. *Evolution* , 58 (1), σσ. 128-135.
- Bourguet, D., Guillemaud, T., Chevillon, C., & Raymond, M. (2004). Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito Culex pipiens. *Evolution* , 58 (1), σσ. 128–135.
- Brown, A. R., Hosken, D. J., Balloux, F., Bickley, L. K., LePage, G., Owen, S. F., και συν. (2009). Genetic variation, inbreeding and chemical exposure- combined effects in wildlife and critical considerations for ecotoxicology. *Phil.Trans.R.Soc.B* .
- Carriere, Y., Deland, J. P., Roff, A., & Vincent, C. (1994). Life-history costs associated with the evolution of insecticide resistance. *Proc.R.Soc.Lond.B.* , 258, σσ. 35-40.

- Clarke, C. A., Dickson, C. G., & Sheppard, P. M. (1963). Larval color pattern in *Papilio demodocus*. *Evolution*, *17*, pp. 130-137.
- Cooper, G. M. (2000). *The cell: A molecular approach* (2nd edition ed.). Sinauer Associates Inc.
- Coustau, C., Chevillon, C., & French-Constant, R. (2000). Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends Ecol. Evol.*, *15* (9), pp. 378-383.
- Duran, C., Appleby, N., Edwards, D., & Batley, J. (2009). Molecular Genetic Markers: Discovery, Applications, Data Storage and Visualization. *Current Bioinformatics*, *4*, pp. 16-27.
- Dzerzhinskii, F. Y. (2010). Recognition of adaptiveness and reconstruction of the adaptation process. *Biology Bulletin*, *37* (2), pp. 155-163.
- Elena, S. F., Cooper, V. S., & Lenski, R. E. (1996). Punctuated evolution caused by the selection of rare beneficial mutations. *Science*, *272*, σσ. 1802-1804.
- Farchi, N., Sorec, H., & Hochner, B. (2003, January 1). Chronic acetylcholinesterase overexpression induces multilevelled aberrations in mouse neuromuscular physiology. *The Journal of Physiology*, *546*, σσ. 165-173.
- Futuyma, D. (1995). *Εξελικτική Βιολογία* (δεύτερη έκδοση εκδ.). Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης.
- Gazave, E., Chevillon, C., Lenormand, T., Marquine, M., & Raymond, M. (2001). Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito *Culex pipiens*. *Heredity*, *87*, σσ. 441-448.
- Gelehrter, D. T., Collins, F. S., & Ginsburg, D. (2003). *Αρχές Ιατρικής Γενετικής* (2η Ελληνική Έκδοση εκδ.). Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη.
- Griffiths, A. J., Miller, J. H., & Suzuki, D. T. (2000). *An introduction to genetic analysis* (7th edition ed.). New York: W.H. Freeman.
- Guillemaud, T., Lenormand, T., Bourguet, D., Chevillon, C., Pasteur, N., & Raymond, M. (1998). Evolution of resistance in *Culex pipiens*: Allele replacement and changing environment. *Evolution*, *52*, σσ. 443-453.
- Hancock, A. M., & DiRenzo, A. (2008). Detecting the genetic signature of natural selection in human populations: models, methods, and data. *Annual Review of Anthropology*, *37*, σσ. 197-217.
- Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1989). *Principles of population genetics* (2nd edition εκδ.). Sinauer Associates Inc.

- Hastings, I. M., & Donnelly, M. J. (2005). The impact of antimalarian drug resistance mutations on parasite fitness and its implications for the evolution of resistance. *Elsevier* , 8 (1), pp. 43-50.
- Hedrick, P. W. (2000). *Genetics of populations* (2nd edition εκδ.). Jones and Bartlett Publishers.
- Johnson, T. (1999). Beneficial mutations, hitchhiking and the evolution of mutation rates in sexual populations. *Genetics* , 151, σσ. 1621-1631.
- Joost, S., Bonin, A., Bruford, M. W., Despres, L., Conord, C., Erhart, G., et al. (2007). A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation. *Molecular Ecology* , 16 (18), pp. 3955-3969.
- Joshi, S. P., Ranjekar, P. K., & Gupta, V. S. (1999). Molecular markers in plant genome analysis. *Curr. Sci.* , 77, σσ. 230- 240.
- Kakani, E. G., & Mathiopoulos, K. D. (2008). Organophosphate resistance-related mutations in the acetylcholinesterase gene of Terphidae. *J. Appl. Entomol.* , 132, σσ. 762-771.
- Kakani, E. G., Bon, S., Massoulié, J., & Mathiopoulos, K. D. (2011, (2011)). Altered GPI modification of insect AChE improves tolerance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , 41 , σσ. 150-158.
- Kakani, E. G., Ioannides, I. M., Margaritopoulos, J. T., Seraphides, N. A., Skouras, P. J., Tsitsipis, J. A., και συν. (2008). A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of organophosphate resistance. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* , 38, σσ. 781-787.
- Karasov, T., Philipp, W. M., & Dmitri, A. P. (2010). Evidence that adaptation in *Drosophila* is Not Limited by Mutation at single sites. 6 (6).
- Kettlewell, H. B. (1955). Selection experiments on industrial melanism in the Lepidoptera. *Heredity* , 9, pp. 323–342.
- Lahti, D. C., Johnsons, N. A., Ajie, B. C., Otto, S. P., Hendry, A. P., Blumstein, D. T., και συν. (2009). Relaxed selection in the wild. *Trends in Ecology and Evolution* , 24 (9), σσ. 487- 496.
- Lang, G. I., Murray, A. W., & Botstein, D. (2009). The cost of gene expression underlies a fitness tradeoff in yeast. *PNAS* , 106 (14), σσ. 5755-5760.
- Lees, D. R. (1981). Industrial melanism: genetic adaptation of animals to air pollution. *Journal of Animal Ecology* , 44, σσ. 67-83.

- Lees, S. V., & Bahaman, A. R. (2010). Modified gel preparation for distinct DNA fragment analysis in agarose gel electrophoresis. *Tropical Biomedicine* , 27 (2), σσ. 351-354.
- Lenormand, T., Bourguet, D., Guillemaud, T., & Raymond, M. (1999). Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature* , 400 (26), pp. 861-864.
- Lenski, R. E. (1998). Bacterial evolution and the cost of antibiotic resistance. *Intrnatl. Microbiol.* , 1, σσ. 265-270.
- Luikart, G., England, P. R., Tallmon, D., Jordan, S., & Taberlet, P. (2003). The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* , 4, pp. 981-994.
- Moore, J. *From Genesis to Genetics- The case of evolution and creationism*. University of California Press.
- Morin, P. A., Luikart, G., & Wayne, R. K. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in ecology and evolution* , 19 (4), pp. 208-216.
- Mullis, K., Faloona, F., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Laboratory Symp Quant Biol.* , 51, σσ. 263-273.
- Piepho, H.-P., & Koch, G. (2000). Codominant Analysis of Banding Data from a Dominant Marker System By Normal Mixtures. *Genetics Society of America* , 155, σσ. 1459-1468.
- Raymond, B., Sayyed, A. H., & Wright, D. J. (2005). Genes and environment interact to determine the fitness costs of resistance to *Bacillus thurigiensis*. *ProcRsocB* , 272 (1571), σσ. 1519-1524.
- Reeve, H. K., & Sherman, P. W. (1993, March). Adaptation and the goals evolutionary research. *The quarterly review of biology* , 68 (1), σσ. 1-32.
- Rosenberg, A., & Arp, R. (2009). *Philosophy of Biology: an anthology*. Willey-Blackwell.
- Schrag, S. J., Perrot, V., & Levin, B. R. (1997). Adaptation to the fitness cost of antibiotic resistance in *E.coli*. *Proc.R.Soc.Lond.B* , 264, pp. 1287-1291.
- Shi, M. A., Lougarre, A., Alies, C., Frémaux, I., Tang, Z. H., Stojan, J., και ουν. (2004). Acetylcholinesterase alterations reveal the fitness cost of mutations conferring insecticide resistance. *BMC Evolutionary Biology* , 4.

- Spooner, D., van Treuren, R., & de Vicente, M. C. (2005). Molecular markers for genebank management. *IPGRI Technical Bulletin* (10).
- Travisano, M., Mongold, J. A., Bennett, A. F., & Lenski, R. E. (1995, Jan 6). Experimental tests of the role of adaptation, chance and history of evolution. *Science, New Series* , 267 (5194), pp. 87-90.
- Vontas, J. G., Hejazi, M. J., Hawkes, N. J., Cosmidis, N., Loukas, M., & Hemingway, J. (2002). Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* , 11 (4), pp. 329-336.
- Vontas, J. K., Hejazi, M. J., Hawkes, N. J., Cosmidis, N., Loukas, M., & Hemingway, J. (2002). Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* , 11 (4), σ. 329.
- Vuylsteke, M., Peleman, J. D., & Eijk, M. J. (2007). AFLP technology for DNA fingerprinting. *Nature Protocols* , 2, pp. 1387-1398.
- Wells, J. (1999). Second Thoughts about Peppered Moths- This classical story of evolution by natural selection needs revising. *The Scientist* , 13 (11), σ. 13.
- Williams, G. (1966). *Adaptation and natural selection*. New Jersey: Princeton University Press.
- Williams, J. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., & Tingey, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic makers. *Nucleic acid research* , 18 (22), σσ. 6531-6535.

VI. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Μέσω των PCR-RFLP αναλύσεων που διεξήχθησαν, ταυτοποιήθηκαν οι γονότυποι των δειγμάτων που συλλέχθηκαν για το πείραμά μας.

- Για την περιοχή San Diego, ελέγχθηκαν δείγματα τριών διαφορετικών χρονολογιών (2002, 2005, 2009) για τα εξόνια 3, 6 και 10 με αποτέλεσμα του γενότυπους των παρακάτω

| | Αριθμός δειγμάτων | Εξόνιο 3 | Εξόνιο 6 | Εξόνιο 10 |
|------|-------------------|----------|----------|-----------|
| 2002 | San Diego 1 | SR (ss) | SR | SS |
| | San Diego 2 | SS | SS | SS |
| | San Diego 3 | SR | SR | SS |
| | San Diego 4 | SS | SS | SR |
| | San Diego 5 | SS | SS | SS |
| | San Diego 6 | SS | SR | SR |
| | San Diego 7 | SS | SS | SR |
| | San Diego 8 | SR | SR | SR |
| | San Diego 9 | SR | SR | SS |
| | San Diego 10 | SS | SS | RR |
| | San Diego 11 | SR | SR | SR |
| | San Diego 12 | SR | SR | SR |
| | San Diego 13 | SR | SR | SS |
| | San Diego 14 | SR | SR | SR |
| | San Diego 15 | SR | SR | SR |
| | San Diego 16 | SR | SR | SS |
| | San Diego 17 | SS | SS | SS |
| | San Diego 18 | SS | SS | SR |
| | San Diego 19 | SS | SS | SS |
| | San Diego 20 | SS | SS | SR |
| | San Diego 21 | SR | SR | SR |
| | San Diego 22 | SS | SS | SR |
| | San Diego 23 | SR (ss) | SS | SR |
| | San Diego 24 | SS | SS | SR |
| | San Diego 25 | SS | SS | SR |
| | San Diego 26 | SR | SR | SR |
| | San Diego 27 | SS | SS | SR |
| | San Diego 28 | SR | SR | SR |
| | San Diego 29 | SS | SS | SR |
| | San Diego 30 | SS | SS | SR |
| | San Diego 31 | SR | SS | SR |
| | San Diego 32 | SS | SS | SS |

| | | | | |
|------|-------------|---------|----|----|
| 2005 | San Diego 1 | SS | SS | SR |
| | San Diego 2 | SR (rr) | SR | SR |
| | San Diego 3 | SS | SS | SR |
| | San Diego 4 | SS | SS | SR |

| | | | | |
|------|--------------|----|----|----|
| 2005 | San Diego 5 | SS | SS | SS |
| | San Diego 6 | SS | SR | SR |
| | San Diego 7 | SS | SS | SR |
| | San Diego 8 | SS | SS | SR |
| | San Diego 9 | SS | SS | RR |
| | San Diego 10 | SR | SR | SR |
| | San Diego 11 | SS | SS | SS |
| | San Diego 12 | SR | SR | SR |
| | San Diego 13 | SR | SR | SS |
| | San Diego 14 | SR | RR | SS |
| | San Diego 15 | SS | SS | SR |
| | San Diego 16 | SS | SS | SS |
| | San Diego 17 | SR | SR | SS |
| | San Diego 18 | SS | SS | SR |
| | San Diego 19 | SS | SS | RR |
| | San Diego 20 | SS | SS | SS |
| | San Diego 21 | SS | SS | SS |
| | San Diego 22 | SR | SR | SR |
| | San Diego 23 | SR | SR | SR |
| | San Diego 24 | SS | SR | SR |
| | San Diego 25 | SS | SS | SS |
| | San Diego 26 | SR | SS | SS |
| | San Diego 27 | SS | SS | SS |
| | San Diego 28 | SR | SR | SS |
| | San Diego 29 | SR | SR | SR |
| | San Diego 30 | SR | SR | SS |

| | | | | |
|------|--------------|----|---------|----|
| 2009 | San Diego 1 | SS | SS | SR |
| | San Diego 2 | SS | SS | SS |
| | San Diego 3 | SS | SS | SR |
| | San Diego 4 | SS | SS | SS |
| | San Diego 5 | SR | SR | SS |
| | San Diego 6 | SS | SS | SR |
| | San Diego 7 | SS | SS | SR |
| | San Diego 8 | SS | SS | SR |
| | San Diego 9 | SS | SS | SR |
| | San Diego 10 | SS | SS | SR |
| | San Diego 11 | SS | SS | SS |
| | San Diego 12 | SS | SS | SR |
| | San Diego 13 | SR | SR | SS |
| | San Diego 14 | SR | SR | SS |
| | San Diego 15 | SS | SR | SS |
| | San Diego 16 | SS | SS | SS |
| | San Diego 17 | SS | SS | SS |
| | San Diego 18 | SR | SS (sr) | SR |
| | San Diego 19 | SS | SS | SS |
| | San Diego 20 | SS | SS | SS |
| | San Diego 21 | SS | SS | SR |
| | San Diego 22 | SS | SS | SS |
| | San Diego 23 | SS | SS | SR |
| | San Diego 24 | SS | SS | SR |

| | | | | |
|------|--------------|----|----|----|
| 2009 | San Diego 25 | SR | SR | SS |
| | San Diego 26 | SR | SR | SS |
| | San Diego 27 | SS | SS | SR |
| | San Diego 28 | SS | SS | SR |
| | San Diego 29 | SR | SR | SS |
| | San Diego 30 | SR | SR | SS |

- Για την περιοχή San Luis Obispo, ελέγχθηκαν δείγματα τριών διαφορετικών χρονολογιών (2004, 2006, 2008) για τα εξόνια 3, 6 και 10.

| | Αριθμός δειγμάτων | Εξόνιο 3 | Εξόνιο 6 | Εξόνιο 10 |
|------|-------------------|----------|----------|-----------|
| 2004 | San Luis Obispo 1 | SR | SR | SS |
| | SLO 2 | SS | SS | SR |
| | SLO 3 | SS | SS | SS |
| | SLO 4 | SS | SS | SS |
| | SLO 5 | SR | SR | SS |
| | SLO 6 | SS | SS | SS |
| | SLO 7 | SS | SS | SS |
| | SLO 8 | SR | SR | SR |
| | SLO 9 | SS | SS | SR |
| | SLO 10 | SS | SS | SR |
| | SLO 11 | SR (ss) | SR (ss) | SS |
| | SLO 12 | SS | SS | SR |
| | SLO 13 | SR (ss) | SR | - |
| | SLO 14 | SS | SS | SS |
| | SLO 15 | SS | SS | SS |
| | SLO 16 | SS | SS | SR |
| | SLO 17 | SS | SS | SS |
| | SLO 18 | SR | SR | SS |
| | SLO 19 | RR (sr) | RR | SS |
| | SLO 20 | SS | SS | SR |
| | SLO 21 | SS (sr) | SS | SR |
| | SLO 22 | SS (sr) | SS | SR |
| | SLO 23 | SS (sr) | SS | SS |
| | SLO 24 | SS (sr) | SS | SR |
| | SLO 25 | SS | SS | SS |
| | SLO 26 | SS | SS | SS |
| | SLO 27 | SS | SS | SR |
| | SLO 28 | SS | SS | SR |
| | SLO 29 | SS | SS | SS |
| | SLO 30 | SS | SS | SR |

| | | | | |
|------|-------------------|----|----|----|
| 2006 | San Luis Obispo 1 | SS | SS | SR |
| | SLO 2 | SR | SR | SS |
| | SLO 3 | SS | SS | SR |

| | | | | |
|------|--------|----|---------|----|
| 2006 | SLO 4 | SS | SS | SR |
| | SLO 5 | SR | SR | SS |
| | SLO 6 | SR | SR | SR |
| | SLO 7 | SS | SS | SR |
| | SLO 8 | SR | SR | SS |
| | SLO 9 | SR | SR | SS |
| | SLO 10 | SS | SR | SR |
| | SLO 11 | SS | SS | SS |
| | SLO 12 | SS | SS | SS |
| | SLO 13 | SS | SS | SR |
| | SLO 14 | SS | SS | SS |
| | SLO 15 | SS | SS (sr) | SS |
| | SLO 16 | SR | SR | SS |
| | SLO 17 | SR | SR | SS |
| | SLO 18 | SS | SS | SR |
| | SLO 19 | SS | SS | SR |
| | SLO 20 | SS | SS | SR |
| | SLO 21 | SS | SS | SR |
| | SLO 22 | SR | SR | SR |
| | SLO 23 | SS | SS | RR |
| | SLO 24 | SS | SS | SR |
| | SLO 25 | SS | SS | RR |
| | SLO 26 | SR | SR | SR |
| | SLO 27 | SR | SR | SS |
| | SLO 28 | SS | SS | RR |
| | SLO 29 | SS | SS | RR |
| | SLO 30 | SS | SS (sr) | SS |

| | | | | |
|------|-------------------|----|----|----|
| 2008 | San Luis Obispo 1 | SR | SS | SR |
| | SLO 2 | SR | SR | SR |
| | SLO 3 | SS | SS | RR |
| | SLO 4 | SS | SS | SR |
| | SLO 5 | SS | SS | SR |
| | SLO 6 | SS | SS | SR |
| | SLO 7 | SS | SS | SS |
| | SLO 8 | SR | SR | SS |
| | SLO 9 | SS | SS | SR |
| | SLO 10 | SR | SR | SS |
| | SLO 11 | SR | SR | SS |
| | SLO 12 | SR | SS | SR |
| | SLO 13 | SR | SR | SR |
| | SLO 14 | SS | SR | SR |
| | SLO 15 | SR | SS | SS |
| | SLO 16 | SR | SS | SS |
| | SLO 17 | SR | SR | SS |
| | SLO 18 | SR | SR | SS |
| | SLO 19 | SS | SS | SS |
| | SLO 20 | SS | SS | SS |
| | SLO 21 | SR | SS | SS |
| | SLO 22 | SS | SS | SR |

| | | | | |
|--|--------|---------|----|----|
| | SLO 23 | SS | SS | SR |
| | SLO 24 | SS | SS | SR |
| | SLO 25 | SR | SS | SS |
| | SLO 26 | SR (rr) | SR | SS |

- Για την περιοχή Napa, ελέγχθηκαν δείγματα δυο διαφορετικών χρονολογιών (2004, 2008) για τα εξόνια 3, 6 και 10.

| | Αριθμός δειγμάτων | Εξόνιο 3 | Εξόνιο 6 | Εξόνιο 10 |
|------|-------------------|----------|----------|-----------|
| 2004 | Napa 1 | SR | SR (ss) | SR |
| | Napa 2 | SR | SS | SR |
| | Napa 3 | SR | SS | SR |
| | Napa 4 | RR | SR | SS |
| | Napa 5 | SR | SS | RR |
| | Napa 6 | SR | SR | SR |
| | Napa 7 | SR | SS | SS |
| | Napa 8 | SS (sr) | SR | SR |
| | Napa 9 | SR | SS | SS |
| | Napa 10 | SS | SS | RR |
| | Napa 11 | SR | SS | SR |
| | Napa 12 | SR | SS | RR |
| | Napa 13 | SR | SR | SS |
| | Napa 14 | SR | SR | SR |
| | Napa 15 | SS | SS | SR |
| | Napa 16 | SR | SS | SR |
| | Napa 18 | SS | SS | SR |
| | Napa 19 | SS | SS | SR |
| | Napa 21 | SR | SR | SS |
| | Napa 22 | SR | SR | SR |
| | Napa 23 | SS | SS | SS |
| | Napa 24 | SS | SS | SS |
| | Napa 25 | SS | SS | SR |
| | Napa 26 | SS | SS | RR |
| | Napa 28 | SS | SS | SS |
| | Napa 29 | SS | SS | SR |
| | Napa 31 | SS | SR | SS |

| | | | | |
|------|---------|----|----|----|
| 2008 | Napa 1 | SS | SS | SR |
| | Napa 2 | SR | SR | SS |
| | Napa 3 | SS | SS | SR |
| | Napa 4 | SS | SS | SS |
| | Napa 5 | SS | - | - |
| | Napa 6 | SS | SS | SS |
| | Napa 7 | SS | SS | SR |
| | Napa 8 | SS | SR | SS |
| | Napa 9 | SR | SR | SR |
| | Napa 10 | SS | SR | SR |
| | Napa 11 | SS | SS | SR |
| | Napa 12 | SS | SS | SS |

| | | | | |
|---------|---------|----|----|----|
| 2008 | Napa 13 | SR | SR | SR |
| | Napa 14 | SS | SS | SR |
| | Napa 15 | SS | SS | SR |
| | Napa 16 | SS | SS | RR |
| | Napa 17 | SS | SS | SS |
| | Napa 18 | SS | SS | SS |
| | Napa 19 | SS | SS | SR |
| | Napa 20 | SR | SR | SS |
| | Napa 21 | SS | SS | SS |
| | Napa 22 | SS | SS | SS |
| | Napa 23 | SS | SS | SS |
| | Napa 24 | SR | SR | SR |
| | Napa 25 | SR | SR | SS |
| | Napa 26 | SS | SS | SR |
| | Napa 27 | SS | SS | SS |
| | Napa 28 | SS | SS | SS |
| | Napa 29 | SR | SR | SS |
| Napa 30 | SS | SS | SR | |