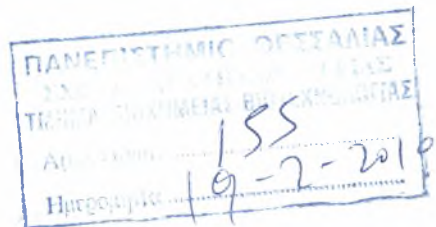


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ -ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



**Μελέτη της προσαρμογής φυσικών πληθυσμών
του δάκου της ελιάς (*Bactrocera oleae*) σε
εργαστηριακές συνθήκες**



Διπλωματική εργασία
Σεραφειμίδου-Πούλιου Ελένη

ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8163/1

Ημερ. Εισ.: 16-04-2010

Δωρεά:

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ

2010

ΣΕΡ

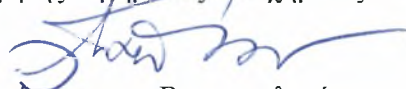
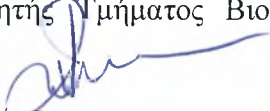

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087102

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Κυτταρικής Βιολογίας του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα καθηγητή τον κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο.

Μέλη τριμελούς επιτροπής

- Ματθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. 
- Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. 
- Αυγουστίνος Αντώνης, Διδάσκων ΠΔ407 Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. 

Ευχαριστώ,

Όλους όσους με εμπιστεύτηκαν για την ανάθεση της παρούσας εργασίας. Ευχαριστώ τον κύριο Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο για το πρωτότυπο του θέματος, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την διεκπεραίωση των πειραμάτων, όπως επίσης για την πληθώρα γνώσεων που μου προσέφερε και για τις πολύτιμες συμβουλές που ήταν καθοριστικές για την επίτευξη του στόχου μας. Επίσης οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στον κύριο Αυγουστίνο Αντώνη και στο Ζυγουρίδη Νίκο για την πολύτιμη βοήθεια τους και την καθοδήγηση τους, στους διδακτορικούς και προπτυχιακούς φοιτητές για το ευχάριστο κλίμα συνεργασίας που δημιουργήθηκε στο εργαστήριο. Τέλος ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου και στους φίλους μου που με στήριξαν και με υποστηρίζουν.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1 Η οικονομική σημασία της ελαιοκαλλιέργειας.....	7
1.2 Ο δάκος της ελιάς, <i>Bactrocera oleae</i>	8
1.2.1 Βιολογικός κύκλος.....	9
1.2.2 Καταστροφικές συνέπειες του δάκου.....	10
1.2.3 Καταπολέμηση του δάκου.....	11
1.2.4 Μαζική εκτροφή και ανταγωνιστικότητα.....	13
1.3 Προσαρμογή πληθυσμών σε νέες συνθήκες.....	14
1.3.1 Προσαρμογή πληθυσμών στη φύση.....	14
1.3.2 Προσαρμογή πληθυσμών που βρίσκονται σε αιχμαλωσία.....	15
1.3.3 Τροποποίηση της γενετικής ποικιλότητας σε ένα πληθυσμό.....	17
1.4 Εργαλεία γενετικής και πληθυσμιακής ανάλυσης.....	18
1.4.1 Ουδέτεροι γενετικοί τόποι.....	18
1.4.2 Μικροδορυφορικοί γενετικοί τόποι.....	19
ΣΚΟΠΟΣ	22
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	23
2.1 Προέλευση των δειγμάτων που αναλύθηκαν.....	23
2.2 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα δάκου, με χρήση Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).....	23
2.3 Ενίσχυση μικροδορυφορικών γενετικών τόπων του <i>Bactrocera oleae</i>	24
2.4 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου.....	24
2.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου.....	25
2.6 Εμφάνιση πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου με πρωτόκολλο νιτρικού αργύρου.....	25
2.7 Ανάλυση δεδομένων.....	26
Παράρτημα χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων	27
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
3.1 Μικροδορυφορική ανάλυση.....	28

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

Περίληψη

Ο δάκος της ελιάς *Bactrocera oleae*, είναι το πλέον καταστροφικό παράσιτο της ελιάς. Η καταπολέμησή του γίνεται κυρίως με τη χρήση χημικών εντομοκτόνων, η εκτεταμένη χρήση τους όμως έχει αυξήσει το κόστος παραγωγής, έχει μειώσει την αποτελεσματικότητά τους εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας και επιβαρύνει συσσωρευτικά το οικοσύστημα. Εναλλακτικά είχε χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν η Τεχνική Στείρων Εντόμων (SIT), με περιορισμένη επιτυχία. Αυτό οφειλόταν κυρίως στη χαμηλή ανταγωνιστικότητα των μαζικά εκτρεφόμενων στείρων αρσενικών σε σύγκριση με τα αρσενικά στη φύση. Τον τελευταίο καιρό γίνονται προσπάθειες στο Ισραήλ να αναπτυχθεί ένας ισχυρός και ανταγωνιστικός εργαστηριακός πληθυσμός μαζικής εκτροφής. Είναι συνεπώς μεγάλης σημασίας η προσπάθεια κατανόησης του εύρους της γενετικής προσαρμογής. Οι μικροδορυφορικοί δείκτες αποτελούν τα πλέον κατάλληλα εργαλεία για τέτοιου είδους αναλύσεις.

Στην παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια να καθοριστεί ο βαθμός της γενετικής διαφοροποίησης του εργαστηριακού στελέχους σε σχέση με τον ιδρυτικό πληθυσμό. Και εν συνεχεία να καθοριστεί ο τύπος και η συχνότητα των εμπλουτισμών που απαιτούνται, με σκοπό την αύξηση του επιπέδου αποτελεσματικής σύζευξης με τα άτομα των φυσικών πληθυσμών, καθώς και η σύνδεση των μικροδορυφορικών γενετικών τόπων με περιοχές του γονιδιώματος που σχετίζονται με την προσαρμογή του πληθυσμού στις εργαστηριακές συνθήκες, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη χρήσιμων μοριακών δεικτών ελέγχου χαρακτήρων "αγρίου" πληθυσμού καθώς και επιτυχούς σύζευξης.

Εισαγωγή

1.1 Η οικονομική σημασία της ελαιοκαλλιέργειας

Το ελαιόλαδο αποτελεί βασικό συστατικό της διαίτας πολλών λαών του κόσμου, ιδιαίτερα της Μεσογείου. Σήμερα η παγκόσμια ελαιοκαλλιέργεια αντιπροσωπεύει περίπου 810 εκατομμύρια ελαιόδεντρα (Εικόνα 1). Το 98% των ελαιόδεντρων βρίσκονται στην περιοχή της Μεσογείου και από αυτό, το 70% είναι στις ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογειακής λεκάνης. Στη χώρα μας καλλιεργούνται 100 εκατομμύρια ελαιόδεντρα με ετήσια παραγωγή περίπου 250.000 τόνους.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση είναι ο μεγαλύτερος καταναλωτής ελαιόλαδου με 1,3 εκατομμύρια τόνους. Σε κάθε χώρα η κατανάλωση ποικίλει. Για παράδειγμα στην Ελλάδα έχει μετρηθεί ότι καταναλώνονται 15 κιλά το χρόνο ανά κάτοικο, ενώ σε χώρες της Ε.Ε. όπου δεν παράγεται ελαιόλαδο, η κατανάλωσή του περιορίζεται σε 1 μόνο κιλό ανά κάτοικο. Πρώτη σε εξαγωγές ελαιόλαδου είναι η Ισπανία και ακολουθούν η Ιταλία, η Ελλάδα και η Τυνησία.

Τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξανόμενη παγκόσμια ζήτηση που ανέρχεται σε 18% το χρόνο, η οποία οφείλεται κυρίως στην αναγνώριση της αξίας της Μεσογειακής διατροφής.

Στην Ελλάδα η ελιά καλλιεργείται σχεδόν σε όλα τα διαμερίσματά της. Η Κρήτη, η Πελοπόννησος και η Μυτιλήνη είναι οι περιοχές που η ελιά είναι η κύρια καλλιέργεια.

Η ελαιοκαλλιέργεια διαδραματίζει πρωτεύοντα ρόλο στην οικονομία των χωρών, όπου έχει αναπτυχθεί, γιατί δεν αξιοποιεί μόνον εκτάσεις που είναι ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες, αλλά συμβάλλει και στην προστασία των εδαφών από τις διαβρώσεις. Να αναφέρουμε εδώ ότι οι ελαιώνες που βρίσκονται γύρω από την Μεσόγειο, θεωρούνται το μεγαλύτερο δάσος της περιοχής. Ακόμα, ένας μεγάλος αριθμός ελαιώνων ανήκει σε μικροκαλλιεργητές που εξασφαλίζουν έτσι εποχική εργασία και ικανοποιητικό γεωργικό εισόδημα.

Τα κυριότερα προϊόντα που παράγονται από την καλλιέργεια της ελιάς είναι το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές. Από τα δύο αυτά προϊόντα μεγαλύτερη διαιτητική αξία και οικονομική σημασία έχει το ελαιόλαδο. Σε αυτά πρέπει να προστεθεί και το πυρηνέλαιο που προορίζεται για βιομηχανική χρήση. Επίσης

οικονομική σημασία έχουν και κάποια υποπροϊόντα της ελιάς, όπως τα φύλλα, το ξύλο, ο πυρήνας κ.α.(<http://clubs.pathfinder.gr/elia/51418>).



Εικόνα 1. Ελαιόδένδρο

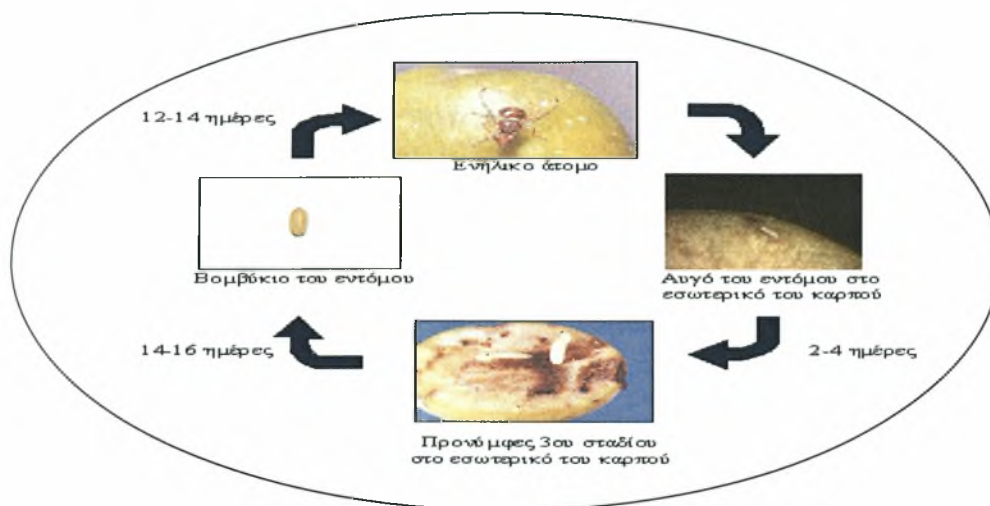
Όμως, η παραγωγικότητα του ελαιόδεντρου μπορεί να μειωθεί από ένα μεγάλο αριθμό ασθενειών, παρασίτων και εντόμων. Οι περισσότερες ασθένειες έχει βρεθεί πως προκαλούνται από αδηλομύκητες. Κάποιες από αυτές είναι το κυκλοκόνιο, το οποίο προσβάλλει τα πράσινα μέρη του φυτού, οι αδρομυκώσεις-βερτισιλιώσεις οι οποίες προσβάλλουν τα αγγεία των δέντρων και προκαλούν μαρασμό και αποξήρανση κλαδιών ή ολόκληρου του δέντρου, η βούλα και η καπνιά. Μια άλλη ασθένεια η οποία προκαλείται από ένα βακτήριο είναι η καρκίνωση η οποία προκαλεί εξασθένηση των δέντρων, ξήρανση των κλαδιών αλλά και ολόκληρων των δέντρων. Κάποια από τα έντομα εχθρούς της ελιάς, είναι ο δάκος (*Bactrocera oleae*) που θεωρείται ο σημαντικότερος εχθρός της και ο πυρηνοτρήτης (*Prays oleae*) ο οποίος προσβάλλει τα φύλλα, τα άνθη και τους καρπούς (http://www.euranek.gr/alter-agro/pdf/study1_gr.pdf).

1.2 Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* ανήκει στην οικογένεια Tephritidae της τάξης των Δίπτερων. Όπως τα περισσότερα είδη της οικογένειας Tephritidae, είναι ένα έντομο μεγάλης οικονομικής σημασίας (Augustinos, 2002, 2005).

1.2.1 Βιολογικός κύκλος

Ο δάκος συμπληρώνει 4-5 γενιές το χρόνο ανάλογα με την περιοχή. Το έντομο το χειμώνα βρίσκεται είτε ως νύμφη στο έδαφος, είτε ως «ακμαίο χειμώνα», είτε ως προνύμφη σε προσβεβλημένο καρπό πάνω στο δέντρο. Την άνοιξη με την άνοδο της θερμοκρασίας δραστηριοποιείται η 1^η γενιά του εντόμου. Αρχές έως μέσα Ιουλίου εμφανίζεται η 2^η γενιά. Τα θηλυκά ωοτοκούν σε νέους πράσινους καρπούς. Κατά την ωοτοκία το θηλυκό διατρύπαι τον καρπό με το ωθέτη του και δημιουργεί ένα χαρακτηριστικό τριγωνικό νύγμα. Η οπή εξόδου καλύπτεται από την εφυμενίδα μέχρι να ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του εντόμου μέσα στον καρπό. Σε κάθε νύγμα το έντομο δεν εναποθέτει περισσότερο από ένα αυγό, ενώ παρατηρούνται πολλά άγονα νύγματα. Τα αυγά εκκολάπτονται μέσα σε 2 με 4 μέρες και η προνύμφη για να αναπτυχθεί απαιτείται ένα διάστημα 14 έως 16 ημερών κατά τη διάρκεια της περιόδου αιχμής. Όταν η προνύμφη ολοκληρώσει την ανάπτυξή της, μετακινείται προς την επιφάνεια του καρπού όπου διευρύνει τη στοά και προετοιμάζει την έξοδο της ως ακμαίο, ανοίγοντας χαρακτηριστική οπή εξόδου. Στη συνέχεια νυμφώνεται και μετά από λίγες μέρες αφού σπάσει την εφυμενίδα, εξέρχεται ως ακμαίο από την οπή. Τους καλοκαιρινούς μήνες λόγω υψηλών θερμοκρασιών, η δραστηριότητα του εντόμου είναι μειωμένη και παρατηρούνται σχετικά χαμηλά ποσοστά προσβολής. Τον Αύγουστο και τον Σεπτέμβριο εμφανίζονται η 3^η και η 4^η γενιά αντίστοιχα. Στις φθινοπωρινές προσβολές όταν ο πληθυσμός του εντόμου έχει αυξηθεί και ο καρπός έχει αποκτήσει μεγαλύτερο μέγεθος, παρατηρούνται περισσότερα από ένα νύγματα στον ίδιο καρπό. Οι προνύμφες των φθινοπωρινών γενιών εξέρχονται από τους καρπούς σε προφυλαγμένες θέσεις στο έδαφος. Ο βιολογικός κύκλος του δάκου φαίνεται αναλυτικά στην Εικόνα 2. (http://www.euraneek.gr/alter-agro/pdf/study1_gr.pdf)



Εικόνα 2. Ο βιολογικός κύκλος του δάκου

1.2.2 Καταστροφικές συνέπειες του δάκου

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae* είναι το πλέον καταστροφικό παράσιτο της ελιάς, και προκαλεί μεγάλες οικονομικές ζημιές στις γεωργικές εκμεταλλεύσεις. Το έντομο ζει σε όλα τα στάδια της ζωής του αποκλειστικά στον καρπό της ελιάς. Οι προνύμφες προκαλούν πρόωρη πτώση των καρπών όταν ακόμα η περιεκτικότητα σε λάδι του καρπού είναι μικρή. Οι εκκολαπτόμενες προνύμφες τρέφονται από το ανώριμο μεσοκάρπιο ανοίγοντας ακανόνιστες επιμήκεις στοές σε βάθος του καρπού, οι οποίες γρήγορα μολύνονται δευτερογενώς από μύκητες και βακτήρια, τα οποία σαπίζουν τον καρπό και αυξάνουν τα επίπεδα των ελεύθερων λιπαρών οξέων (οξύτητα) στο ελαιόλαδο. Επίσης, τα ενήλικα άτομα μέσω της τροφής από τον καρπό μπορούν να προκαλέσουν πρόωρη πτώση του. Η οπή που δημιουργείται από το θυληκό στο επικάρπιο κατά την ωοαπόθεση μειώνει την αξία των επιτραπέζιων καρπών της ελιάς. Η προσβολή των ελαιόδεντρων από το δάκο, επηρεάζει και τον όγκο του παραγομένου ελαιόλαδου, αλλάζει το χρώμα του και να αυξάνει την οξύτητα του. Όταν η προσβολή των καρπών σε ένα ελαιώνα ανέρχεται σε ποσοστό μεγαλύτερο από 1% , οι ελιές καθίστανται ακατάλληλες για τροφή. Αν το ποσοστό προσβολής είναι μεγαλύτερο από 10%, τις καθιστά ακατάλληλες ακόμα και για την παραγωγή λαδιού (Mohammad, 2005).

1.2.3 Καταπολέμηση του δάκου

Λόγω της μεγάλης δυσμενούς επίδρασης που έχει το έντομο στο οικονομικό αποτέλεσμα των ελαιοκαλλιεργειών, ο αποτελεσματικός έλεγχός του είναι επιβεβλημένος. Η καταπολέμησή του βασίζεται κυρίως στη χρήση χημικών εντομοκτόνων. Οι δολωματικοί ψεκασμοί είναι μια προληπτική μέθοδος. Βασίζεται στην έλκυση και τη θανάτωση των δάκων σε δολώματα που αποτελούνται από υδρολυμένη πρωτεΐνη και εντομοκτόνο. Ο πρώτος δολωματικός ψεκασμός διενεργείται πριν ο δάκος αρχίσει να γεννά τα αυγά του. Συνήθως χρειάζονται τρεις με πέντε ψεκασμοί για την επαρκή προστασία του ελαιοκάρπου. Επίσης εφαρμόζονται ψεκασμοί κάλυψης, ως θεραπευτική μέθοδος. Αυτοί οι ψεκασμοί συνιστώνται όταν η προσβολή του δάκου ανέρχεται σε ποσοστό 2-4%. Συνήθως η ανάγκη για εφαρμογή ψεκασμών κάλυψης δημιουργείται την περίοδο Σεπτεμβρίου-Οκτωβρίου. Όμως η εκτεταμένη χρήση των εντομοκτόνων έχει αυξήσει το κόστος παραγωγής και έχει μειώσει την αποτελεσματικότητά τους εξαιτίας της ανάπτυξης ανθεκτικότητας ενώ παράλληλα επιβαρύνει συσσωρευτικά το περιβάλλον (http://users.sch.gr/geioanni/sel-georponos/georponos_3.htm).

Λόγω των παραπάνω σοβαρές προσπάθειες έχουν καταβληθεί και εξακολουθούν να καταβάλλονται σε όλες τις μεσογειακές χώρες για την ανάπτυξη εναλλακτικών μεθόδων δακοπροστασίας, ώστε να εκλείψουν ή τουλάχιστον να περιορισθούν στο ελάχιστο οι ψεκασμοί με χημικές ουσίες. Οι μέθοδοι αυτές εκμεταλλεύονται είτε βιολογικούς παράγοντες (φυσικούς εχθρούς, παράσιτα, ασθένειες κ.λπ.) είτε βιοχημικούς παράγοντες (φερομόνες, ένζυμα, τροφικά ελκυστικά κ.λπ.), για να περιορίσουν τον πληθυσμό του εντόμου σε επίπεδα που δεν έχουν σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις. Μία τέτοια μέθοδος είναι και αυτή της μαζικής παγίδευσης με τη χρήση παγίδων φερομονών (Εικόνα 3). Συγκεκριμένα, η παγίδα περιέχει δύο ισχυρά ελκυστικά του δάκου: α) τη φερομόνη φύλου του δάκου, δηλαδή την ειδική ουσία που εκλύει το έντομο για να προσελκύσει το αντίθετο φύλο με σκοπό τη γονιμοποίηση και β) το όξινο ανθρακικό αμμώνιο, το οποίο διασπώμενο παράγει αμμωνία που είναι ισχυρό ελκυστικό τροφής. Επί πλέον, η επιφάνεια του φακέλου της είναι καλυμμένη με Δελταμεθρίνη, ένα αποτελεσματικό εντομοκτόνο επαφής. Τα έντομα έλκονται από τα ελκυστικά της παγίδας, αγγίζουν την εντομοτοξική επιφάνεια και θανατώνονται από το εντομοκτόνο επαφής (<http://www.viorvl.gr/dakos.html>).



Εικόνα 3. Παγίδα φερομόνης



Κλουβιά μαζικής εκτροφής

Εναλλακτικά είχε χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν η τεχνική στείρων εντόμων SIT (Sterile Insect Technique), με περιορισμένη όμως επιτυχία. Η SIT περιλαμβάνει την μαζική εκτροφή ατόμων και την έκθεσή τους σε ακτίνες γ, οι οποίες προκαλούν στειρότητα (Εικόνα 3). Κατόπιν, τα έντομα απελευθερώνονται στην περιοχή που επιδιώκεται να περιορισθεί ο αριθμός τους. Τα απελευθερωμένα στείρα αρσενικά συζευγνύονται με θηλυκά στη φύση και έτσι δεν έχουμε αναπαραγωγή (Dyck et al., 2005).

Ένα ερώτημα που προκύπτει όσον αφορά την SIT είναι αν μπορούν να επιτευχθούν ικανοποιητικές αναλογίες στείρων:φυσικών ατόμων. Έτσι, πρέπει να λάβουμε υπόψη μας την οικολογία του εντόμου, τη δυναμική των πληθυσμών, βιολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή, διανομή και απελευθέρωση των στείρων εντόμων καθώς και την αλληλεπίδραση με άλλες μεθόδους καταστολής του εντόμου. Ένα άλλο σημαντικό ερώτημα είναι αν τα στείρα αρσενικά που απελευθερώνονται θα είναι ικανά να ανταγωνιστούν αποτελεσματικά τα αρσενικά στη φύση. Για να απαντήσουμε αυτό το ερώτημα πρέπει να μελετήσουμε την επίδραση της μαζικής εκτροφής και στείρωσης στην συμπεριφορά και τη φυσιολογία των εντόμων. Επίσης πρέπει να μελετήσουμε θέματα όπως τα συζευκτικά συστήματα και τρόπους για να αυξήσουμε την ανταγωνιστικότητα των στείρων ατόμων (Dyck et al., 2005).

Επίσης τα έντομα που απελευθερώνονται μπορεί να υφίστανται μεγαλύτερη θήρευση από τα έντομα στη φύση, αν οι μέθοδοι απελευθέρωσης συγκεντρώνουν ή ακινητοποιούν τα έντομα ή αν η μαζική παραγωγή αλλάζει την φυσική συμπεριφορά αποφυγής του θηρευτή.

Η επιβίωση των εντόμων μέχρι την αναπαραγωγική ηλικία είναι πολύ σημαντική και για αυτό το λόγο σε αρκετά προγράμματα τα έντομα δεν απελευθερώνονται αν δεν ωριμάσουν σεξουαλικά.

1.2.4 Μαζική εκτροφή και ανταγωνιστικότητα

Η ικανότητα ενός στείρου αρσενικού να ανταγωνίζεται με αρσενικά στη φύση για τη σύζευξή του με τα θηλυκά, είναι μία λειτουργία του φαινοτύπου του, που όπως σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς καθορίζεται από την έκφραση του γενοτύπου του στο περιβάλλον που βρίσκεται. Έτσι οι διαφορές στις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται οι φυσικοί πληθυσμοί σε σχέση με τους μαζικά εκτρεφόμενους, μπορούν να οδηγήσουν δυνητικά στη γενετική διαφοροποίησή τους.

Πολλοί παράγοντες της μαζικής εκτροφής επηρεάζουν άμεσα την ποιότητα των μαζικά εκτρεφόμενων εντόμων. Τέτοιοι παράγοντες είναι η διαίτα των ενήλικων ατόμων, οι μολυσματικοί παράγοντες, η υγρασία, το pH. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν το μέγεθος του σώματος, την επιβίωση, την μακροβιότητα, την ικανότητα πτήσεων, την ικανότητα ζευγαρώματος και την ανταπόκριση στο φως. Επίσης, οι συνθήκες που ευνοούν την μαζική εκτροφή δεν παράγουν πάντοτε και το πιο ανταγωνιστικό έντομο. Οι γενετικές αλλαγές κατά τη μαζική εκτροφή εντόμων, είναι το αποτέλεσμα αλλαγών σε κληρονομήσιμα χαρακτηριστικά όπως αυτά που προαναφέρθηκαν. Επιπλέον, η γενετική διαφοροποίηση τέτοιων πληθυσμών μπορεί να οφείλεται και σε ιδρυτικά φαινόμενα, τυχαία γενετική παρέκκλιση και φαινόμενα στενωπού (Dyck et al., 2005).



Εικόνα 5. Μαζική εκτροφή εντόμων

1.3 Προσαρμογή πληθυσμών σε νέες συνθήκες

Ο όρος προσαρμογή περιγράφει εν γένει τη διαδικασία με την οποία ένας οργανισμός αποκτά καλύτερη προσαρμογή στο περιβάλλον του, μέσα από αλλαγές στη δομή ή τη λειτουργία του. Ως προσαρμογή εννοείται επίσης οποιοδήποτε συμπεριφορικό, ανατομικό ή φυσιολογικό χαρακτηριστικό που ευνοεί τις δυνατότητες επιβίωσης και αναπαραγωγής του οργανισμού. Η προσαρμογή είναι αποτέλεσμα της φυσικής επιλογής. Όταν η φυσική επιλογή δρα στη γενετική ποικιλότητα του πληθυσμού, τότε αυτός προσαρμόζεται γενετικά στις νέες συνθήκες. Αυτή η γενετική διαφοροποίηση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα εμφανείς αλλαγές στη δομή και τη λειτουργία του οργανισμού ή να προσαρμόζει αποτελεσματικότερα τη δραστηριότητά του στο καινούργιο περιβάλλον (<http://www.wikipedia.org/>).

1.3.1 Προσαρμογή πληθυσμών στη φύση

Τα ζώα δείχνουν ένα σημαντικό εύρος αποκρίσεων στις περιβαλλοντικές συνθήκες. Υπάρχουν πολλά παραδείγματα οργανισμών στη φύση που προσαρμόζονται ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο ζουν. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι αυτό του λεπιδόπτερου *Biston betularia*, το οποίο υπάρχει σε μαύρο και άσπρο χρώμα. Στα μέσα του 19ου αιώνα στην Αγγλία υπήρχαν στα δέντρα μόνο ανοιχτόχρωμα λεπιδόπτερα *Biston betularia*. Με την αύξηση της βιομηχανικής ρύπανσης πολλά από τα δέντρα στα οποία τα λεπιδόπτερα αναπαύονταν έγιναν μαύρα από την καπνιά, δίνοντας έτσι στα μαύρα το πλεονέκτημα να κρύβονται από τους θηρευτές τους. Αυτό έδωσε την ευκαιρία στα μαύρα λεπιδόπτερα να επιβιώσουν και να αναπαραχθούν. Έτσι, μέσα σε λίγες γενιές οι πλειονότητα των *Biston betularia* ήτανε μαύρα (<http://www.wikipedia.org/>). Υπάρχουν επίσης τρωκτικά που προγραμματίζουν το μέγεθος των απογόνων τους ανάλογα με τα αποθέματα τροφής. Ακόμα το cichlid fish (*Astatoreochromis alluandi*) είναι εξοπλισμένο για να σπάει σαλιγκάρια σε περιοχές στις οποίες τα σαλιγκάρια αφθονούν, αλλά όχι σε περιοχές όπου είναι λίγα. Αν οι απόγονοι ενός ψαριού που σπάει σαλιγκάρια μεγαλώσει με μία μαλακή δίαιτα, δεν αναπτύσσει τα σκληρά τμήματα που είναι απαραίτητα για να σπάει σαλιγκάρια, αν και τα αντιλαμβάνεται ως τροφή. Ακόμα έντομα και σαλαμάνδρες που ζουν μέσα σε σπηλιές χάνουν τα μάτια τους (Wesson, 1991).

1.3.2 Προσαρμογή πληθυσμών που βρίσκονται σε αιχμαλωσία

Δύο κύριοι τύποι επιζήμιας γενετικής αλλαγής μπορούν να συμβούν όταν ένας οργανισμός βρεθεί σε ένα περιορισμένο περιβάλλον. Το ένα είναι η αλλαγή στις συχνότητες των αλληλομόρφων και η μείωση της γενετικής ποικιλότητας μέσω γενετικής παρέκκλισης. Το δεύτερο είναι η προσαρμογή των ατόμων στο περιβάλλον της μαζικής εκτροφής. Οι προσαρμογές που ευνοούνται κάτω από τέτοιες συνθήκες προσδίδουν ένα μειονέκτημα στη φύση.

Το θέμα της προσαρμογής σε συνθήκες εργαστηρίου παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στα προγράμματα βιολογικού ελέγχου. Έχει αναφερθεί πως αυτού του είδους η προσαρμογή είναι ο κύριος λόγος αποτυχίας της απελευθέρωσης εντόμων σε τέτοιου είδους προγράμματα (Frankham and Loebel, 1992).

Έχουν γίνει διάφορες μελέτες με μοντέλο την *Drosophila melanogaster* για να προσδιοριστεί η προσαρμογή που υφίστανται οι πληθυσμοί σε εργαστηριακές συνθήκες.

Ο Frankham μελέτησε την προσαρμογή σε εργαστηριακές συνθήκες της *Drosophila melanogaster*, μετρώντας την αναπαραγωγική επιτυχία ενός μεγάλου πληθυσμού που βρισκόταν στο εργαστήριο για 12 μήνες, σε σύγκριση με ένα πληθυσμό από τη φύση που είχε πρόσφατα συλλεχθεί από την ίδια περιοχή. Υπολογίστηκε πως ο εργαστηριακός πληθυσμός είχε διπλάσια αναπαραγωγική επιτυχία από τον φυσικό πληθυσμό. Αυτή η διαφορά μεταξύ των δύο πληθυσμών μπορεί να αποδοθεί στην προσαρμογή στο εργαστηριακό περιβάλλον. Η αρμοστικότητα του εργαστηριακού πληθυσμού αν επανέλθει στη φύση αναμένεται να μειωθεί. Σύμφωνα με τον Frankham δύο είναι οι αιτίες για την προσαρμογή στο εργαστήριο. Η αυξημένη συγκέντρωση των εντόμων και η αλλαγή στην τροφή. Στη φύση τα έντομα ζουν με φρούτα που βρίσκονται σε ζύμωση και η κύρια πηγή άνθρακα είναι η αλκοόλη, η ακετόνη και σάκχαρα των φρούτων, ενώ στο εργαστηριακό θρεπτικό μέσο περιέχονται υψηλά ποσοστά αμύλου, σουκρόζης και μια μικρή ποσότητα λακτόζης και μετά από ζύμωση θα υπάρξει παραγωγή λίγης αλκοόλης. Επίσης η συγκέντρωση των εντόμων στο εργαστήριο ήταν πολύ μεγαλύτερη από αυτήν των εντόμων στην περιοχή που αυτά είχαν συλλεχθεί (Frankham et al., 1992).

Ο Hoffmann μελέτησε το πώς η προσαρμογή σε εργαστηριακές συνθήκες επηρεάζει την ανθεκτικότητα στον υποσιτισμό και την αφυδάτωση σε πληθυσμούς

Drosophila melanogaster. Χρησιμοποίησε πληθυσμούς οι οποίοι είχαν εισαχθεί και παραμείνει στο εργαστήριο για αρκετά χρόνια και παρατήρησε πως υπήρξε ταχεία μείωση στην ανθεκτικότητα στο stress καθώς υπήρξε προσαρμογή σε εργαστηριακές συνθήκες. Αυτή η μείωση της ανθεκτικότητας μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη δράση της επιλογής για ανθεκτικότητα στις εργαστηριακές συνθήκες. Εφόσον η δράση της επιλογής όσο αφορά την ανθεκτικότητα, μειώνεται σε αυτό το περιβάλλον, τότε η ανθεκτικότητα στο stress μπορεί να χαθεί, είτε ως αποτέλεσμα της επιλογής σε ένα άλλο χαρακτήρα που γενετικά συνδέεται αρνητικά με αυτό ή λόγω της συσσώρευσης μεταλλάξεων. Η ανθεκτικότητα στο stress παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς θεωρείται ότι συνδέεται με άλλα χαρακτηριστικά. Συγκεκριμένα η ανθεκτικότητα στον υποσιτισμό, την αφυδάτωση και το οξειδωτικό stress είναι συνδεδεμένα με την μακροβιότητα. Έτσι, λόγω αυτής της σύνδεσης είναι πιθανό να αναμένεται μείωση της διάρκειας ζωής (Hoffmann et al., 2001).

Επίσης μία πληθώρα φαινοτυπικών αλλαγών έχουν παρατηρηθεί μετά από την εισαγωγή του δάκου στο εργαστήριο σε συνθήκες μαζικής εκτροφής. Μια μελέτη που έγινε, βασίστηκε στην ανάλυση του γενετικού τόπου της αλκοολικής αφυδρογονάσης (ADH). Παρατηρήθηκε ταχεία αλλαγή στις αλληλομορφικές συχνότητες του γονιδίου, στις πρώτες κιόλας γενιές κατά τη μαζική εκτροφή. Αυτές οι ταχείες αλλαγές συγκλίνουν με την αυξημένη θνησιμότητα στις προνύμφες στο τεχνητό θρεπτικό μέσο, το οποίο αποδεικνύει αυξημένη επιλεκτική πίεση στην αρχή της αποικιοποίησης. Σκοπός αυτής της μελέτης ήταν ο προσδιορισμός του κύριου παράγοντα επιλογής που δρα στη μαζική εκτροφή. Παρατηρήθηκε ότι τα έντομα τα οποία διατηρήθηκαν σε ελιές δεν εμφάνισαν αλλαγές στις αλληλομορφικές συχνότητες. Αυτό υποδεικνύει πως το θρεπτικό μέσο είναι ο παράγοντας που ευθύνεται για τις γονιδιακές αλλαγές στην ADH και ότι η δίαιτα των ενηλίκων και οι εργαστηριακές συνθήκες δεν παίζουν κάποιο σημαντικό ρόλο. Αυτό φαίνεται και από το γεγονός ότι όποτε γίνεται συλλογή κάποιων εντόμων για αποικιοποίηση στο εργαστήριο, οι πρώτες γενιές χαρακτηρίζονται από αυξημένη θνησιμότητα στο στάδιο της προνύμφης και σημαντική μείωση του μεγέθους των νυμφών (Economopoulos and Loukas, 1986).

1.3.3 Τροποποίηση της γενετικής ποικιλότητας σε ένα πληθυσμό

Η ποικιλότητα μέσα σε ένα πληθυσμό μπορεί να τροποποιηθεί. Η τροποποίηση αυτή ενέχει μία τυχαία διάσταση, που καθορίζεται από την τυχαία γενετική παρέκκλιση και τη γονιδιακή ροή και μια συστηματική, που κατευθύνεται από την φυσική επιλογή.

Ως τυχαία γενετική παρέκκλιση ορίζεται η τυχαία σχετική αλλαγή της γονιδιακής συχνότητας. Η τύχη ενός αλληλομόρφου μπορεί να είναι η σταθεροποίησή του ή η εξαφάνισή του και ο πληθυσμός γίνεται ομοζυγωτικός, εκτός και αν το αλληλόμορφο που εξαφανίστηκε αντικατασταθεί με μετάλλαξη ή μετανάστευση ή επιτευχθεί ισορροπία μεταξύ γενετικής παρέκκλισης και ρυθμού μετάλλαξης. Έτσι σε μικρούς πληθυσμούς όλα τα γονίδια τείνουν προς τον ομοαλληλισμό (ομοζυγωτία), με αποτέλεσμα να μειώνεται η ετεροζυγωτία και η ποικιλότητα, παράγοντες που επηρεάζουν τη μοριακή εξελικτική διεργασία. Με αυτόν τον τρόπο όταν ένας πληθυσμός δημιουργείται από πολύ λίγα μόνο άτομα ενός πληθυσμού (όπως συμβαίνει στην αποικιοποίηση ενός φυσικού πληθυσμού στο εργαστήριο) έχουμε μία ακραία δράση της γενετικής παρέκκλισης που ονομάζεται ιδρυτική αρχή. Το αποτέλεσμα της διάσπασης ενός πληθυσμού σε πολύ μικρούς είναι η δημιουργία μεγαλύτερων γενετικών διαφορών μεταξύ τους (Αλαχιώτης, 2007).

Επίσης, η φυσική επιλογή μπορεί να δράσει σε ένα πληθυσμό και να τροποποιήσει την γενετική ποικιλότητά του. Με τον όρο φυσική επιλογή ορίζουμε τη διεργασία συσχέτισης της επιβίωσης και της αναπαραγωγής των ατόμων ενός πληθυσμού που διαφέρουν σε κληρονομικούς χαρακτήρες, από τους οποίους οι καλύτερα προσαρμοσμένοι, αυξάνονται σε συχνότητα από γενιά σε γενιά. Έτσι, σε ένα τροποποιημένο από τον άνθρωπο περιβάλλον, η φυσική επιλογή θα δράσει αυξάνοντας την συχνότητα των ατόμων που είναι καλύτερα προσαρμοσμένα στο νέο περιβάλλον (θερμοκρασία, τροφή, υγρασία κ.α.). Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να τροποποιηθούν οι αλληλομορφικές συχνότητες ενός πληθυσμού που έχει δημιουργηθεί με αποικιοποίηση ενός φυσικού πληθυσμού στο εργαστήριο.

1.4 Εργαλεία γενετικής και πληθυσμιακής ανάλυσης

Οι πολυμορφικοί γενετικοί δείκτες είναι χρήσιμα εργαλεία στις γενετικές και πληθυσμιακές αναλύσεις. Χρησιμοποιούνται ευρέως καθώς με τη βοήθειά τους μπορεί να υπολογιστεί η γενετική ποικιλότητα ενός πληθυσμού, η δομή ενός πληθυσμού και το μέγεθος της γονιδιακής ροής μεταξύ πληθυσμών. Το 1955 αναπτύχθηκε μια μέθοδος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα αμύλου, η οποία αποδείχθηκε πολύ σημαντική για την ανάπτυξη της γενετικής ανάλυσης. Αυτή η τεχνική διαχωρίζει πρωτεΐνες με βάση την κινητικότητά τους σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Με την ανακάλυψη των αλλοενζύμων, χιλιάδες μελέτες χρησιμοποίησαν αυτό τον τρόπο προσδιορισμού της γενετικής ποικιλότητας, τις επόμενες δεκαετίες. Το μειονέκτημα αυτής της κατηγορίας δεικτών είναι ότι αφενός πολλά ένζυμα είναι μονομορφικά και αφετέρου υπάρχουν περιπτώσεις αντικατάστασης αμινοξέων που δεν επηρεάζουν το ηλεκτρικό φορτίο του πολυπεπτιδίου και δεν μπορούν να διακριθούν με την ηλεκτροφόρηση. Η ανάπτυξη DNA δεικτών, δηλαδή δεικτών που αποκαλύπτουν τον πολυμορφισμό στο επίπεδο του γονιδιώματος, αποτέλεσε επανάσταση στην πληθυσμιακή γενετική. Οι νεότερες τεχνικές στηρίζονται στη χρήση ενδονουκλεασών περιορισμού και την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR). Τέτοιες τεχνικές δίνουν μεγαλύτερη δυνατότητα διάκρισης της ποικιλότητας εντός και μεταξύ των πληθυσμών. Κάποιοι τέτοιοι δείκτες είναι τα RFLPs, τα RAPDs και τα SNPs. Αρκετές μελέτες σήμερα χρησιμοποιούν και ουδέτερους γενετικούς δείκτες, που είναι περιοχές του γονιδιώματος που μας δίνουν αρκετές πληροφορίες με σεβασμό στη δομή του πληθυσμού (Beebe and Rowe, 2004).

1.4.1 Ουδέτεροι γενετικοί τόποι

Ως ουδέτερους γενετικά τόπους ορίζουμε τους τόπους στους οποίους μία νέα μετάλλαξη έχει το ίδιο αποτέλεσμα στην αρμοστικότητα με το γονίδιο από το οποίο προήλθε. Τέτοιοι ουδέτεροι γενετικά τόποι είναι και οι μικροδορυφόροι, οι οποίοι χρησιμοποιούνται σε μελέτες προσδιορισμού της γενετικής απόστασης μεταξύ πληθυσμών.

Μία ουδέτερη μετάλλαξη μπορεί να συγκρατείται σταθερά τον πληθυσμό, μέσω της γενετικής παρέκκλισης, χωρίς καμιά εξελικτική δράση. Ωστόσο αν για

παράδειγμα ένας μικροδορυφόρος είναι πολύ κοντά στο ίδιο χρωμόσωμα με ένα γονίδιο το οποίο υφίσταται πίεση επιλογής, ο ανασυνδιασμός μεταξύ τους είναι σπάνιος και συγκεκριμένα ουδέτερα αλληλόμορφα επιλέγονται, ένα φαινόμενο το οποίο ονομάζεται hitch-hiking. Με βάση αυτό το φαινόμενο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε ουδέτερους μοριακούς δείκτες όπως μικροδορυφόρους, για την εύρεση αγνώστων γονιδίων που εμπλέκονται στη προσαρμογή ενός πληθυσμού (γενετική χαρτογράφηση). Αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε οργανισμούς μοντέλα όπως η *Drosophila melanogaster*, η οποία μπορεί να εκτραφεί σε μεγάλους πληθυσμούς στο εργαστήριο. Η προσέγγιση αυτή βασίζεται στην μελέτη μεγάλου αριθμού ουδέτερων δεικτών κατά τη διάρκεια πειραμάτων εκτροφής, έτσι ώστε να βρούμε περιοχές του γονιδιώματος που σχετίζονται με την προσαρμογή του πληθυσμού στις εργαστηριακές συνθήκες (Αλαχιώτης, 2007).

1.4.2 Μικροδορυφορικοί γενετικοί τόποι

Οι μικροδορυφόροι είναι μικρές διαδοχικές επαναλήψεις νουκλεοτιδικών μοτίβων, των οποίων οι επαναλαμβανόμενες μονάδες έχουν μήκος 1 έως 6 βάσεις. Το σύνηθες μήκος μιας μικροδορυφορικής αλληλουχίας είναι 10-30 (Brown, 2002), ενώ σπάνια υπερβαίνουν τις 70 μονάδες επανάληψης (Schlotterer, 1998). Η παρουσία δορυφορικού DNA αποκαλύφθηκε για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1960. Οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι, όταν φυγοκεντρούσαν DNA κάτω από ορισμένες συνθήκες, αυτό χωριζόταν σε δύο ή περισσότερες ζώνες. Μία κύρια ζώνη, η οποία περιελάμβανε τα γονίδια και κάποιες δευτερεύουσες ζώνες, οι οποίες γι' αυτόν ακριβώς το λόγο ονομάστηκαν δορυφορικές. Παρόλα αυτά, χρειάστηκε να ανακαλυφθεί η τεχνική της αλληλούχισης για να διαπιστωθεί ότι αυτές οι ζώνες αποτελούνται από επιμήκεις, επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες DNA.

Ο αριθμός, το μήκος, η σύσταση και η διασπορά των μικροδορυφόρων ποικίλει μεταξύ των διάφορων οργανισμών (Lee et al., 2003). Οι μικροδορυφόροι είναι άφθονοι στο γονιδίωμα των περισσότερων ευκαρυωτικών οργανισμών στους οποίους έχουν μελετηθεί, ενώ αντίθετα το ποσοστό τους στους προκαρυωτικούς οργανισμούς φαίνεται να είναι συγκριτικά μικρότερο (Schlotterer, 1998). Εκτός του αριθμού των μικροδορυφόρων και το μοτίβο της επανάληψης μπορεί να διαφέρει

μεταξύ των ειδών. Όσον αφορά το μέγεθος της επαναλαμβανόμενης μονάδας, έχει δειχτεί ότι οι τρι- και τετρα-νουκλεοτιδικοί μικροδορυφόροι είναι σπανιότεροι από τους δινουκλεοτιδικούς (Schlotterer, 1998, Zane et al., 2002, Wang et al., 1994, Schug et al., 1998). Μεταξύ των δινουκλεοτιδικών μικροδορυφόρων παρατηρείται μία κυριαρχία των GT/AC μικροδορυφόρων στα διάφορα είδη θηλαστικών και εντόμων (Schlotterer, 1998).

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες εντοπίζονται κυρίως σε μη κωδικές περιοχές, κοντά ή μέσα σε ρετροτρανσποζόνια και πιο σπάνια σε κωδικές ή ρυθμιστικές περιοχές. Μελέτες σε μία πλειάδα οργανισμών από μύκητες έως και τον άνθρωπο έχουν δείξει ότι η συχνότητα όλων των μικροδορυφορικών αλληλουχιών μειώνεται σημαντικά εντός κωδικών περιοχών, με εξαίρεση τις τρι- και εξανουκλεοτιδικές επαναλήψεις (Metzgar et al., 2000, Morgante et al., 2002). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι οι μικροδορυφόροι αποτελούν συχνούς στόχους μεταλλάξεων. Μόνο όμως στην περίπτωση μικροδορυφόρων με μονάδα επανάληψης πολλαπλάσιο του τρία μία αλλαγή στον αριθμό των μονάδων επανάληψης δεν αλλάξει το αναγνωστικό πλαίσιο, επιφέροντας δραματικές αλλαγές στη λειτουργικότητα του μεταγράφου (Liu et al., 1999). Επίσης, σε ορισμένα γονίδια έχουν βρεθεί μικροδορυφόροι στα 5' και/ή στα 3' μη μεταφραζόμενα άκρα ενώ δινουκλεοτιδικοί μικροδορυφόροι έχουν βρεθεί και σε ιντρόνια (Liu et al., 1999).

Δύο είναι οι μηχανισμοί που έχουν προταθεί για να εξηγήσουν την αλλαγή στον αριθμό των μονάδων επανάληψης μιας μικροδορυφορικής αλληλουχίας. Ο πρώτος και ο πιο πιθανός αποδίδεται στο φαινόμενο του γλιστρήματος του DNA που συμβαίνει κατά την αντιγραφή του (Tachida και Iizuka, 1992). Πιο συγκεκριμένα, όταν η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα γλιστρά κατά μία επαναλαμβανόμενη αλληλουχία επάνω στην παλιά μήτρα, εξαναγκάζει τη DNA πολυμεράση να προσθέσει μια επιπλέον επαναλαμβανόμενη αλληλουχία στη νέα αυτή αλυσίδα, ώστε να κλείσει το κενό που δημιουργείται, έτσι οδηγούμαστε σε αύξηση του αριθμού των επαναλαμβανόμενων μονάδων του μικροδορυφόρου. Αντίθετα μείωση των μονάδων επανάληψης παρατηρείται όταν γλιστρά η αρχική αλυσίδα-μήτρα, οπότε επιδιορθωτικά ένζυμα απομακρύνουν την πλεονάζουσα επαναλαμβανόμενη αλληλουχία (Moxon et al., 1994). Ορισμένες από τις αλλαγές αυτές στο μήκος της μικροδορυφορικής αλληλουχίας διορθώνονται είτε από τη δράση της εξωνουκλεάσης της DNA πολυμεράσης είτε από επιδιορθωτικά ένζυμα. Μόνο όταν οι αλλαγές αυτές

ξεφύγουν από τους επιδιορθωτικούς μηχανισμούς του κυττάρου έχουμε τη δημιουργία ενός διαφορετικού αλληλομόρφου.

Μια δεύτερη θεωρία που έχει διατυπωθεί για να εξηγήσει τις αλλαγές στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες είναι ο ανασυνδιασμός (Harding et al., 1992). Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγή του μεγέθους ενός μικροδορυφόρου είτε με άνισο διασκελισμό είτε με γονιδιακή μετατροπή.

Τα χαρακτηριστικά των μικροδορυφόρων όπως η αφθονία τους και η τυχαία διασπορά στο γονιδίωμα, η υψηλή πολυμορφικότητα, η ευκολία στην ανάλυσή τους μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης και τέλος το γεγονός ότι κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες δείκτες τους καθιστά τους πλεονεκτικότερους μοριακούς δείκτες σε πολλούς τομείς έρευνας. Οι μικροδορυφόροι αποτελούν σήμερα έναν από τους πιο χρήσιμους δείκτες σε πειράματα γενετικής χαρτογράφησης (Zheng et al., 1993, Menotti-Raymond et al., 1999, Shimoda et al., 1999, Burt et al., 2003). Έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή λεπτομερών γενετικών χαρτών σε πολλά είδη. Επίσης, ευρεία είναι η χρήση των μικροδορυφόρων σε πληθυσμιακές μελέτες. Χρησιμοποιούνται δηλαδή για την αποκάλυψη της γενετικής δομής των φυσικών πληθυσμών καθώς και τον έλεγχο της γενετικής τους συγγένειας. Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να μελετηθούν φαινόμενα γονιδιακής ροής και γεγονότα στενωπού.

Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι λόγω του γεγονότος ότι για την ανάλυσή τους, η οποία γίνεται μέσω PCR, ελάχιστη ποσότητα DNA είναι αρκετή, οι μικροδορυφόροι χρησιμοποιούνται ευρέως και σε περιπτώσεις όπου η ποσότητα (έντομα) είτε η ποιότητα του DNA δεν είναι και άριστη (τρίχες, σκελετοί, μουσειακά δείγματα, περιττώματα).

Σκοπός

Η καταπολέμησή του δάκου της ελιάς γίνεται κυρίως με τη χρήση χημικών εντομοκτόνων, η εκτεταμένη χρήση τους όμως προκαλεί διάφορα προβλήματα. Στο παρελθόν είχε χρησιμοποιηθεί η Τεχνηκή Στείρων Εντόμων (SIT), με περιορισμένη επιτυχία. Αυτό οφειλόταν κυρίως στη χαμηλή ανταγωνιστικότητα των μαζικά εκτρεφόμενων στείρων αρσενικών σε σύγκριση με τα αρσενικά στη φύση. Τον τελευταίο καιρό γίνονται προσπάθειες στο Τμήμα Εντομολογίας του Ινστιτούτου Φυτοπροστασίας του Ισραήλ να αναπτυχθεί ένας ισχυρός και ανταγωνιστικός εργαστηριακός πληθυσμός μαζικής εκτροφής. Είναι συνεπώς μεγάλης σημασίας η προσπάθεια κατανόησης του εύρους της γενετικής προσαρμογής. Οι μικροδορυφορικοί δείκτες αποτελούν τα πλέον κατάλληλα εργαλεία για τέτοιου είδους αναλύσεις.

Στόχος αυτής της μελέτης είναι να καθοριστεί ο βαθμός της γενετικής διαφοροποίησης του εργαστηριακού στελέχους σε σχέση με τον ιδρυτικό πληθυσμό, καθώς και ο τύπος και η συχνότητα εμπλουτισμών που απαιτούνται, με σκοπό την αύξηση του επιπέδου αποτελεσματικής σύζευξης με τα άτομα των φυσικών πληθυσμών.

Για τον σκοπό αυτό έγινε γενετική ανάλυση των πρώτων πέντε γενεών του αποικιοποιημένου στελέχους του Ισραήλ, με τη χρήση εφτά μικροδορυφορικών γενετικών τόπων.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Προέλευση των δειγμάτων που αναλύθηκαν

Χρησιμοποιήθηκε γονιδιωματικό DNA από αποικιοποιημένο εργαστηριακό πληθυσμό *Bactrocera oleae*, της περιοχής του Tel Aviv (Ισραήλ), που διατηρείται στο Εργαστήριο Εντομολογίας του Ινστιτούτου Φυτοπροστασίας (Οργανισμός Γεωργικών Ερευνών, Beit-Dagan) του Ισραήλ. Αναλύθηκαν 30 άτομα από κάθε μια από τις ακόλουθες εργαστηριακές γενιές (WildI, F2, F3 και F5) και 17 άτομα από την F1, με τη χρήση επτά μικροδορυφορικών γενετικών τόπων (Augustinos et al. 2002, 2005).

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

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

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

8. Το ίζημα ενυδατώνεται με την προσθήκη Διαλύματος Ενυδάτωσης DNA (100μl, DNA Rehydration Solution) και επωάζεται σε θερμοκρασία 65°C για 1 ώρα.
9. Το DNA αποθηκεύεται σε θερμοκρασία -20°C.

2.3 Ενίσχυση μικροδορυφορικών γενετικών τόπων του *Bactrocera oleae*

Για κάθε μικροδορυφορικό τόπο πραγματοποιήθηκε PCR τελικού όγκου 10μl. Χρησιμοποιήθηκαν 10ng γονιδιωματικού DNA, 1x ρυθμιστικό διάλυμα, 1,5mM MgCl₂, 0,25mM για κάθε dNTP, 0,5μM για κάθε εκκινητή, 0,5U Taq DNA πολυμεράση (PCR kit της Bioline®). Η ενίσχυση πραγματοποιήθηκε με ένα αρχικό στάδιο αποδιάταξης (4 λεπτών στους 94°C), ακολουθούμενο από 30 κύκλους: 30 δευτερολέπτων στους 94°C, 30 δευτερολέπτων στους 53°C, 30 δευτερολέπτων στους 72°C, με ένα τελικό στάδιο επιμήκυνσης 5 λεπτών στους 72°C.

2.4 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου

1. Σε ένα ποτήρι ζέσεως προστίθενται ουρία 46,7% (40ml), TBE 5x (16ml), διάλυμα ακρυλαμιδίου 50% (8ml) και dH₂O (16ml)

2. Η μήτρα πολυμερισμού προετοιμάζεται ως εξής:

Το μικρό τζάμι επαλείφεται με 1,8ml σιλκόνη αποκόλλησης (diclorodimethylsilane), ενώ το μεγάλο τζάμι με διάλυμα συγκόλλησης το οποίο περιέχει 3-(Methacryloyloxy)propyl]trimethoxysilane (100μl), αιθανόλη (20ml) και διάλυμα 10% acetic acid (glacial). Το μεγάλο τζάμι τοποθετείται σε οριζόντια θέση και στις μεγάλου μήκους πλευρές τοποθετούνται ειδικές ταινίες. Έπειτα αφήνεται το μικρό τζάμι από πάνω έτσι ώστε να καλύπτει ακριβώς το μεγάλο. Τα άκρα των δύο τζαμιών ενώνονται σε τρεις θέσεις με μεταλλικούς συνδέσμους για να υπάρχει καλή επαφή μεταξύ τους.

3. Στο διάλυμα ακολούθως προστίθενται 300μl APS και 45μl TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine) και τοποθετείται σε μήτρα πολυμερισμού (45 x 35 x 0,1 cm).
4. Στο επάνω μέρος του μικρού τζαμιού, τοποθετείται πλαστικό "χτενάκι" και το πήκτωμα αφήνεται να πολυμεριστεί σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον μία ώρα.

2.5 Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR σε πήκτωμα πολυακριλαμιδίου

Τα προϊόντα PCR ηλεκτροφορούνται σε αποδιατακτικό πήκτωμα πολυακριλαμιδίου, για τον διαχωρισμό και την αναγνώριση των διαφόρων αλληλομόρφων του κάθε μικροδορυφορικού γενετικού τόπου, αλλά και των ομοζυγωτών και ετεροζυγωτών.

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

Στα προς ηλεκτροφόρηση δείγματα προστίθεται 1 μέρος διαλύματος χρωστικής (10mM EDTA pH 8, φορμαμίδιο 99%, 0,025% μπλε της βρωμοφαινόλης και 0,025% κυανού της ξυλόζης).

Κατόπιν αποδιατάσσονται σε θερμοκρασία 85°C για 10 λεπτά και αμέσως μετά τοποθετούνται σε πάγο. Τέλος τα δείγματα τοποθετούνται στα "πηγαδάκια" και ηλεκτροφορούνται υπό σταθερή τάση 1500V, 200mA και 60W.

2.6 Εμφάνιση πηκτώματος πολυακριλαμιδίου με πρωτόκολλο νιτρικού αργύρου

1. Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε 2L υδατικού διαλύματος στερέωσης /εξουδετέρωσης (10% v/v acetic acid [glacial]) για 20 λεπτά με ήπια ανάδευση.
2. Ακολουθούν 3 πλύσεις με dH₂O για 2 λεπτά η κάθε μία με ήπια ανάδευση.

3. Προστίθενται 2L υδατικού διαλύματος βαφής (2g νιτρικός άργυρος, 3ml διαλύματος φορμαλδεΰδης 37%) και το πήκτωμα επωάζεται για 30 λεπτά υπό ανάδευση.
4. Το διάλυμα απομακρύνεται και το πήκτωμα ξεπλένεται με dH₂O για 5 δευτερόλεπτα.
5. Πραγματοποιείται εμφάνιση του πηκτώματος με εμβάπτισή του σε 2L δροσερού υδατικού διαλύματος εμφάνισης (άνυδρο ανθρακικό νάτριο (60g), φορμαλδεΰδη 37% (3ml) και Sodium Thiosulfate 10mg/ml (400μl)). Το πήκτωμα αναδεύεται ήπια έως ότου εμφανισθούν ευκρινώς οι μπάντες.
6. Η αντίδραση εμφάνισης διακόπτεται με εμβάπτιση του πηκτώματος σε 1L του αρχικού υδατικού διαλύματος στερέωσης /εξουδετέρωσης και ακολουθεί έκπλυση με dH₂O.

2.7 Ανάλυση δεδομένων

Η γενετική διαφοροποίηση μετρήθηκε ως συνάρτηση του πραγματικού αριθμού αλληλομόρφων για κάθε γενετικό τόπο (na), του δραστικού αριθμού αλληλομόρφων (ne), της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας (Ho) και της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (He), με τη βοήθεια του προγράμματος POPGENE. Επίσης οι γενετικές αποστάσεις μετρήθηκαν με τη χρήση του προγράμματος POPGENE σύμφωνα με τη μέθοδο του Nei (1972) (Yeh et al., 1999).

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

Για την κατάταξη του κάθε ατόμου σε ένα πληθυσμό χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα STRUCTURE. Χρησιμοποιήσαμε το πρόγραμμα χωρίς προσμειξεις (no admixture model), με burn-in period 5000 και 5000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) επαναλήψεις μετά το αρχικό burn-in. Δοκιμάσαμε για K=2 και K=3.

Παράρτημα χρησιμοποιούμενων διαλυμάτων

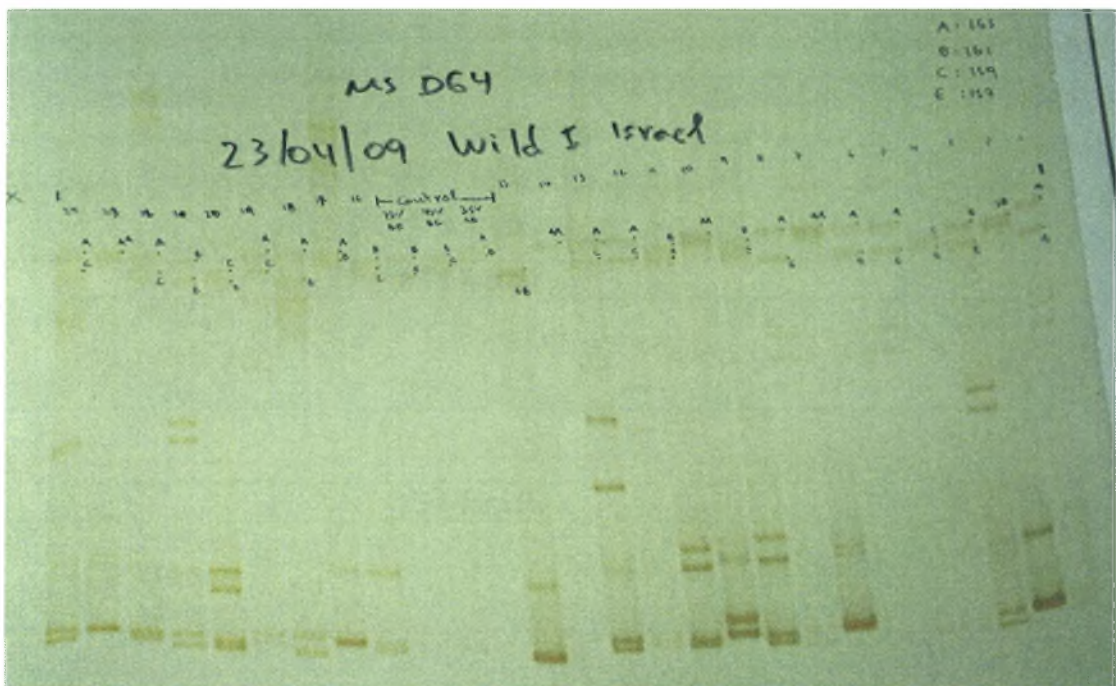
- 1. Παρασκευή διαλύματος ουρίας 46,7% w/v:** 233,5g ουρίας διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 500ml (Η διάλυση γίνεται με θέρμανση).
- 2. Παρασκευή διαλύματος APS 10%:** 1g ammonium persulfate διαλύεται σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 10 ml.
- 3. Παρασκευή διαλύματος TBE 5x:** 54g Tris-base, 27,5 g Boric Acid και 20ml διαλύματος EDTA (pH 8,0, 0,5M), διαλύονται σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 1L.
- 4. Παρασκευή ακρυλαμίδιου 50%:** 72,5g Ακρυλαμίδιο και 2,5g Bis-ακρυλαμίδιο διαλύονται με θέρμανση σε dH₂O μέχρι τελικού όγκου 150ml. Ακολουθεί διήθηση.

Αποτελέσματα

3.1 Μικροδορυφορική ανάλυση

Πραγματοποιήθηκε γενετική ανάλυση αποικιοποιημένου εργαστηριακού πληθυσμού *Bactrocera oleae*, με τη χρήση επτά μικροδορυφορικών γενετικών τόπων (Augustinos et al. 2002, 2005). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε 30 άτομα από κάθε μια από τις ακόλουθες εργαστηριακές γενιές (WildI, F2, F3 και F5) και σε 17 άτομα από την F1.

Από κάθε άτομο απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA, όπως περιγράφεται στο «Υλικά και μέθοδοι». Μετά την απομόνωση ακολούθησε PCR και ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και εμφάνιση με χρώση με $AgNO_3$

Η ανάλυση έδειξε σημαντικές αλλαγές στις συχνότητες των αλληλομόρφων των περισσότερων γενετικών τόπων. Οι πίνακες που ακολουθούν παρουσιάζουν τις αλληλομορφικές συχνότητες για κάθε μικροδορυφορικό γενετικό τόπο και στα

διαγράμματα βλέπουμε σχηματοποιημένες τις αλλαγές των συχνοτήτων κάθε αλληλομόρφου σε κάθε γενιά.

Πίνακας 1. Αλληλομορφικές συχνότητες του μικροδορυφόρου D8 για κάθε γενιά

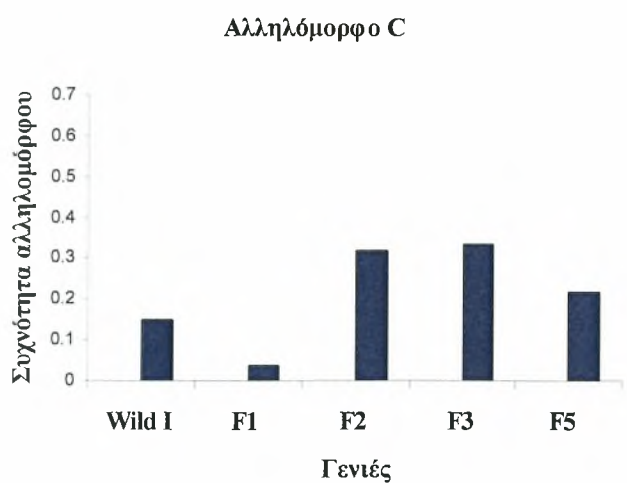
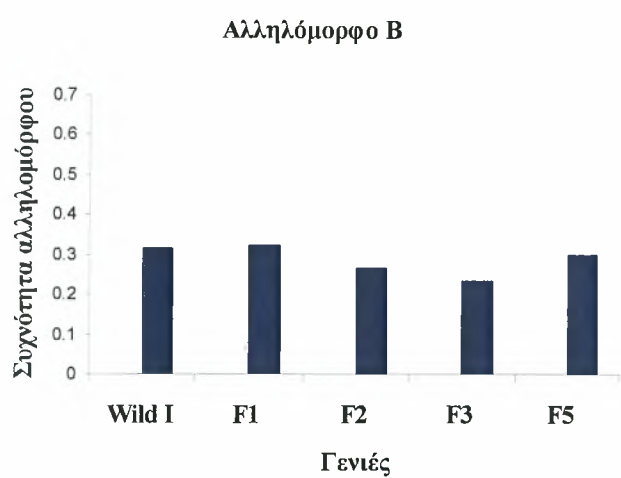
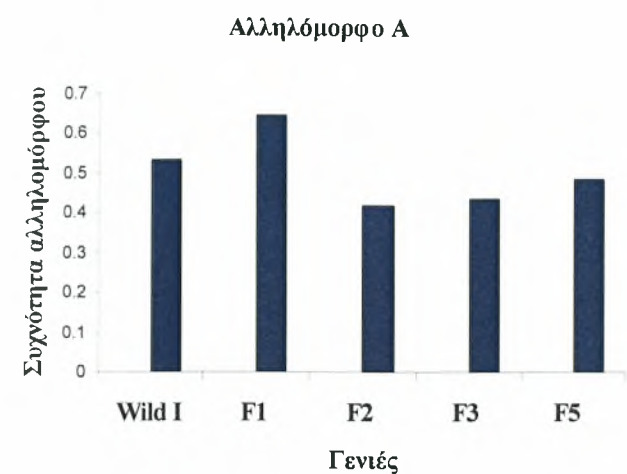
Wild I Israel	
Allele A	0,5333
Allele B	0,3167
Allele C	0,1500

F1 I Israel	
Allele A	0,6429
Allele B	0,3214
Allele C	0,0357

F2 I Israel	
Allele A	0,4167
Allele B	0,2667
Allele C	0,3167

F3 I Israel	
Allele A	0,4333
Allele B	0,2333
Allele C	0,3333

F5 I Israel	
Allele A	0,4833
Allele B	0,3000
Allele C	0,2167



Εικόνα 7. Προφίλ αλληλομορφικών συχνοτήτων του μικροδορυφορικού τόπου D8

Πίνακας 2. Αλληλομορφικές συχνότητες του μικροδορυφόρου D84 για κάθε γενιά

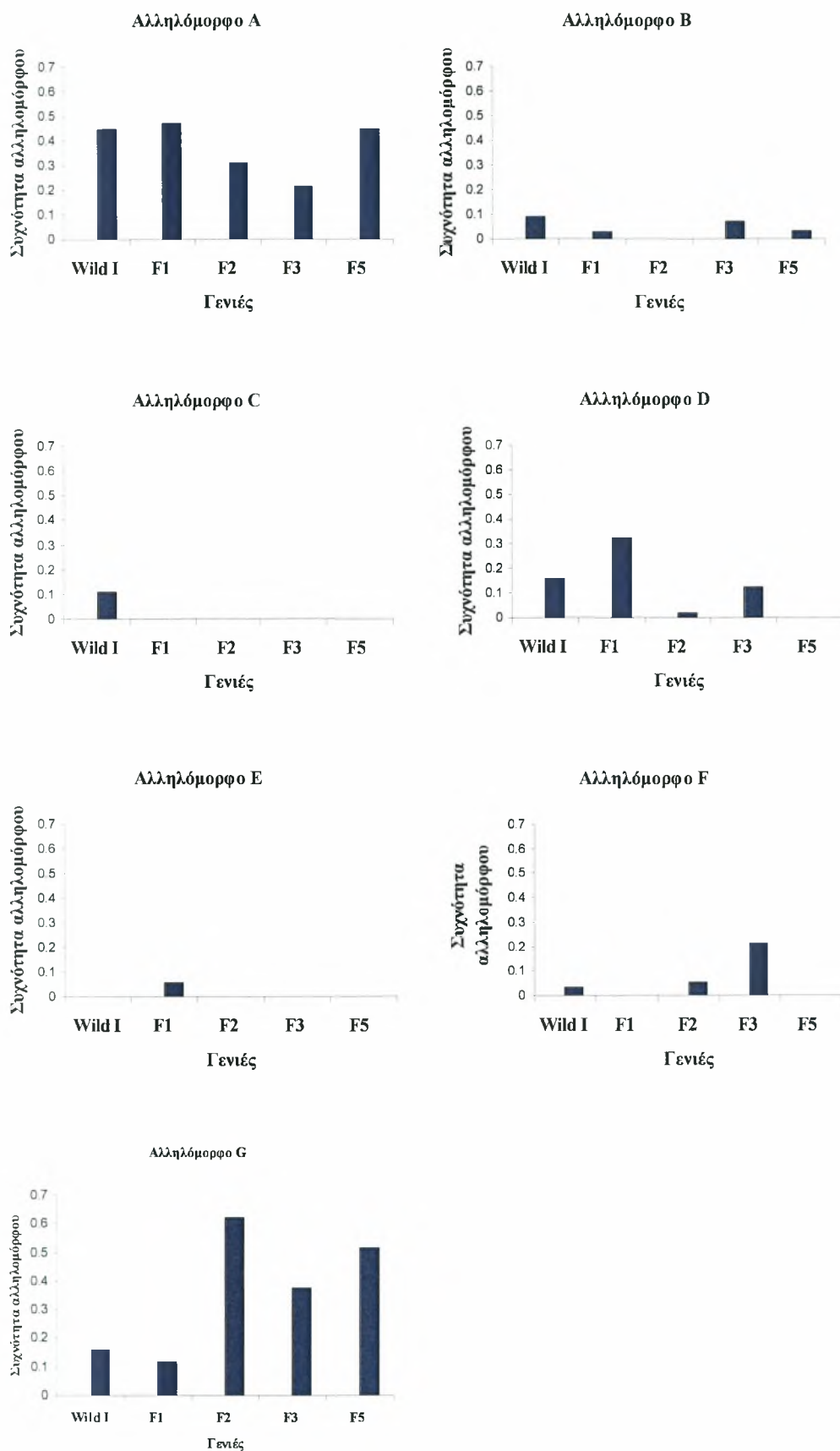
Wild I Israel	
Allele A	0,4464
Allele B	0,0893
Allele C	0,1071
Allele D	0,1607
Allele E	0,0000
Allele F	0,0357
Allele G	0,1607

F1 I Israel	
Allele A	0,4706
Allele B	0,0294
Allele C	0,0000
Allele D	0,3235
Allele E	0,0588
Allele F	0,0000
Allele G	0,1176

F2 I Israel	
Allele A	0,3103
Allele B	0,0000
Allele C	0,0000
Allele D	0,0172
Allele E	0,0000
Allele F	0,0517
Allele G	0,6207

F3 I Israel	
Allele A	0,2143
Allele B	0,0714
Allele C	0,0000
Allele D	0,1250
Allele E	0,0000
Allele F	0,2143
Allele G	0,3750

F5 I Israel	
Allele A	0,4500
Allele B	0,0333
Allele C	0,0000
Allele D	0,0000
Allele E	0,0000
Allele F	0,0000
Allele G	0,5167



Εικόνα 8. Προφίλ αλληλομορφικών συχνοτήτων του μικροδορυφορικού τόπου D84

Πίνακας 3. Αλληλομορφικές συχνότητες του μικροδορυφόρου D64 για κάθε γενιά

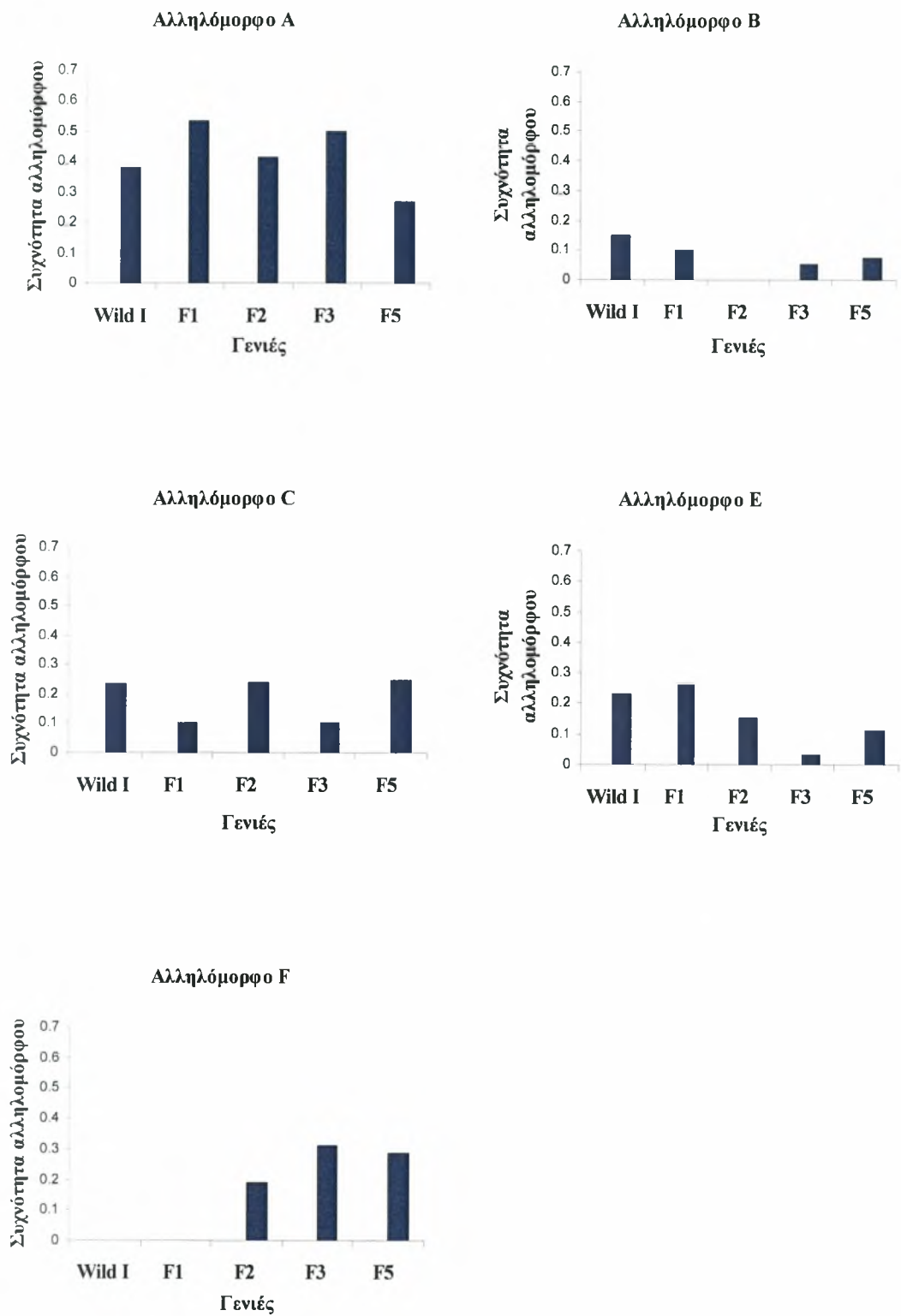
Wild I Israel	
Allele A	0,3833
Allele B	0,1500
Allele C	0,2333
Allele D	0,0000
Allele E	0,2333
Allele F	0,0000

F1 I Israel	
Allele A	0,5333
Allele B	0,1000
Allele C	0,1000
Allele D	0,0000
Allele E	0,2667
Allele F	0,0000

F2 I Israel	
Allele A	0,4138
Allele B	0,0000
Allele C	0,2414
Allele D	0,0000
Allele E	0,1552
Allele F	0,1897

F3 I Israel	
Allele A	0,5000
Allele B	0,0517
Allele C	0,1034
Allele D	0,0000
Allele E	0,0345
Allele F	0,3103

F5 I Israel	
Allele A	0,2692
Allele B	0,0769
Allele C	0,2500
Allele D	0,0000
Allele E	0,1154
Allele F	0,2885



Εικόνα 9. Προφίλ αλληλομορφικών συχνοτήτων του μικροδορυφορικού τόπου D64

Πίνακας 4. Αλληλομορφικές συχνότητες του μικροδορυφόρου D38 για κάθε γενιά

Wild I Israel	
Allele A	0,3929
Allele B	0,0357
Allele C	0,3214
Allele D	0,0179
Allele E	0,0000
Allele F	0,0536
Allele G	0,0000
Allele H	0,0000
Allele I	0,0179
Allele J	0,0000
Allele K	0,0000
Allele L	0,0000
Allele M	0,1607

F1 I Israel	
Allele A	0,4000
Allele B	0,0667
Allele C	0,2667
Allele D	0,1667
Allele E	0,0000
Allele F	0,0000
Allele G	0,0000
Allele H	0,0000
Allele I	0,0000
Allele J	0,0000
Allele K	0,0000
Allele L	0,0000
Allele M	0,1000

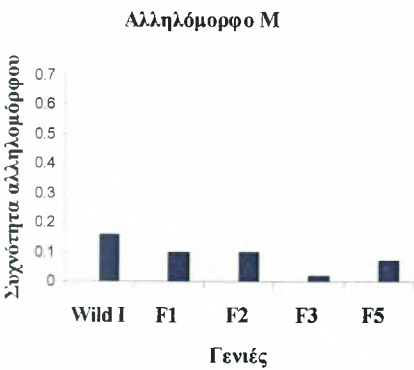
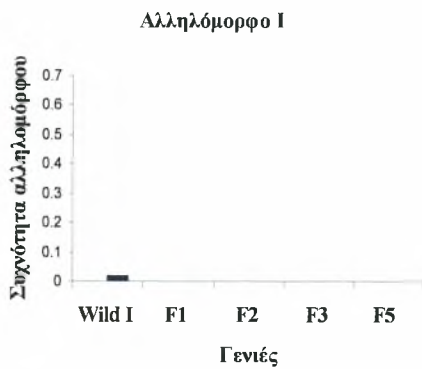
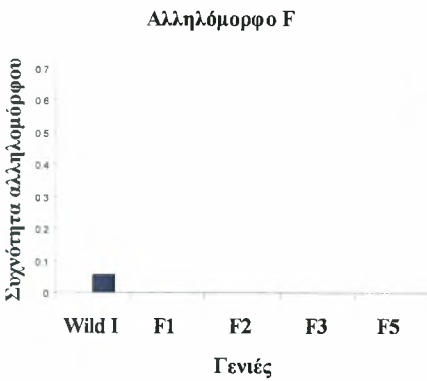
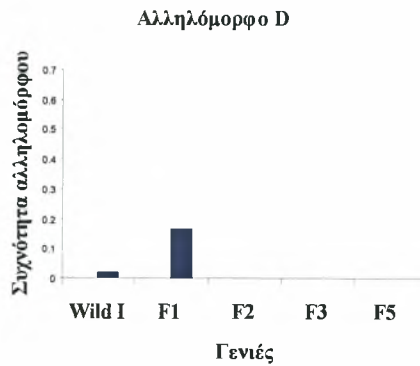
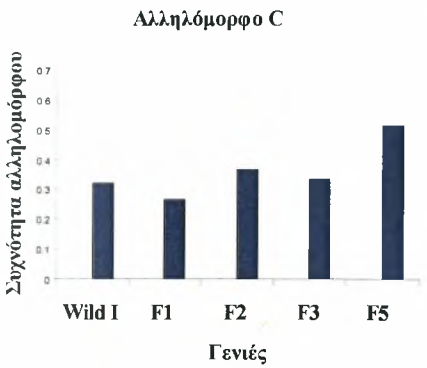
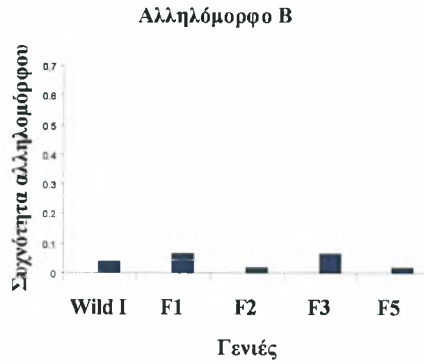
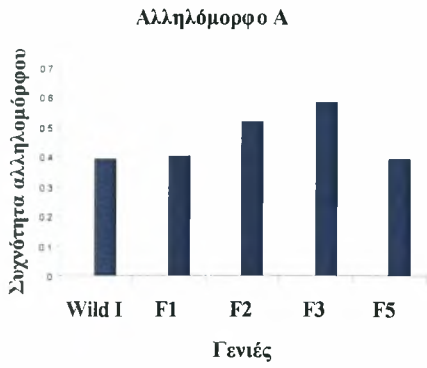
F2 I Israel	
Allele A	0,5167
Allele B	0,0167
Allele C	0,3667
Allele D	0,0000
Allele E	0,0000
Allele F	0,0000
Allele G	0,0000
Allele H	0,0000
Allele I	0,0000
Allele J	0,0000
Allele K	0,0000
Allele L	0,0000
Allele M	0,1000

F3 I Israel

Allele A	0,5833
Allele B	0,0667
Allele C	0,3333
Allele D	0,0000
Allele E	0,0000
Allele F	0,0000
Allele G	0,0000
Allele H	0,0000
Allele I	0,0000
Allele J	0,0000
Allele K	0,0000
Allele L	0,0000
Allele M	0,0167

F5 I Israel

Allele A	0,3929
Allele B	0,0179
Allele C	0,5179
Allele D	0,0000
Allele E	0,0000
Allele F	0,0000
Allele G	0,0000
Allele H	0,0000
Allele I	0,0000
Allele J	0,0000
Allele K	0,0000
Allele L	0,0000
Allele M	0,0714



Εικόνα 10. Προφίλ αλληλομορφικών συχνοτήτων του μικροδορυφορικού τύπου D38

Πίνακας 5. Αλληλομορφικές συχνότητες του μικροδορυφόρου D67 για κάθε γενιά

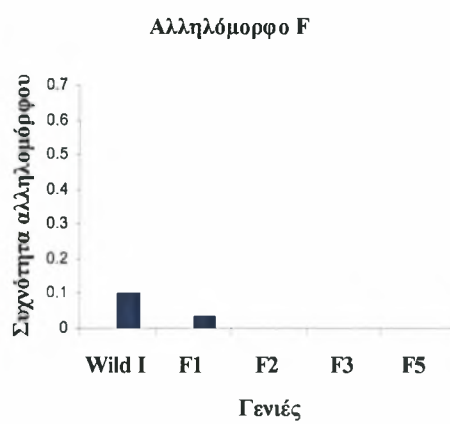
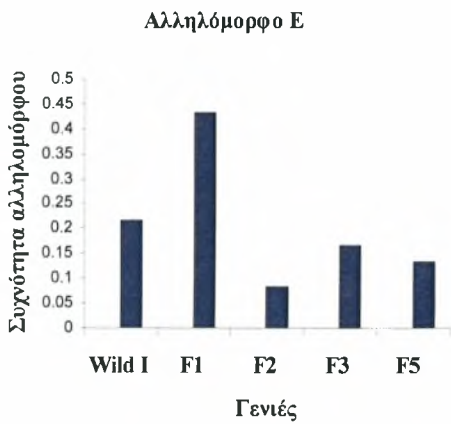
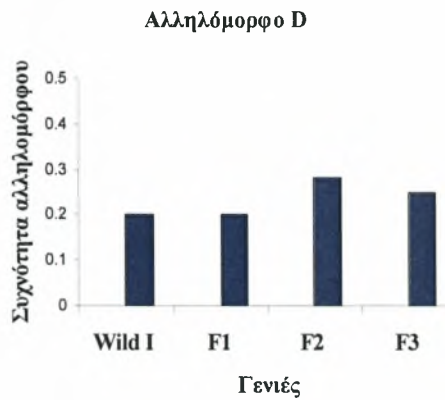
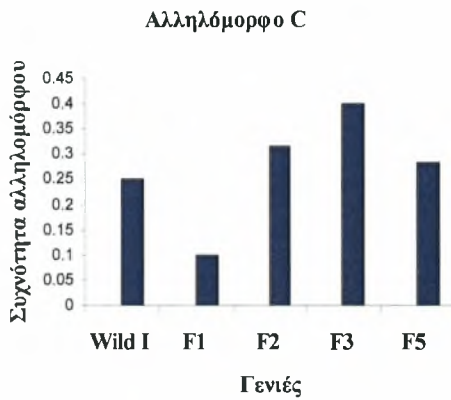
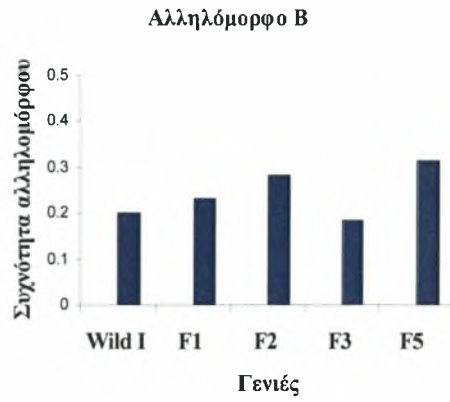
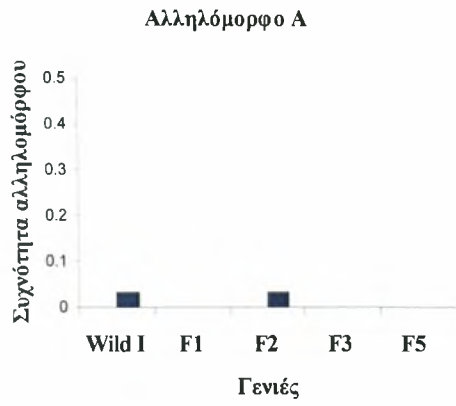
Wild I Israel	
Allele A	0,0333
Allele B	0,2000
Allele C	0,2500
Allele D	0,2000
Allele E	0,2167
Allele F	0,1000

F1 I Israel	
Allele A	0,0000
Allele B	0,2333
Allele C	0,1000
Allele D	0,2000
Allele E	0,4333
Allele F	0,0333

F2 I Israel	
Allele A	0,0333
Allele B	0,2833
Allele C	0,3167
Allele D	0,2833
Allele E	0,0833
Allele F	0,0000

F3 I Israel	
Allele A	0,0000
Allele B	0,1833
Allele C	0,4000
Allele D	0,2500
Allele E	0,1667
Allele F	0,0000

F5 I Israel	
Allele A	0,0000
Allele B	0,3167
Allele C	0,2833
Allele D	0,2667
Allele E	0,1333
Allele F	0,0000



Εικόνα 11. Προφίλ αλληλομορφικών συχνοτήτων του μικροδορυφορικού τόπου D67

Πίνακας 6. Αλληλομορφικές συχνότητες του μικροδορυφόρου ΒοΑΤ6 για κάθε γενιά

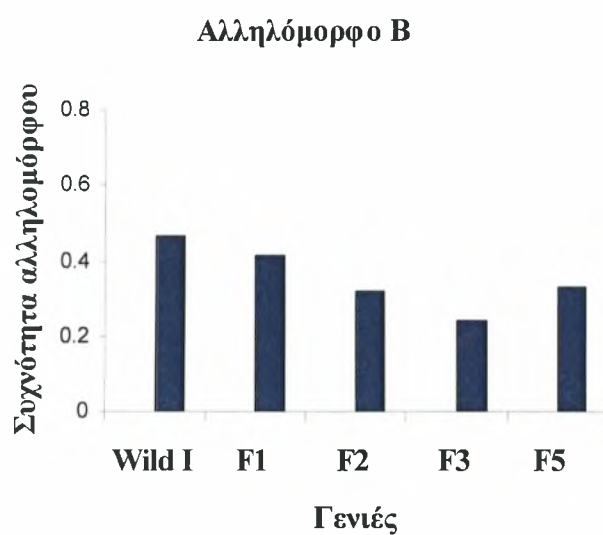
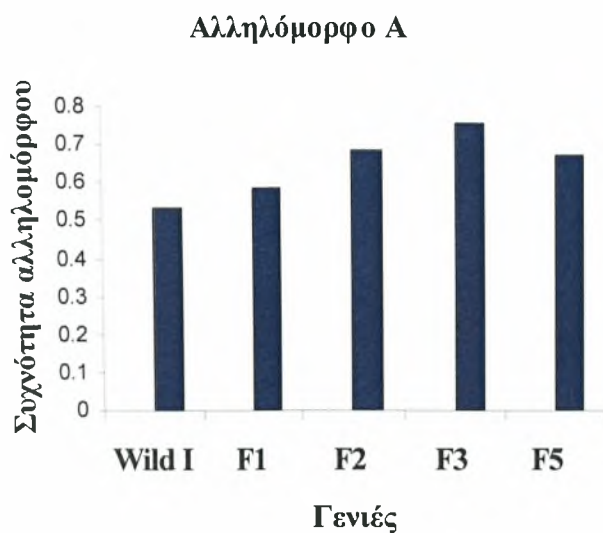
Wild 1 Israel	
Allele A	0,5333
Allele B	0,4667

F1 I Israel	
Allele A	0,5882
Allele B	0,4118

F2 I Israel	
Allele A	0,6833
Allele B	0,3167

F3 I Israel	
Allele A	0,7586
Allele B	0,2414

F5 I Israel	
Allele A	0,6724
Allele B	0,3276



Εικόνα 12. Προφίλ αλληλομορφικών συχνοτήτων του μικροδορυφορικού τόπου ΒοΑΤ6

Πίνακας 7. Αλληλομορφικές συχνότητες του μικροδορυφόρου D86 για κάθε γενιά

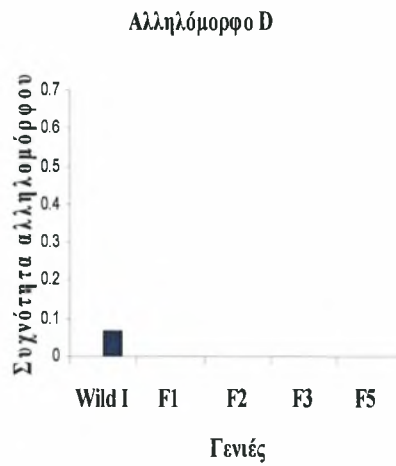
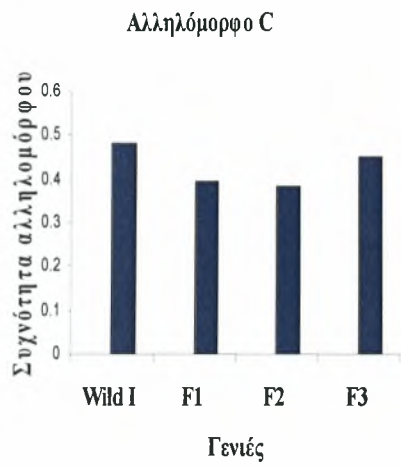
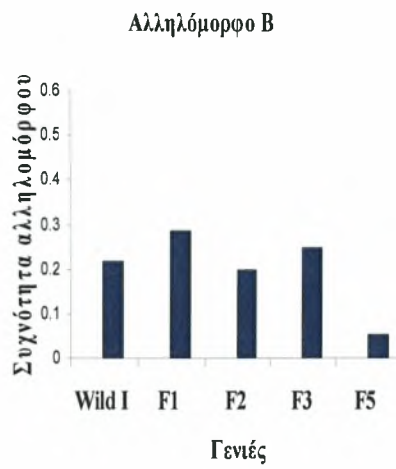
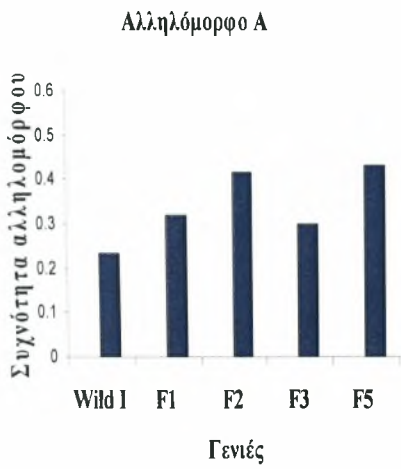
Wild I Israel	
Allele A	0,2333
Allele B	0,2167
Allele C	0,4833
Allele D	0,0667

F1 I Israel	
Allele A	0,3214
Allele B	0,2857
Allele C	0,3929
Allele D	0,0000

F2 I Israel	
Allele A	0,4167
Allele B	0,2000
Allele C	0,3833
Allele D	0,0000

F3 I Israel	
Allele A	0,3000
Allele B	0,2500
Allele C	0,4500
Allele D	0,0000

F5 I Israel	
Allele A	0,4310
Allele B	0,0517
Allele C	0,5172
Allele D	0,0000



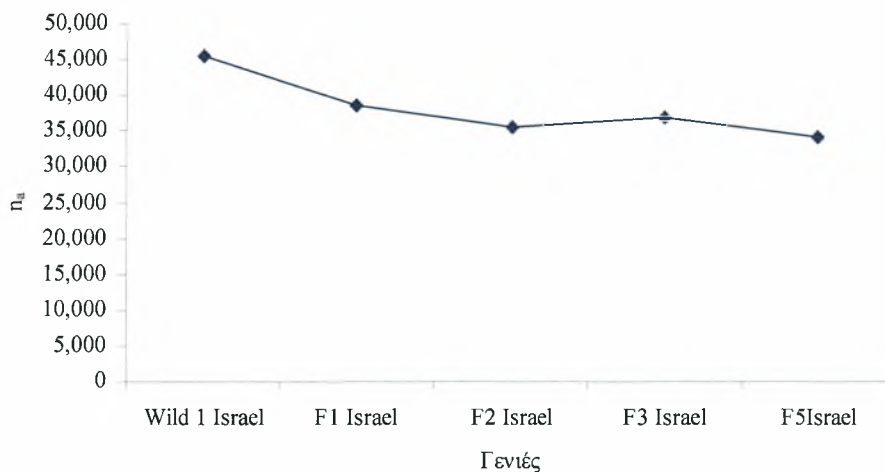
Εικόνα 13. Προφίλ αλληλομορφικών συχνοτήτων του μικροδορυφορικού τόπου D86

Εκτίμηση του πολυμορφισμού: Υπολογίστηκε με τη βοήθεια του προγράμματος POPGENE ως συνάρτηση του πραγματικού αριθμού αλληλομόρφων (n_a), του δραστικού αριθμού αλληλομόρφων (n_e) και της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας (Obs.H.) (Πίνακας 8).

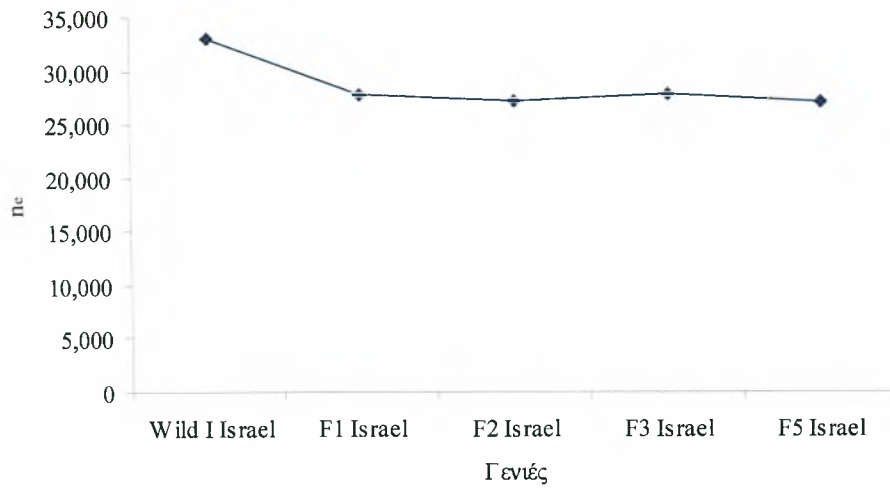
Πίνακας 8. Εκτίμηση του πολυμορφισμού των δειγμάτων

	n_a	n_e	Obs.H.
Wild I Israel	4,5714	3,3031	0,6204
F1 Israel	3,8571	2,7790	0,6038
F2 Israel	3,5714	2,7287	0,6921
F3 Israel	3,7143	2,8086	0,6097
F5 Israel	3,4286	2,7235	0,5718

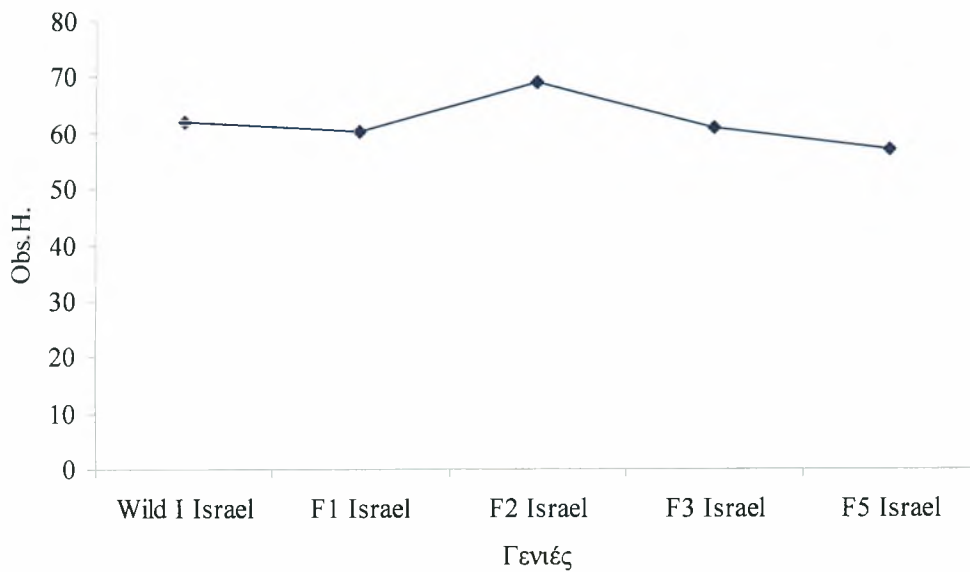
Πραγματικός αριθμός αλληλομόρφων (n_a), , δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (n_e), παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (Obs.H.)



Εικόνα 14. Ο πολυμορφισμός απεικονίζεται ως συνάρτηση του πραγματικού αριθμού αλληλομόρφων



Εικόνα 15. Ο πολυμορφισμός απεικονίζεται ως συνάρτηση του δραστικού αριθμού αλληλομόρφων



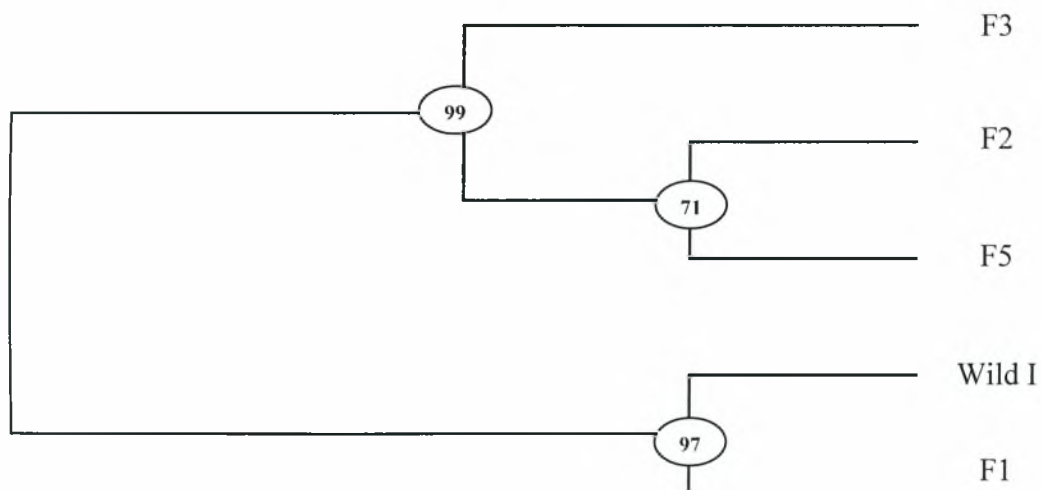
Εικόνα 16. Ο πολυμορφισμός απεικονίζεται ως συνάρτηση της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας

Γενετικές αποστάσεις: Έγινε ο υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων κατά Nei (1972).

Πίνακας 9. Μετρήσεις των γενετικών αποστάσεων σύμφωνα με το Nei (1972)

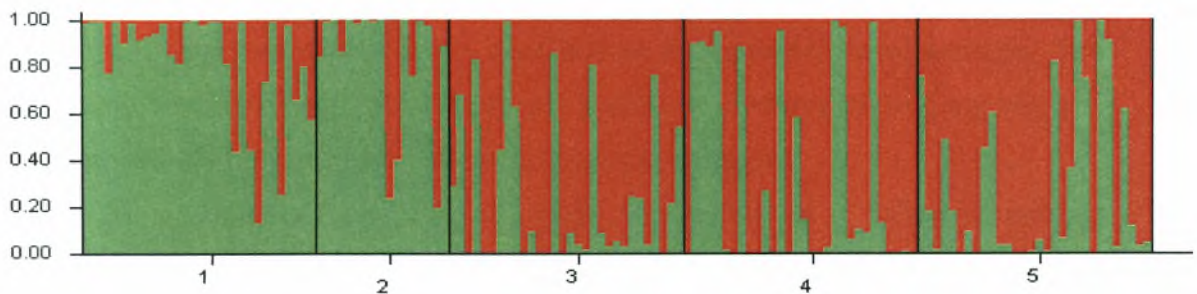
Pop ID	Wild I	F1	F2	F3	F5
Wild I	*				
F1	0,0507	*			
F2	0,1110	0,1772	*		
F3	0,1214	0,1660	0,0463	*	
F5	0,0964	0,1697	0,0319	0,0806	*

Οι αλληλομορφικές συχνότητες που υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του προγράμματος POPGENE χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή ενός δενδρογράμματος UPGMA (Εικόνα 17). Η τοπολογία του δενδρογράμματος επιβεβαιώνεται από τις υψηλές τιμές bootstrap. Παρατηρούμε ομαδοποίηση των 2 πρώτων γενιών (Wild I, F1) και των 3 τελευταίων (F2, F3, F5).



Εικόνα 17. Δενδρογράμμα UPGMA βασισμένο στις αλληλομορφικές συχνότητες των 5 γενιών

Ανάλυση STRUCTURE: Έγινε εκτίμηση της δομής του πληθυσμού για όλες τις γενιές με βάση τη διακύμανση των αλληλομορφικών συχνοτήτων. Παρατηρούμε πως στα άτομα των 2 πρώτων γενιών η πιθανότητα του να ανήκουν στον ένα πληθυσμό που απεικονίζεται με πράσινο είναι πολύ μεγάλη. Ενώ στις 3 επόμενες γενιές είναι αυξημένη η πιθανότητα να ανήκουν στον άλλο πληθυσμό που απεικονίζεται με κόκκινο χρώμα.



Εικόνα 18. *Ανάλυση STRUCTURE:* εκτίμηση της δομής του πληθυσμού για όλα τα δείγματα βάση της διακύμανσης των αλληλομορφικών συχνοτήτων. Κάθε άτομο απεικονίζεται με μία κάθετη γραμμή κατανέμεται σε $K=2$ χρωματικούς πληθυσμούς. 1 (Wild I), 2 (F1), 3 (F2), 4 (F3), 5 (F5)

Συζήτηση

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, αποτελεί το κυριότερο παράσιτο της ελαιοκαλλιέργειας. Το έντομο ζει σε όλα τα στάδια της ζωής του στον καρπό της ελιάς και μπορεί να προκαλέσει υποβάθμιση του καρπού καθιστώντας τις ελιές ακατάλληλες για τροφή και για την παραγωγή λαδιού. Είναι γνωστό ότι ο κύριος τρόπος ελέγχου του εντόμου παραμένει η χρήση των χημικών εντομοκτόνων, ενώ υπάρχει ένα έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων μεθόδων φιλικών προς το περιβάλλον. Μια τέτοια μέθοδος είναι και η Τεχνική Στείρων Εντόμων (SIT), η οποία έχει χρησιμοποιηθεί και στο παρελθόν με περιορισμένη όμως επιτυχία. Τον τελευταίο καιρό γίνονται προσπάθειες στο Ισραήλ να αναπτυχθεί ένας ισχυρός και ανταγωνιστικός εργαστηριακός πληθυσμός μαζικής εκτροφής.

Η παρούσα εργασία είχε ως στόχο να καθοριστεί ο βαθμός γενετικής διαφοροποίησης του εργαστηριακού στελέχους σε σχέση με τον ιδρυτικό πληθυσμό με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών.

Αναλύθηκαν 30 άτομα από τις ακόλουθες εργαστηριακές γενιές Wild I, F2, F3 και F5 και 17 άτομα από την F1, με τη χρήση 7 μικροδορυφορικών δεικτών (Augustinos et al. 2002, 2005).

Στους περισσότερους μικροδορυφόρους που χρησιμοποιήθηκαν παρατηρήθηκε μια μείωση στις συχνότητες κάποιων αλληλομόρφων, ενώ κάποια φαίνεται να εξαφανίζονται.

Ο βαθμός πολυμορφισμού κάθε γενιάς υπολογίστηκε με τη βοήθεια του πραγματικού αριθμού αλληλομόρφων, ο οποίος είναι μία ένδειξη πολυμορφισμού, αλλά επηρεάζεται από το μέγεθος του δείγματος όσο και από τη σχετική συχνότητα των αλληλομόρφων στο δείγμα. Συνεπώς ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων που λαμβάνει υπόψη του το μέγεθος του δείγματος και τη σχετική συμμετοχή των αλληλομόρφων στο δείγμα, είναι ο καταλληλότερος δείκτης. Σύμφωνα με αυτόν παρατηρείται μια σταδιακή πτώση του πολυμορφισμού από γενιά σε γενιά. Κάτι που επιβεβαιώνεται και από την παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, η οποία επίσης φαίνεται να μειώνεται σταδιακά. Αυτή η παρατηρούμενη σταδιακή μείωση του πολυμορφισμού μπορεί να οφείλεται στη δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης, που είναι αυξημένη λόγω του μικρού αριθμού ατόμων του αποικιοποιημένου στελέχους στο εργαστήριο καθώς και λόγω της προσαρμογής στις εργαστηριακές συνθήκες.

Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με βάση τις διαφορές των γονιδιακών συχνοτήτων. Βρέθηκε πως η γενετική απόσταση μεταξύ των 2 πρώτων γενιών (Wild I και F1) είναι πολύ μικρή ίση με 0,0507 ενώ είναι αυξημένη μεταξύ του ιδρυτικού πληθυσμού (Wild I) και των 3 τελευταίων γενιών και κυμαίνεται από 0,0964 έως 0,1214. Αντίθετα η απόσταση μεταξύ των 3 τελευταίων γενιών (F2, F3, F5) είναι και πάλι μικρή και κυμαίνεται από 0,0806 έως 0,0319. Η ομαδοποίηση των 2 πρώτων γενεών και των 3 τελευταίων φαίνεται και από το δενδρόγραμμα, το οποίο κατασκευάστηκε με βάση τις αλληλομορφικές συχνότητες, και επιβεβαιώνεται από τις υψηλές τιμές bootstrap για του 2 κύριους κλάδους (>90).

Περαιτέρω ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του προγράμματος STRUCTURE, το οποίο μας δίνει την πιθανότητα κάθε ατόμου να ανήκει σε ένα πληθυσμό. Ο αριθμός των πληθυσμών ($K=2$) ορίστηκε με βάση τον αριθμό των υποομάδων που προκύπτουν από το δενδρόγραμμα. Χρησιμοποιήθηκε το no-admixture μοντέλο, με βάση το οποίο κάθε άτομο προέρχεται από ένα από τους K πληθυσμούς. Επιβεβαιώνεται και μέσω αυτού του προγράμματος πως τα άτομα από τις γενιές Wild I και F1 έχουν αυξημένη πιθανότητα να ανήκουν σε ένα πληθυσμό (ομάδα) και οι γενιές F2, F3 και F5 σε ένα άλλο πληθυσμό.

Ορισμένα αλληλόμορφα κάποιων γενετικών τόπων παρουσιάζουν αισθητές διαφορές στις συχνότητες τους από γενιά σε γενιά. Ένα παράδειγμα είναι το αλληλόμορφο F του γενετικού τόπου D67, το οποίο υπάρχει στις 2 πρώτες γενιές και εξαφανίζεται στις 3 τελευταίες, ένα άλλο παράδειγμα αυτή τη φορά δραματικής αύξησης αλληλομόρφου είναι το αλληλόμορφο G του D84. Οι σταδιακές αλλαγές που φαίνεται πως συμβαίνουν από γενιά σε γενιά στο αποικιοποιημένο εργαστηριακό στέλεχος οφείλονται κυρίως στη δράση της επιλογής, η οποία μπορεί να μεταβάλλει την ποικιλότητα ενός πληθυσμού αυξάνοντας την συχνότητα των ατόμων που είναι καλύτερα προσαρμοσμένα στο νέο περιβάλλον (θερμοκρασία, τροφή, υγρασία κ.α.). Τα αλληλόμορφα στα οποία παρατηρούνται δραματικές αλλαγές, ενδέχεται να συνδέονται με κάποιο γονίδιο το οποίο υφίσταται επιλογική πίεση (hitch-hiking). Η μελέτη αυτή πραγματοποιήθηκε σε μικρό αριθμό γενιών, επομένως αναμένεται πως η μείωση του πολυμορφισμού θα είναι ακόμα πιο έντονη στις επόμενες γενιές. Ένα άλλο φαινόμενο που μπορεί να εξηγήσει αυτές τις αλλαγές είναι και ο μικρός αριθμός ατόμων, λόγω του οποίου θα έχουμε έντονη τη δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης. Αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα την εξαφάνιση κάποιων αλληλομόρφων ή

τη σταθεροποίηση τους και την τάση του πληθυσμού προς την ομοζυγωτία, κάτι που παρατηρήθηκε στα δείγματά μας λόγω της πτώσης της ετεροζυγωτίας.

Τα αποτελέσματα της παρούσας ανάλυσης έχουν μεγάλη σημασία καθώς θα ήταν δυνατόν να καθορίσουμε τον τύπο και τη συχνότητα των εμπλουτισμών που απαιτούνται με σκοπό την διατήρηση του πολυμορφισμού στα επίπεδα του άγριου πληθυσμού και επομένως του επιπέδου αποτελεσματικής σύζευξης με τα άτομα των φυσικών πληθυσμών. Επίσης, θα μπορούμε να αναζητήσουμε περιοχές του γονιδιώματος που σχετίζονται με την προσαρμογή του πληθυσμού στις εργαστηριακές συνθήκες μέσω της σύνδεσής τους με αλληλόμορφα των μικροδορυφορικών γενετικών τόπων. Έτσι, θα έχουμε χρήσιμους μοριακούς δείκτες ελέγχου χαρακτήρων αγρίου πληθυσμού καθώς και επιτυχούς σύζευξης.

Βιβλιογραφία

- Augustinos, A.A., Z. Mamouris, E. Straticopoulos, S. D'Amelio, A. Zacharopoulou, K.D. Mathiopoulos, 2005. Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica* 125: 231-241.
- Augustinos, A.A., E.E. Straticopoulos, A. Zacharopoulou, K.D. Mathiopoulos, 2002. Polymorphic Microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*. *Mol Ecol Notes* 2: 278-280.
- Αλαχιώτης, Σ.Ν., 2007. Εισαγωγή στην εξέλιξη. Εκδοτικός οργανισμός Λιβάνη.
- Beebe T. and Rowe G., 2004. An introduction to molecular ecology. Oxford University Press (1st edition).
- Brown, T.A., 2002. Genomes. Second Edition. BIOS Scientific Publishers Ltd.
- Burt, D.W., D.R. Morrice, A. Sewalem, J. Smith, I.R. Paton, E.J. Smith, J. Bentley and P.M. Hocking, 2003. Preliminary linkage map of the turkey (*Meleagris gallopavo*) based on microsatellite markers. *Animal Genetics* 34: 399-409.
- Dyck, V.A, J. Hendrichs and A.S. Robinson, 2005. Sterile Insect Technique, Principals and practice in area-wide integrated pest management. Springer
- Economopoulos, A.P. and M. Loukas, 1986. ADH allele frequency changes in olive fruit flies shift from olives to artificial larval food and vice versa, effect of temperature. *Entomol Exp Appl* 40:215-221.
- Frankham, R., D.A. Loebel, 1992. Modeling problems in conservation genetics using captive *Drosophila* populations: rapid genetic adaptation to captivity. *Zoo biology* 11:333-342.
- Harding, R.M., A.J Boyce and J.B Clegg, 1992. The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics*, 132: 847–859.
- Hoffmann, A.A., R. Hallas, C. Sinclair and L. Partridge, 2001. Rapid loss of stress resistance in *Drosophila Melanogaster* under adaptation to laboratory culture. *Evolution*, 55(2), pp. 436-438.
- Lee, J.M., S.H. Nahm, Y.M. Kim and B.D. Kim, 2003. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 108:619-27.
- Liu, Z, Tan G, Li P and R.A Dunham, 1999. Transcribed dinucleotide microsatellites and their associated genes from channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 259: 190–194.
- Menotti-Raymond, M., V.A. David, L.A. Lyons, A.A. Schaffer, J.F. Tomlin, M.K. Hutton and S.J. O'Brien, 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57: 9-23.

Metzgar, D., J. Bytof and C. Wills, 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Research* 10: 72-80.

Mohammad, A., 2005. Infestation of olive fruit fly *Bactrocera oleae*, in California and taxonomy of its host trees. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, Vol. 70 No. 4 (135-138).

Morgante, M., M. Hanafey and W. Powell, 2002. Microsatellites are preferentially associate with non repetitive DNA in plant genomes. *Nature Genetics* 30: 194-200.

Moxon, E.R., P.B. Rainey, M.A. Nowak and R.E. Lenski, 1994. Adaptive evolution of highly mutable loci in pathogenic bacteria. *Current Biology*. 4: 24-33.

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

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

Schug, M.D., KA Wetterstrand, M.S. Gaudette, 1998. The distribution and frequency of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Ecology*, 7: 57–70.

Shimoda, N., E.W. Knapik, J. Ziniti, C. Sim, E. Yamada, S. Kaplan, D. Jackson, F. de Sauvage, H. Jacob and M.C. Fishman. 1999. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics*, 58: 219-232.

Tachida, H and M. Iizuka, 1992. Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics*, 131: 471–478.

Wang, Z, J.L. Weber, G. Zhong and S.D. Tanksley, 1994. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 88: 1–6.

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

Yeh, F.C., T. Boyle, Y. Rongcai, Z. Ye and J.M. Xiyan, 1999. POPGENE VERSION 1.31 Microshoft Window-based Freeware for Population Genetic Analysis. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.

Zane, L., L. Bargelloni and T. Patarnello, 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.

Zheng, L., F.H. Collins, V. Kumar and F.C. Kafatos, 1993. A detailed genetic map for the X chromosome of the Malaria vector, *Anopheles gambiae*. *Science* 261: 605-608.

<http://clubs.pathfinder.gr/elia/51418>

http://www.eurane.gr/alter-agro/pdf/study1_gr.pdf

http://www.eurane.gr/alter-agro/pdf/studv1_gr.pdf

http://users.sch.gr/geioanni/sel-geoponos/geoponos_3.htm

<http://www.viorvl.gr/dakos.html>

<http://www.wikipedia.org/>