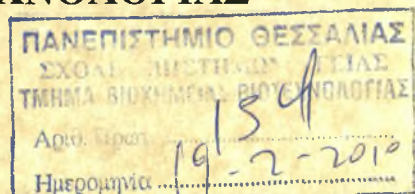




ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΣ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΩΝ

ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΤΗ ΜΥΓΑ ΤΗΣ ΚΕΡΑΣΙΑΣ, *RHAGOLETIS CERASI*



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΑΥΓΟΥΣΤΙΝΟΣ ΑΝΤΩΝΗΣ

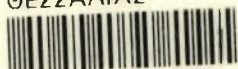
ΛΑΡΙΣΑ 2010



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

Αριθ. Εισ.: 8158/1
Ημερ. Εισ.: 20-04-2010
Δωρεά: _____
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ
2010
ΑΣΗ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087097

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Αυγουστίνος Αντώνης



Διδάσκων με το ΠΔ 407/80

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

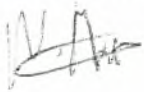
Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος



Αναπληρωτής καθηγητής

Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Παπαδόπουλος Νικόλαος



Αναπληρωτής καθηγητής

Τμήμα Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής
και Αγροτικού Περιβάλλοντος
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Πρόλογος

Με το πέρας της πτυχιακής αυτής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτον από όλους τον καθηγητή μου, και επιβλέποντα της πτυχιακής μου κ. Αυγουστίνο Αντώνη για την ανάθεση του θέματος της εργασίας μου, καθώς επίσης και για την συνεχή καθοδήγηση και την μεγάλη βοήθεια που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια της (τόσο στο εργαστηριακό τμήμα της όσο και την συγγραφή της).

Ακόμα ευχαριστώ τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τους καθηγητές Ματθιόπουλο Κώστα και Παπαδόπουλο Νικόλαο για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την διόρθωση και βελτιστοποίηση της έντυπης εικόνας της πτυχιακής μου εργασίας. Απαραίτητο θεωρώ, να ευχαριστήσω και την κ. Ζαχαροπούλου Αντιγόνη, καθηγήτρια Μοριακής Γενετικής του τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Πατρών για την απεριόριστη πρόσβαση στο χώρο και στον εξοπλισμό του εργαστηρίου Γενετικής Βιολογίας Κυττάρου και Ανάπτυξης που μας επέτρεψε καθώς και για τις πολύτιμες συμβουλές της.

Ένας πολύ σημαντικός άνθρωπος που θα ήθελα να ευχαριστήσω είναι η πολύ καλή μου φίλη Λογκόρη Μαρία για την συνεχή της συμπαράσταση καθ'όλη την διάρκεια της πτυχιακής μου εργασίας, την παρέα της στις πολλές ώρες στο εργαστήριο και τις διορθωτικές παρεμβάσεις της κατά την συγγραφή της πτυχιακής μου εργασίας .

Δεν πρέπει να ξεχάσω τους φίλους μου και την οικογένεια μου για την βοήθεια που μου έδωσαν σε κάθε δύσκολη στιγμή της φοιτητικής μου σταδιοδρομίας.

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	5
1.1	Η μύγα της κερασιάς (<i>Rhagoletis cerasi</i>).....	5
1.1.1	Συστηματική κατάταξη.....	5
1.1.2	Μορφολογία του εντόμου.....	5
1.1.3	Ο Βιολογικός κύκλος.....	6
1.1.4	Γεωγραφική εξάπλωση του είδους	7
1.1.5	Οικονομική σημασία	7
1.1.6	Έλεγχος-Καταπολέμηση.....	8
1.1.7	Γενετική του εντόμου	8
1.2	Πληθυσμιακή ανάλυση	10
1.2.1	Σημασία πληθυσμιακών μελετών	10
1.2.2	Η Έννοια του Πληθυσμού	10
1.2.3	Νόμος Hardy-Weinberg.....	11
1.2.4	Δείκτες που χρησιμοποιούνται στην πληθυσμιακή ανάλυση	11
1.2.5	Μέτρηση γενετικής ποικιλότητας.....	12
1.2.6	Έλεγχος ισορροπίας πληθυσμού.....	12
1.2.7	Άλλες παράμετροι	12
1.3	Εργαλεία για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας.....	13
1.3.1	Βιοχημικοί πολυμορφισμοί.....	13
1.3.2	DNA δείκτες.....	14
1.3.3	Μικροδορυφόροι (SSLPs ή SSRs ή STRs).....	14
1.3.4	Εφαρμογές μικροδορυφόρων.....	15
1.3.5	Χρησιμοποίηση των μικροδορυφορικών δεικτών στην ανάλυση εντόμων οικονομικής σημασίας	16
1.3.6	Τεχνικές ανάπτυξης μικροδορυφορικών δεικτών	17
1.3.7	Διαειδική ενίσχυση (cross-species amplification)	17
1.3.8	Περιορισμοί στη χρήση των μικροδορυφόρων.....	18
1.4	Σκοπός της εργασίας	19
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1	Βιολογικό υλικό	20
2.1.1	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ένα άτομο (single fly).....	21
2.1.2	Καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη.....	21
2.1.3	Κατακρήμνιση DNA με αιθανόλη:.....	22
2.1.4	Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης.....	22
2.1.5	Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης	23
2.2	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)	24
2.2.1	PCR ενίσχυση με χρήση σημασμένων εκκινητών	25
2.2.2	Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδιου:	27
2.2.3	Προετοιμασία PCR προϊόντων για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου 28	
2.2.4	Ηλεκτροφόρηση	28
2.3	Αλληλούχηση Αλληλομόρφων	29
2.3.1	PCR ομόζυγων ατόμων	29
2.3.2	Απομόνωση PCR προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης	29
2.3.3	Ανάλυση αλληλουχίας.....	30
2.4	Επεξεργασία αποτελεσμάτων γενετικής ανάλυσης.....	31
3	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ- ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	34
4	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	35
5	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	48
5.1	Συμπεράσματα	52
6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	54
7	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	59

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Η μύγα της κερασιάς (*Rhagoletis cerasi*)

1.1.1 Συστηματική κατάταξη

Η μύγα της κερασιάς *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae) είναι ο σημαντικότερος εχθρός της καλλιέργειας των κερασιών προκαλώντας σοβαρές ζημιές κάθε έτος (Fimiani, 1989). Είναι ένα δίπτερο, ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην οικογένεια Tephritidae. Στην οικογένεια αυτή ανήκουν επίσης πολλά άλλα είδη μεγάλης οικονομικής σημασίας όπως π.χ. διάφορα είδη των γενών *Bactrocera*, *Ceratitis* και *Anastrepha*. (Ozdem et al., 2005).

Η συστηματική κατάταξη του είδους έχει ως εξής:

Ομοταξία:	Έντομα
Τάξη:	Diptera
Οικογένεια:	Tephritidae
Γένος:	<i>Rhagoletis</i>
Είδος:	<i>Rhagoletis cerasi</i>

Στη βιβλιογραφία απαντάται με διάφορα ονόματα, όπως: *Musca cerasi*, *Trypeta signata*, *Urophora cerasorum*, *Urophora liturata*.

1.1.2 Μορφολογία του εντόμου

Το θηλυκό ενήλικο άτομο του *Rhagoletis cerasi* έχει μήκος 3.8-5.3 χιλ, ενώ το αρσενικό 2.9-4 χιλ. Το βασικό χρώμα του σώματος είναι μαύρο, το κεφάλι κίτρινο-καφέ, η άκρη του θώρακα (scutellum) κίτρινη και το υπογάστριο μαυριδερμό, με μήκος 2-2,4 χιλ (Εικόνα 1). Στα θηλυκά τα τελευταία άρθρα της κοιλιάς καταλήγουν σε συσταλτό ωσθήτη (όργανο απόθεσης αυγών, Εικόνα 2^Α). Οι πτέρυγες έχουν το τυπικό σχήμα των εντόμων της οικογένειας. Στη βάση και στο μέσον της πτέρυγας υπάρχει μια μαύρη διαγώνια σκοτεινόχρωμη ζώνη ενώ στην κορυφή της πτέρυγας παρατηρείται μια λωρίδα σε σχήμα V (Εικόνα 1). Τα λευκά αυγά έχουν οξείες άκρες. Η προνύμφη είναι άποδη και ακέφαλη. Η ανεπτυγμένη προνύμφη είναι κιτρινόλευκη με μήκος 4-6 χιλ, ενώ το νυμφικό περίβλημα είναι ανοικτού χρώματος και ωοειδές (Εικόνα 2^Γ και 2^Δ) (Grichanov et al., 2009).

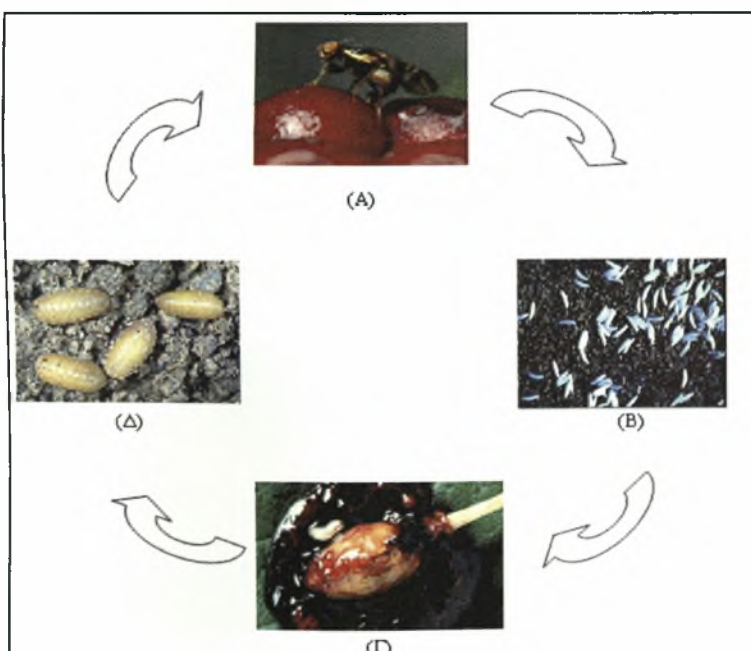


Εικόνα 1: Μορφολογία του ενήλικου αρσενικού της μύγας της κερασιάς *Rhagoletis cerasi*.

1.1.3 Ο Βιολογικός κύκλος

Τα ενήλικα άτομα εμφανίζονται από τέλη Μαΐου έως τον Ιούλιο ανάλογα με το κλίμα της περιοχής. Τα πρώτα αυγά αποτίθενται δέκα έως δεκαπέντε ημέρες από την στιγμή που αρχίζουν να εμφανίζονται τα αναπαραγωγικά ώριμα θηλυκά.

Τα θηλυκά αρχίζουν να αποθέτουν τα αυγά τους στη σάρκα των καρπών (ώριμων ή ημιώριμων), από την 5^η μέχρι τη 10^η ημέρα της ζωής τους. Η περίοδος της εμβρυϊκής ανάπτυξης διαρκεί 5-10 ημέρες. Για την ολοκλήρωση της ανάπτυξης από το αυγό έως τη νύμφη χρειάζονται 10-15 ημέρες. Τα ενήλικα ζουν περίπου 2 μήνες σε συνθήκες θερμοκρασίας 25°C και τα θηλυκά αποθέτουν 200-250 αυγά κατά την διάρκεια της ζωής τους (Katsoyannos, 2008). Τα ενήλικα τρέφονται με ζαχαρούχες (νέκταρ) και αζωτούχες ουσίες ενώ οι προνύμφες τρέφονται από τη σάρκα (μεσοκάρπιο) των κερασιών τα οποία καταστρέφονται. Η ανάπτυξη τους διαρκεί περίπου τριάντα ημέρες. Οι προνύμφες εγκαταλείπουν τον καρπό και πέφτουν στο χώμα όπου και νυμφώνονται (Εικόνα 2). Το *R. cerasi* έχει μια γενιά έτος και εμφανίζει διάπαυση στο στάδιο της νύμφης. Η νυμφική διάπαυση μπορεί να διαρκέσει για περισσότερο από ένα (έως τρία) έτος (Katsoyannos, 1979). Η διάπαυση επηρεάζει τη δυναμική των πληθυσμών της μύγας της κερασιάς καθώς μέρος των νυμφών όπως προαναφέρθηκε διαχειμάζουν στο έδαφος για περισσότερα από ένα έτη και επομένως μπορούν να καθορίσουν την προσβολή των κερασιών σε διάστημα μεγαλύτερο από το ένα έτος.

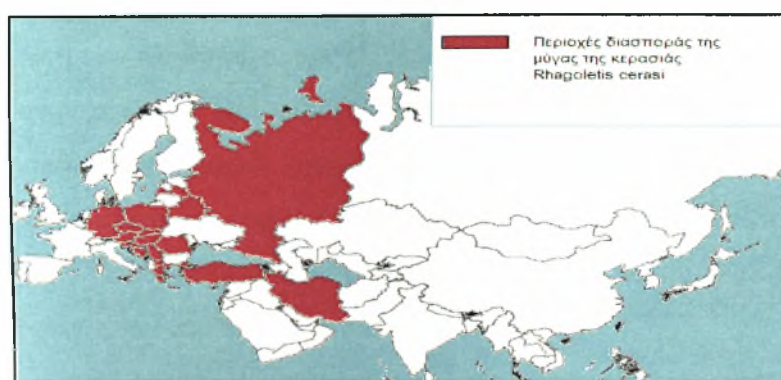


Εικόνα 2: Κύκλος ζωής του εντόμου. Ωοσπόθεση θηλυκού (Α), στάδιο αυγού-εμβρύου (Β), στάδιο προνύμφης (Γ), βομβύκια του εντόμου στο έδαφος (Δ)

1.1.4 Γεωγραφική εξάπλωση του είδους

Οι χαμηλές θερμοκρασίες περιορίζουν την διάδοση του εντόμου και για το λόγο αυτό συναντάται κυρίως στην Κεντρική και Νότια Ευρώπη. Η γεωγραφική εξάπλωσή του ακολουθεί την εξάπλωση του ξενιστή του στην ευρωπαϊκή ήπειρο και την λεκάνη της Μεσογείου καθώς και κάποιες Ασιατικές περιοχές όπως Τουρκία και Ιράν (Fimiani 1989; White and Elson-Harris 1992).

Οι ξενιστές του συγκεκριμένου εντόμου είναι φυτά των οικογενειών Caprifoliaceae (*Lonicera ssp.*) και Rosaceae (*Prunus ssp.*). Κύριος ξενιστής είναι το κεράσι (*Prunus avium*) και το βύσσινο (*P. cerasus*).



Εικόνα 3: Χάρτης διασποράς της μύγας της κερασιάς

1.1.5 Οικονομική σημασία

Η μύγα της κερασιάς προβάλλει τις καλλιέργειες των κερασιών και βύσσινων και μπορεί να προκαλέσει σημαντικές ζημιές που μπορούν να φτάσουν και στην καταστροφή του συνόλου της παραγωγής. Οι οικονομικές ζημιές που προκαλεί το έντομο αυτό ποικίλουν από χρονιά σε χρονιά. Σε χρονιές με υψηλές θερμοκρασίες η ζημιά μπορεί να γίνει αρκετά σημαντική αφού το έντομο έχει πολύ γρήγορη ανάπτυξη. Η προσβολή των καρπών μειώνει σημαντικά την ποιότητα τους (Katsoyannos, 2008). Τα προσβεβλημένα φρούτα (κεράσια και βύσσινα) σκουραίνουν, σαπίζουν και πέφτουν στο έδαφος (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Προσβολή κερασιών από το *R. cerasi*.

1.1.6 Έλεγχος-Καταπολέμηση

Η αντιμετώπιση της μύγας της κερασιάς μέσω καλλιεργητικών μεθόδων περιλαμβάνει (α) την κατεργασία του εδάφους σε βάθος 15-20εκ. το φθινόπωρο ή πολύ νωρίς την άνοιξη για την καταστροφή των νυμφών που είναι στο έδαφος και (β) τη συλλογή των μολυσμένων καρπών. Χημικές μέθοδοι αντιμετώπισης περιλαμβάνουν ψεκασμούς καλύψεως με εντομοκτόνα πριν την έναρξη της ωοαπόθεσης (Savkovskii, 1976).

Σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα οποία εφαρμόζονται στο έδαφος κάτω από τα δέντρα με στόχο τη θανάτωση των προνυμφών πριν τη νύμφωση και ενδεχομένως των νεαρών νυμφών.

Τα εντομοκτόνα, αν και με τη συστηματική τους χρήση μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση των πληθυσμών των επιζήμιων εντόμων, έχουν σοβαρές επιπτώσεις στο περιβάλλον και στην ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων. Σοβαρά προβλήματα στη προσπάθεια ελέγχου επιβλαβών εντόμων σχετίζονται και με την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα και επομένως στη δραματική μείωση της αποτελεσματικότητας των εντομοκτόνων. Αποτέλεσμα αυτών των συνεπειών είναι και οι περιορισμοί στη χρήση τους που στοχεύει η νέα νομοθεσία σε διεθνές επίπεδο.

Οι συνέπειες από τη χρήση των εντομοκτόνων είναι ευρέως γνωστές και αυτό κάνει επιτακτική την ανάγκη αναζήτησης μεθόδων ελέγχου των εντόμων, που να είναι φιλικές προς το περιβάλλον (Robinson, 2002). Σήμερα είναι γενικά αποδεκτό ότι οι μόνες μέθοδοι που εκπληρώνουν αυτές τις προϋποθέσεις είναι εκείνες που στηρίζονται στη γνώση της γενετικής, της βιολογίας και της οικολογίας των επιζήμιων εντόμων. Επιπλέον, αυτές οι μέθοδοι είναι συνήθως ειδικές για κάθε είδος, γεγονός που σχετίζεται άμεσα με την ισορροπία των οικοσυστημάτων.

Σήμερα υπάρχει έντονο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων μεθόδων φιλικών προς το περιβάλλον ή τη βελτίωση υπαρχόντων. Μία τέτοια φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος είναι η τεχνική στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique - SIT) αν και δεν έχει χρησιμοποιηθεί ακόμα στην μύγα της κερασιάς. Σύμφωνα με αυτή την μέθοδο αρσενικά άτομα στερωμένα (μετά από εφαρμογή ραδιενέργειας) απελευθερώνονται στο περιβάλλον με αποτέλεσμα την μείωση των επιτυχών διασταυρώσεων και συνεπώς του πληθυσμού στις επόμενες γενιές. Μειονέκτημα της τεχνικής του στείρου εντόμου όμως αποτελεί, η εξαπόλυση στερωμένων θηλυκών τα οποία παρότι στείρα, εξακολουθούν να προσβάλλουν τους καρπούς μειώνοντας την εμπορική τους αξία. Εδώ έρχεται η γενετική για να επιλύσει το πρόβλημα. Για παράδειγμα στην Μεσογειακή μύγα με την βοήθεια της γενετικής δημιουργήθηκαν στελέχη γενετικού διαχωρισμού του φύλου με αποτέλεσμα να μπορεί να γίνει διαχωρισμός των αρσενι-

κών από τα θηλυκά με βάσει το χρώμα της πούπας, αυξάνοντας έτσι την αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Robinson, 2002).

Γενικά ο ρόλος της γενετικής και πρόσφατα της μοριακής βιολογίας σε μελέτες που σχετίζονται με τον έλεγχο των φυσικών πληθυσμών εντόμων οικονομικής σημασίας παρουσιάζει σημαντική ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια. Αυτό οφείλεται αφενός στη ραγδαία ανάπτυξη της γενετικής και μοριακής τεχνολογίας και αφετέρου στη συνειδητοποίηση η τεχνολογία αυτή θα βοηθήσει σημαντικά στη λήψη αποφάσεων, σχετικές με τον έλεγχο των εντόμων (Robinson & Zacharopoulou, 1996).

1.1.7 Γενετική του εντόμου

Παρά τη μεγάλη οικονομική σημασία του εντόμου και το γεγονός ότι για πολλά χρόνια έχει αποτελέσει στόχο των φιλικών προς το περιβάλλον μεθόδων ελέγχου, λίγα είναι γνωστά σε γενετικό επίπεδο.

Ο καρυότυπος του *R. cerasi* αποτελείται από 5 ζεύγη αυτοσωμικών χρωμοσωμάτων και ένα ζεύγος φυλετικών. Το φυλετικό ζεύγος είναι το ζεύγος 1, ενώ τα αυτοσωμικά τα ζεύγη 2 έως 6, αριθμημένα από το μεγαλύτερο προς το μικρότερο. Το φύλο του εντόμου καθορίζεται χρωμοσωματικά από την παρουσία του Y χρωμοσώματος, με το αρσενικό να 'ναι το ετερογαμετικό φύλο (Bush & Boller, 1977). Από τα 5 ζεύγη αυτοσωμικών, το μακρύτερο χρωμόσωμα 2 είναι μετακεντρικό ενώ τα υπόλοιπα υπομετακεντρικά. Τα μικρότερα 5 και 6 έχουν παραπλήσιο μήκος. Τα φυλετικά χρωμοσώματα X και Y είναι πολύ όμοια σε μέγεθος κάνοντας δύσκολη την διάκριση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών ατόμων. Το χρωμόσωμα X είναι υποακροκεντρικό με ένα πολύ μικρό βραχίονα ενώ το Y είναι ακροκεντρικό και ελαφρώς μακρύτερο από το X (Kounatidis et al., 2008).

Οι μέχρι στιγμής μελέτες σε μοριακό και γενετικό επίπεδο περιορίζονται σε ανάλυση φυσικών πληθυσμών με χρήση αλληλοενζύμων (Schwarz et al., 2003) και πρόσφατα, στην ανάπτυξη κυτταρογενετικών χαρτών από πολυταινικά χρωμοσώματα του είδους (Kounatidis et al., 2008). Μεγάλη έμφαση έχει δοθεί σε μελέτες που αφορούν τη συμβίωση του βακτηρίου *Wolbachia* με το *R. cerasi* (Riegler & Stauffer, 2002), ενός βακτηρίου που φαίνεται ότι θα μπορούσε ίσως να αποτελέσει εργαλείο αντιμετώπισης του *R. cerasi* αφού λόγω της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί στα έντομα εμποδίζει την εκκόλαψη αυγών που προκύπτουν από τη σύζευξη με μολυσμένα αρσενικά από το βακτήριο *Wolbachia* (Bourtzis et al., 1998).

1.2 Πληθυσμιακή ανάλυση

Η ανάλυση των φυσικών πληθυσμών ενός είδους μπορεί να απαντήσει σε πολλά και σημαντικά ζητήματα. Μπορεί να ρίξει φως στην προέλευση ενός είδους και στην πορεία εξάπλωσής του στο χώρο και το χρόνο. Διευκολύνει την διαχείριση πληθυσμών ειδών οικονομικής σημασίας. Ειδικά στον τομέα των παρασιτικών εντόμων, μπορεί να βοηθήσει στο να διαπιστωθεί κατά πόσο υπάρχει γονιδιακή ροή μεταξύ ατόμων που ζουν στην ίδια ή σε διαφορετικές περιοχές, καθώς επίσης και στον έλεγχο φαινομένων μετανάστευσης και εύρεσης των αρχικών περιοχών μόλυνσης σε περιοχές που τα συγκεκριμένα παράσιτα δεν προϋπήρχαν. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη πολυμορφισμού στους πληθυσμούς που αναλύονται και η ανίχνευσή του με κατάλληλες μεθόδους.

1.2.1 Σημασία πληθυσμιακών μελετών

Η οικογένεια Tephritidae των Δίπτερων εντόμων περιλαμβάνει στις τάξεις της είδη με μεγάλη οικονομική σημασία τα οποία αποτελούν εχθρούς πολλών γεωργικών καλλιεργειών, ιδιαίτερα καλλιεργήσιμων φρούτων, σε όλες σχεδόν τις περιοχές του κόσμου. Τα θηλυκά εναποθέτουν τα αυγά τους στο εσωτερικό των φρούτων όπου μεγαλώνουν οι προνύμφες προκαλώντας έτσι τεράστιες καταστροφές στις αγροτικές καλλιέργειες. Ο έλεγχος των φυσικών πληθυσμών των εντόμων οικονομικής σημασίας στηρίζεται σήμερα κυρίως στη χρήση εντομοκτόνων, αν και έχουν σημειωθεί σημαντικά βήματα σε εναλλακτικές μεθόδους, φιλικές προς το περιβάλλον, όπως η τεχνική στείρων εντόμων (Sterile Insect Technique - SIT).

Προκειμένου αυτές οι μέθοδοι να είναι επιτυχείς, απαιτείται η όσο το δυνατόν καλύτερη γνώση για το έντομο, τόσο στο επίπεδο των φυσικών πληθυσμών, όσο και σε μοριακό – γενετικό επίπεδο. Η ανάλυση των φυσικών πληθυσμών των εντόμων της οικογένειας Tephritidae (και κυρίως με τη χρήση μικροδορυφόρων) έχει βοηθήσει στην ανάλυση πρόσφατων εισβολών εντόμων σε νέες περιοχές όπως η εισβολή του δάκου (*Bactrocera oleae*) στην Καλιφόρνια (Zygouridis et al., 2009) και *Bactrocera tryoni* σε περιοχές της Αυστραλίας όπου δεν προϋπήρχε (Gilchrist et al., 2004), στην ανάλυση της προέλευσης των πληθυσμών αυτών, στη μελέτη του βαθμού γονιδιακής ροής μεταξύ πληθυσμών διαφόρων περιοχών, καθώς και στη μελέτη του αριθμού συζεύξεων στη φύση (Bonizzoni et al., 2002; Bonizzoni et al., 2006).

1.2.2 Η Έννοια του Πληθυσμού

Με τον όρο ‘πληθυσμός’ προσδιορίζεται μια ομάδα ατόμων του ίδιου είδους που συνυπάρχουν στο χώρο και στο χρόνο και μπορούν να αναπαράγονται μεταξύ τους (το τελευταίο ι-

σχύει για είδη με φυλετική αναπαραγωγή). Οι φυσικοί πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πολυμορφισμού, η οποία τους δίνει την δυνατότητα να προσαρμόζονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Η ύπαρξη πολυμορφισμού είναι απαραίτητη για την επιβίωση του πληθυσμού και κατ' επέκταση και του είδους, ακόμα και αν αυτές έχουν αρνητικό αντίκτυπο σε κάποια άτομα του πληθυσμού που τις φέρουν. Αυτό δεν σημαίνει ότι όλοι οι φυσικοί πληθυσμοί έχουν τον ίδιο βαθμό πολυμορφισμού. Η γενετική ποικιλότητα διαφέρει από πληθυσμό σε πληθυσμό (Ayala, 1982).

1.2.3 Νόμος Hardy-Weinberg

Ένας πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg όταν οι γενοτυπικές και οι γονιδιακές του συχνότητες παραμένουν σταθερές από γενιά σε γενιά. Η γενοτυπική αυτή ισορροπία που βασίζεται πάνω σε σταθερές γονιδιακές συχνότητες και τυχαίες διασταυρώσεις είναι γνωστή ως νόμος Hardy-Weinberg. Για να ισχύει ο νόμος αυτός πρέπει:

- το μέγεθος του πληθυσμού να είναι άπειρο ή πρακτικά άπειρο (καμία γενετική παρέκκλιση αφού σε μεγάλο πληθυσμό αλλαγές στις συχνότητες των αλληλομόρφων γονιδίων λόγω τύχης είναι ασήμαντες)
- το μέγεθος του πληθυσμού να είναι άπειρο ή πρακτικά άπειρο (καμία γενετική παρέκκλιση αφού σε μεγάλο πληθυσμό αλλαγές στις συχνότητες των αλληλομόρφων γονιδίων λόγω τύχης είναι ασήμαντες)
- τα άτομα να διασταυρώνονται μεταξύ τους τυχαία και ανεξάρτητα, άρα ο πληθυσμός να είναι παμμικτικός
- όλα τα αλληλόμορφα να είναι εξίσου ικανά να περάσουν στους απογόνους μέσω των γαμετών (καμία εκλεκτική πίεση δεν ευνοεί έναν γονότυπο ως προς έναν άλλον) και
- να μην υπάρχει είσοδος νέων γονιδίων από κάποια εξωτερική πηγή ή από μετάλλαξη.

Όμως υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που προκαλούν αλλαγές των γονιδιακών συχνοτήτων στους φυσικούς πληθυσμούς και αποκλίσεις από την ισορροπία όπως είναι: Ομομιξία, Μεταλλάξεις, Γονιδιακή ροή (μετανάστευση), Φυσική επιλογή, Τυχαία γενετική εκτροπή .

1.2.4 Δείκτες που χρησιμοποιούνται στην πληθυσμιακή ανάλυση

Υπάρχουν διάφοροι δείκτες, που σκοπό έχουν να παρουσιάσουν το βαθμό ποικιλότητας, να δείξουν πόσο όμοιοι ή διαφορετικοί είναι οι πληθυσμοί μεταξύ τους, αν βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg και αν εμφανίζεται γονιδιακή ροή μεταξύ τους και σε ποιο βαθμό. Στη συνέχεια παρουσιάζονται κάποιοι από αυτούς τους δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

1.2.5 Μέτρηση γενετικής ποικιλότητας

Είναι φανερό ότι ο βαθμός της γενετικής ποικιλότητας (ή πολυμορφισμός) ενός πληθυσμού πρέπει να εξεταστεί σε μια πληθυσμιακή ανάλυση. Οι βασικοί δείκτες που μελετώνται συνήθως είναι ο πραγματικός αριθμός αλληλομόρφων (n_a), ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (n_e) και η παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_o και H_e αντίστοιχα).

Ο πραγματικός αριθμός αλληλομόρφων (n_a): είναι ο αριθμός των αλληλομόρφων που εμφανίζονται σε ένα πληθυσμό, για κάθε γενετικό τόπο που αναλύεται. Δεν είναι ο πιο κατάλληλος δείκτης πολυμορφισμού γιατί επηρεάζεται από το μέγεθος του δείγματος και επίσης δεν εξετάζει τις σχετικές συχνότητες των διαφόρων αλληλομόρφων.

Ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (n_e): υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο $1/\sum \chi_i^2$, όπου χ_i είναι η συχνότητα του κάθε αλληλομόρφου i στον γενετικό τόπο (Bonizzoni et al., 2000) ή υπολογίζεται από τον τύπο $1/(1-H)$, όπου H είναι η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (Malacrida et al., 1998).

Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (**Obs Het**): αντιστοιχεί στο κλάσμα των παρατηρούμενων ετεροζυγωτών προς το σύνολο των ατόμων, για ένα γενετικό τόπο.

Η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (**Exp Het**): αντιστοιχεί στο κλάσμα των αναμενόμενων ετεροζυγωτών, όπως αυτοί προκύπτουν από τις παρατηρούμενες γονιδιακές συχνότητες και με την προϋπόθεση των τυχαίων διασταυρώσεων, προς το σύνολο των απογόνων, για ένα γενετικό τόπο.

1.2.6 Έλεγχος ισορροπίας πληθυσμού

Το κατά πόσο ένας πληθυσμός βρίσκεται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg ελέγχθηκε με το G^2 κριτήριο, το οποίο είναι μια τροποποιημένη μορφή του χ^2 . Ο δείκτης αυτός υπολογίζει τις αποκλίσεις, όπως αυτές προκύπτουν από τις διαφορές στις συχνότητες των παρατηρούμενων και των θεωρητικά αναμενόμενων γενοτύπων, για κάθε γενετικό τόπο. Συνεπώς αυτό που υπολογίζει είναι η πιθανότητα που έχει ένας πληθυσμός να είναι σε ισορροπία, βάσει των γενοτύπων αυτών. Το σύνθηδες επίπεδο σημαντικότητας που χρησιμοποιείται είναι 5%, που σημαίνει ότι θεωρούμε ότι ένας πληθυσμός είναι σε ισορροπία για ένα γενετικό τόπο αν η πιθανότητα είναι πάνω από 5%.

$$G^2 = \text{παρατηρηθέντα} \cdot \ln \frac{\text{παρατηρηθέντα}}{\text{αναμενόμενα}}$$

1.2.7 Άλλες παράμετροι

Το κατά πόσο τα δείγματα που αναλύθηκαν αποτελούν τμήμα ενός ομογενούς, παμμικτικού πληθυσμού ελέγχθηκε με το τεστ ομογένειας (Homogeneity test), σύμφωνα με το G^2

κριτήριο. Υπολογίζει τις αποκλίσεις, όπως αυτές προκύπτουν από τις διαφορές στις συχνότητες των παρατηρούμενων και των αναμενόμενων γενοτύπων, για κάθε γενετικό τόπο. Το σύνηθες επίπεδο σημαντικότητας που χρησιμοποιείται είναι 5%, που σημαίνει ότι θεωρούμε ότι τα δείγματά μας αποτελούν έναν παμμικτικό πληθυσμό για κάθε γενετικό τόπο αν αυτό το κριτήριο δίνει πιθανότητα πάνω από 5%.

Το κατά πόσο ένας πληθυσμός είναι *παμμικτικός* ελέγχεται επίσης από τις τιμές της γονιδιακής ροής και του F_{st} ($0 < F_{st} < 1$). Ο δείκτης F_{st} (Fixation index) αντιπροσωπεύει το ποσοστό της ετεροζυγωτίας που αποδίδεται σε διαφορές μεταξύ των πληθυσμών και υπολογίζεται από τον τύπο $F_{ST} = 1 - H_S/H_T$, όπου H_S = ετεροζυγωτία εντός πληθυσμού, H_T = ετεροζυγωτία μεταξύ πληθυσμών (Gasperi et al., 1991). Όσο μεγαλύτερη είναι η τιμή του N_m και μικρότερη η τιμή του F_{st} τόσο ενισχύεται η άποψη πως πρόκειται για ένα παμμικτικό πληθυσμό ($N_m = [1/F_{st} - 1]/4$).

Γενετική απόσταση: την οποία όρισε ο Nei ως τη γενετική διαφορά μεταξύ των πληθυσμών, η οποία αντανακλά τις διαφορές των γονιδιακών συχνοτήτων στους πληθυσμούς.

1.3 Εργαλεία για τη μελέτη της γενετικής ποικιλότητας

Μεγάλη ανάπτυξη έχει παρατηρηθεί τα τελευταία χρόνια στις μελέτες της γενετικής ποικιλότητας, και αυτό συμβαίνει εξαιτίας της ανάπτυξης μεθόδων που χρησιμοποιούν πολυμορφισμούς στο επίπεδο του DNA.

1.3.1 Βιοχημικοί πολυμορφισμοί

Είναι η πρώτη κατηγορία γενετικών δεικτών που χρησιμοποιήθηκε, ιδιαίτερα στη δεκαετία του '60. Συγκεκριμένα, η πρώτη προσπάθεια μελέτης της γενετικής ποικιλότητας αφορούσε το σύστημα ABO των ομάδων αίματος (Landsteiner 1900, Nuttall 1904). Η ανάλυση του πολυμορφισμού γίνεται με την τεχνική της ηλεκτροφόρησης ισοενζύμων. Βασίστηκε στην παρατήρηση ότι πολλά ένζυμα παρουσιάζουν ισομορφές, δηλαδή συμπεριφέρονται διαφορετικά κατά την κίνησή τους σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η μελέτη της γενετικής ποικιλότητας με την ηλεκτροφόρηση των ενζύμων καθιερώθηκε μετά το 1960 (Harris, 1966; Lewontin and Hubby, 1966). Τότε επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη εκτεταμένου πολυμορφισμού σε αρκετά ενζυμικά συστήματα. Έκτοτε χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα, ενώ χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα.

1.3.2 DNA δείκτες

Η ανάπτυξη των DNA δεικτών, δηλαδή δεικτών που αποκαλύπτουν τον πολυμορφισμό στο επίπεδο του γενετικού υλικού, αποτέλεσε επανάσταση στην πληθυσμιακή γενετική. Απαραίτητη προϋπόθεση για την ανάπτυξη αυτών των δεικτών ήταν η ανάπτυξη διαφόρων τεχνικών, όπως της χρήσης των ενδονουκλεασών περιορισμού (Meselson & Yuan, 1968), της υβριδοποίησης κατά Southern (Southern, 1975), της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction ή PCR), και γενικά των τεχνικών του ανασυνδυασμένου DNA. Μερικοί από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους είναι οι εξής:

- RFLPs (Random Fragment Length Polymorphisms ή Ποικίλου μήκους περιοριστικά θραύσματα)
- RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA ή Τυχαία ενισχυόμενοι πολυμορφισμοί DNA)
- AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms ή Ενισχυόμενοι πολυμορφισμοί θραυσμάτων DNA)
- SWAPP (Sequencing With Arbitrary Primer Pairs ή Ανάλυση πρωτοδιάταξης με τυχαίους εκκινητές)
- SSCPs (Single Strand Conformation Polymorphisms)
- SSLPs ή SSRs ή STRs (Simple Sequence Length Polymorphisms ή Simple Sequence Repeats ή Simple Tandem Repeats)
- SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms ή Πολυμορφισμοί απλών νουκλεοτιδίων)

1.3.3 Μικροδορυφόροι (SSLPs ή SSRs ή STRs)

Οι μικροδορυφόροι (microsatellites) είναι μικρές, διαδοχικές επανάληψεις νουκλεοτιδικών μοτίβων, των οποίων οι επαναλαμβανόμενες μονάδες έχουν μήκος 1 έως 6 βάσεις. Το σύνηθες μήκος μιας μικροδορυφορικής αλληλουχίας είναι 10-30 βάσεις (Brown, 2002), ενώ σπάνια υπερβαίνουν τις 70 μονάδες επανάληψης (Schlotterer, 1998). Μικροδορυφόροι με ένα μοτίβο επανάληψης ονομάζονται απλοί, ενώ όταν στον ίδιο μικροδορυφόρο υπάρχουν περισσότερα του ενός μοτίβα επανάληψης, τότε ο μικροδορυφόρος αυτός ονομάζεται σύνθετος. Τέλος όταν η μικροδορυφορική αλληλουχία σε κάποιο σημείο της διακόπτεται προσωρινά από κάποια βάση που δεν ανήκει στο συγκεκριμένο μοτίβο επανάληψης, τότε ο μικροδορυφόρος ονομάζεται ατελής ή διακοπτόμενος (Weber, 1990).

Οι μικροδορυφόροι αποτελούν πολύ χρήσιμους δείκτες στη γενετική χαρτογράφηση και την πληθυσμιακή ανάλυση για τους παρακάτω λόγους (Dietrich et al., 1996; Dib et al., 1996; Bruford and Wayne, 1993; Schlotterer and Pemberton, 1994):

- Είναι άφθονοι στα γονιδιώματα όλων των οργανισμών που έχουν μελετηθεί ως σήμερα, ενώ είναι περισσότερο άφθονοι στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, σε σχέση με τους προκαρυωτικούς.
- Είναι υψηλά πολυμορφικοί δείκτες, διότι έχουν πολύ υψηλό ρυθμό μεταλλακτικότητας.
- Κληρονομούνται ως συνυπερέχοντες Μεντελικοί δείκτες, γεγονός που καθιστά εφικτή τη διάκριση αλληλομόρφων πατρικής και μητρικής προέλευσης.
- Είναι διάσπαρτοι στο γονιδίωμα, γεγονός που δίνει τη δυνατότητα μελέτης της εξέλιξης ολόκληρου του γονιδιώματος.
- Η ανάλυσή τους γίνεται με τη χρήση της τεχνικής της PCR, που σημαίνει ότι απαιτείται μόνο μικρή ποσότητα DNA από κάθε άτομο που αναλύεται (ιδιαίτερα χρήσιμο σε αναλύσεις με πολλούς δείκτες). Το γεγονός αυτό προσδίδει μεγάλο πλεονέκτημα όταν το DNA είναι λίγο.
- Η απομόνωσή τους δεν παρουσιάζει ιδιαίτερες δυσκολίες.
- Είναι εύκολη η χαρτογράφησή τους με *in situ* υβριδοποίηση, πράγμα σημαντικό στη φυσική χαρτογράφηση.
- Εμφανίζουν εξελικτική σταθερότητα μεταξύ των ειδών.

1.3.4 Εφαρμογές μικροδορυφόρων

Με την χρήση των μικροδορυφορικών δεικτών διευκολύνεται η ανάλυση του δραστικού μεγέθους και της αναπαραγωγικής ικανότητας ενός πληθυσμού (Matocq, 2004), η ανίχνευση φαινομένων στενωπού (Waldick et al., 2002), ο υπολογισμός των γενετικών αποστάσεων μεταξύ δύο ή περισσότερων πληθυσμών (Goldstein et al., 1995), καθώς και η μελέτη της συμπεριφοράς ζευγαρώματος ειδών με οικονομική σημασία ή προστατευμένων (Estoup et al., 1995; Bonizzoni et al., 2002; Moore and Ball, 2002). Η ενίσχυση κάποιου μικροδορυφόρου ενός είδους και σε άλλα είδη μπορεί να επιτευχθεί για είδη του ίδιου γένους ή πρόσφατα διαχωρισμένων γενών, αν και ορισμένες μελέτες έχουν δείξει την ύπαρξη υψηλά συντηρημένων πλευρικών αλληλουχιών σε είδη με μεγάλες φυλογενετικές αποστάσεις (Schlotterer et al., 1991; FitzSimmons et al., 1995; Rico et al., 1996). Το γεγονός αυτό επέτρεψε την ενίσχυση του ίδιου μικροδορυφορικού τύπου σε είδη που απέχουν εξελικτικά έως και 470 εκατομμύρια χρόνια. Οι μικροδορυφόροι συνεπώς αποτελούν πολύτιμα εργαλεία και για εξελικτικές μελέτες.

Εφαρμογή επίσης βρίσκουν στην εγκληματολογία και στην ανίχνευση πατρότητας. Επειδή είναι άφθονοι και υψηλά πολυμορφικοί, είναι αδύνατο αν γίνει ανάλυση πολλών μικροδορυ-

φόρων σε διαφορετικά άτομα, αυτά να εμφανίσουν το ίδιο ακριβώς πρότυπο. Λειτουργούν συνεπώς ως ένα είδος αποτυπώματος του ατόμου (γενετικό αποτύπωμα).

Πρέπει να αναφερθεί επίσης ότι ακριβώς λόγω του γεγονότος ότι για την ανάλυσή τους, η οποία γίνεται μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης, ελάχιστη ποσότητα DNA είναι αρκετή, οι μικροδορυφόροι χρησιμοποιούνται ευρέως σε περιπτώσεις όπου είτε η ποσότητα (έντομα) είτε η ποιότητα του DNA είναι χαμηλή.

1.3.5 Χρησιμοποίηση των μικροδορυφορικών δεικτών στην ανάλυση εντόμων οικονομικής σημασίας

Σε αρκετά είδη της οικογένειας Tephritidae τα τελευταία χρόνια, μικροδορυφορικοί δείκτες έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί για τη διερεύνηση πολλών σημαντικών ερωτημάτων. Συγκεκριμένα, έχουν χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση πρόσφατων φαινομένων εισβολής (Bonizzoni et al., 2001; Silva et al., 2003; Bonizzoni et al., 2004; Zygourdis et al., 2009), της δομής των φυσικών πληθυσμών διαφόρων ειδών (Bonizzoni et al., 2000; Augustinos et al., 2005; Nardi et al., 2005; Aketarawong et al., 2007) της προέλευσης ετήσιων ξεσπασμάτων τοπικών πληθυσμών (Gilchrist et al., 2004), την ανάλυση του βαθμού της γενετικής διαφοροποίησης φυσικών πληθυσμών που μπορεί να σχετίζεται με επικείμενη ειδογένεση (Michel et al., 2007; Cameron et al., 2009) καθώς και τη διερεύνηση του μοντέλου συζεύξεων στη φύση (Bonizzoni et al., 2002; Kraaijeveld et al., 2005; Bonizzoni et al., 2006; Song et al., 2007). Ακόμα οι μικροδορυφορικοί δείκτες έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή κυτταρογενετικών χαρτών (Stratikopoulos et al., 2008) οι οποίοι θα διευκολύνουν την μελλοντική χαρτογράφηση σημαντικών χαρακτηριστικών, όπως έχει γίνει με την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα που έχουν αναπτύξει κάποια έντομα (Ranson et al., 2004; Wonji et al., 2007). Σε αρκετές περιπτώσεις η γενετική χαρτογράφηση έχει στηριχθεί αποκλειστικά σ' αυτήν την κατηγορία δεικτών (Zheng et al., 1993; Menotti-Raymond et al., 1999; Shimoda et al., 1999; Burt et al., 2003).

Όσον αφορά στα είδη του γένους *Rhagoletis*, έχουν ήδη αναπτυχθεί μικροδορυφορικοί δείκτες για τα είδη *Rhagoletis pomonella* (Velez et al. 2006), πολλοί από τους οποίους χρησιμοποιήθηκαν σε περαιτέρω ανάλυση όπου απέδειξαν την συμπατρική ειδογένεση σε πληθυσμούς του *Rhagoletis pomonella* λόγω επιλογής διαφορετικού ξενιστή από κάθε πληθυσμό (Michel et al., 2007), το *Rhagoletis indifferens* (Maxwell et al. 2009) και πρόσφατα αναπτύχθηκαν και 13 δείκτες για το είδος *Rhagoletis cerasi* (Arthofer et al 2009).

1.3.6 Τεχνικές ανάπτυξης μικροδορυφορικών δεικτών

Υπάρχουν διάφοροι τρόποι με τους οποίους μπορούν να αναπτυχθούν μικροδορυφορικοί δείκτες. Η επιλογή του κατάλληλου έχει να κάνει με τη διαθέσιμη προϋπάρχουσα πληροφορία, το διαθέσιμο χρόνο και τον αριθμό των απαιτούμενων δεικτών. Αυτές οι μέθοδοι συνοψίζονται ως εξής :

1. Δημιουργία και διαλογή γονιδιωματικών βιβλιοθηκών, μέθοδος που περιλαμβάνει: απομόνωση γονιδιωματικού υλικού, επιλογή κατάλληλου φορέα κλωνοποίησης και κατασκευή και διαλογή γονιδιωματικής βιβλιοθήκης (χρονοβόρα και με μεγαλύτερο κόστος διαδικασία).
2. Βιοπληροφορικά: αναζήτηση από αλληλουχίες των βάσεων δεδομένων (αν υπάρχουν κατατεθειμένες αλληλουχίες) και εύρεση των μικροδορυφόρων με τη χρήση κατάλληλων προγραμμάτων.
3. Διαειδική ενίσχυση- cross-species amplification, δηλαδή αξιοποίηση μικροδορυφορικών δεικτών που έχουν απομονωθεί από συγγενικά είδη (αν έχουμε δείκτες από αρκετά κοντινά είδη).

1.3.7 Διαειδική ενίσχυση (cross-species amplification)

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι μικροδορυφορικοί δείκτες εμφανίζουν εξελικτική σταθερότητα, συνεπώς οι δείκτες που αναπτύχθηκαν για ένα είδος μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε συγγενικά του είδη και έτσι είναι δυνατό να αποφευχθεί η *de novo* ανάπτυξη καινούριων δεικτών για κάθε είδος ξεχωριστά. Αυτή είναι η έννοια της διαειδικής ενίσχυσης (cross-species amplification). Η χρήση του πολυμορφισμού των μικροδορυφορικών δεικτών μέσα στο είδος είναι ένα κοινά χρησιμοποιούμενο εργαλείο για την διαπίστωση διαφορών μεταξύ πληθυσμών. Σε αντίθεση με αυτές τις αναλύσεις μικρότερη προσοχή έχει δοθεί στα πρότυπα της εξέλιξης των μικροδορυφόρων μεταξύ των ειδών. Η χρήση διάφορων μικροδορυφορικών δεικτών που αναπτύχθηκαν για ένα είδος σε άλλα είδη εξαρτάται από την διατήρηση των σημείων δέσμευσης του ζεύγους των εκκινητών της αντίδρασης PCR στις μοναδικές περιοχές που περιβάλλουν τους μικροδορυφόρους. Ακόμα η ύπαρξη επαναλαμβανόμενου μοτίβου είναι απαραίτητη ώστε να είναι δυνατή η ύπαρξη διαφορετικών αλληλομόρφων. Αν όλα τα παραπάνω ισχύουν τότε είναι δυνατό να χαρακτηριστεί ως γενετικός δείκτης η συγκεκριμένη περιοχή του γονιδιώματος.

Η διατήρηση των μικροδορυφορικών προτύπων, του αριθμού των επαναλήψεων αλλά και της συντήρησης των περιοχών που τους περιβάλλουν είναι αντιστρόφως ανάλογη με την εξελικτική απόσταση μεταξύ των διάφορων ειδών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα των παραπάνω αποτελεί η μελέτη του Moore όπου από τους 48 δείκτες που είχαν αναπτυχθεί για την αγελάδα

και χρησιμοποιηθεί σε γονιδιωματικό υλικό προβάτου, το 56% έδωσε ενίσχυση από τους οποίους το 42% ήταν πολυμορφικοί. Από τους ίδιους δείκτες κανένας δεν έδωσε ενίσχυση σε γονιδιωματικό υλικό ανθρώπου. Σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι η αγελάδα με το πρόβατο απέκλιναν εξελικτικά πριν από 15-25 εκατομμύρια χρόνια, ενώ αντίστοιχα με τον άνθρωπο πριν από 80-100 εκατομμύρια χρόνια (Moore et al., 1991).

Σήμερα παρατηρείται σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον για την χρήση των μικροδορυφόρων σε μελέτες δια-ειδικής ενίσχυσης σε πληθώρα οργανισμών.

Τα έντομα αποτελούν την πλέον πολυπληθή ομάδα ζωντανών οργανισμών και συγκεντρώνουν μεγάλη προσοχή στην παγκόσμια έρευνα. Μελέτες με την χρήση μικροδορυφόρων και την δια-ειδική τους ενίσχυση έχουν γίνει σε αρκετές οικογένειες της τάξης των Δίπτερων. Τα ποσοστά ενίσχυσης ακόμα και μέσα στα διάφορα γένη μπορούν να ποικίλουν σημαντικά

1.3.8 Περιορισμοί στη χρήση των μικροδορυφόρων

Οι εκκινητές για ένα είδος ακόμα και αν διαφέρουν σε ένα ζεύγος βάσεων από τη πρωτοδιάταξη του άλλου είδους είναι δυνατόν να δώσουν μικρότερη ή καθόλου ενίσχυση. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να αντιμετωπιστεί μέσω της αλλαγής των συνθηκών της αλυσιδωτής αντίδραση πολυμεράσης (PCR) όπως μείωση της θερμοκρασίας αποδιάταξης ή αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου μαγνησίου $MgCl_2$. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε με την σειρά του να οδηγήσει σε δευτερεύοντα προβλήματα όπως την εμφάνιση μη ειδικής δέσμευσης των εκκινητών και συνεπώς την ύπαρξη μεγαλύτερου αριθμού “ψευδό”- αλληλομόρφων. Εναλλακτικά θα μπορούσαν να σχεδιαστούν νέοι εκκινητές με αλλαγές στην πρωτοδιάταξη τους. Εκτός των περιορισμών αυτών η ενίσχυση με PCR ενός προϊόντος σ’ ένα συγγενικό είδος δεν αποτελεί εγγύηση ότι το προϊόν αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν γενετικός δείκτης στις αντίστοιχες μελέτες. Θα πρέπει η αλληλουχία του προϊόντος να φέρει όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που διέπουν τους μικροδορυφόρους, όπως οι επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες και η δυνατότητα πολυμορφισμού (Smith et. al., 2003). Από τα παραπάνω είναι προφανές ότι απαιτείται η ανάλυση της πρωτοδιάταξης κάθε προϊόντος ώστε να μπορεί να χαρακτηριστεί ως μικροδορυφόρος.

1.4 Σκοπός της εργασίας

Η οικογένεια Terphritidae των Δίπτερων περιλαμβάνει πάρα πολλά είδη μεγάλης οικονομικής σημασίας για την καλλιέργεια κυρίως φρούτων. Τα είδη της οικογένειας αυτής έχουν παγκόσμια γεωγραφική εξάπλωση. Η οικονομική ζημιά που προκαλούν ετησίως είναι πολύ σημαντική και γι' αυτό ο έλεγχος των πληθυσμών τους είναι επιτακτικός. Ακόμα η παρατεταμένη χρήση των εντομοκτόνων επηρεάζει σημαντικά όχι μόνο την ισορροπία των οικοσυστημάτων, αλλά έχει και σοβαρές συνέπειες στη μόλυνση του περιβάλλοντος. Ως συνέπεια των επιπτώσεων αυτών υπάρχει σήμερα μια αυξανόμενη τάση σε διεθνές επίπεδο μείωσης των εντομοκτόνων που απελευθερώνονται στο περιβάλλον και αντικατάστασής τους με μεθόδους φιλικές προς το περιβάλλον.

Για να καταστεί η αντιμετώπιση με φιλικά προς το περιβάλλον μέσα εφικτή θα πρέπει να συγκεντρωθούν όσο το δυνατό περισσότερες πληροφορίες σχετικά με τη βιολογία, γενετική και οικολογία των παραπάνω ειδών. Πρόσφατα έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός εργαλείων για την μελέτη της γενετικής των πληθυσμών συμπεριλαμβανομένων και των μικροδορυφορικών δεικτών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μικροδορυφορικών δεικτών για τη μύγα της κερασιάς, *R. cerasi* και η αξιολόγησή τους στην ανάλυση φυσικών πληθυσμών του είδους. Η ανάπτυξη έγινε μέσω δια-ειδικής ενίσχυσης διαθέσιμων μικροδορυφορικών δεικτών από διάφορα συγγενικά είδη.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Βιολογικό υλικό

Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας προήλθε από συλλογή ατόμων φυσικών πληθυσμών της μύγας *Rhagoletis cerasi*. Οι περιοχές δειγματοληψίας φαίνονται στον Πίνακα 1.

Πίνακας 1. Περιοχές συλλογής δειγμάτων

Χώρα	Περιοχή	Αριθμός ατόμων	Συντεταγμένες	Υψόμετρο
Ελλάδα	Καλλιπεύκη (Λάρισα)	20	39°58'0"N 22°27'37"E	1054m
Ελλάδα	Αγία Λάρισας	30	39°42'07"N 22°45'03"E	152m
Ελλάδα	Θεσσαλονίκη	19	40°36'03"N 23°57'07"E	4m
Ελλάδα	Καρδίτσα	20	39°22'00"N 21°55'00"E	127m
Ελλάδα	Καμάρι (Πήλιο)	20	39°34'08"N 22°56'00"E	0m
Ελλάδα	Κερνίτσα (Καλάβρυτα)	30	38°01'08"N 22°06'06"E	592m
Ελλάδα	Χανιά (Κρήτη)	30	35°31'08"N 24°01'01"E	450m
Γερμανία	Stecklenberg (Γερμανία)	32	49°27'00"N 8°40'00"E	265m
Ρωσία	Krasnodar (Κριμαία)	32	45°02'00"N 38°58'00"E	29m

Τα άτομα διατηρήθηκαν σε σωληνάκια τύπου erpendorf στους -70 °C μέχρι την ανάλυση τους.

Οι διαδικασίες συλλογής των ατόμων περιλαμβάνουν: συλλογή από το περιβάλλον και τοποθέτηση σε λεκάνες με άμμο. Έπειτα συλλέγονται οι νύμφες οι οποίες παραμένουν για 2-3

μήνες στους 25°C και στην συνέχεια για 5-8 μήνες στους 3°C. Μετά επανέρχονται στους 25°C όπου και εξέρχονται τα ενήλικα άτομα μετά από 3 εβδομάδες κατά μέσο όρο. Τα ενήλικα τοποθετούνται σε κλουβιά με τροφή ενηλίκων και νερό. Δεδομένης της διάπαυσης, ελέγχθηκε και η δυνατότητα απομόνωσης DNA από το στάδιο της πούπας (υπήρχε αμφιβολία λόγω ύπαρξης υδρολυτικών ενζύμων σε αυτό το στάδιο ανάπτυξης).

2.1.1 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ένα άτομο (single fly)

Η απομόνωση DNA από λίγα άτομα (1-10) γίνεται καλύτερα σε πλαστικά σωληνάκια μικροφυγοκέντρου.

- Η ομογενοποίησή τους πρέπει να γίνεται σε 50-100 μl διαλύματος ομογενοποίησης (Ashburner, 1989).
- Η ομογενοποίηση ενός ατόμου γίνεται σε σωληνάκι του 1,5 ml με τη βοήθεια πλαστικού εμβόλου, σε 100 μl διαλύματος ομογενοποίησης.
- Ακολουθεί προσθήκη 100 μl διαλύματος λύσης και επώαση για 15 min στους 70 °C.
- Ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου.
- Προσθήκη 30 μl διαλύματος οξικού καλίου 8M και επώαση για 30 min στον πάγο.
- Φυγοκέντρωση σε 14.000 g σε θερμοκρασία δωματίου.
- Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο σωληνάκι, προσεκτικά, ώστε να μην διαταραχθεί η λιπιδική επιφάνεια ή το ίζημα.

2.1.2 Καθαρισμός με φαινόλη/χλωροφόρμιο και κατακρήμνιση με αιθανόλη

Για να αυξηθεί η καθαρότητα του DNA, το δείγμα πρέπει να καθαριστεί με φαινόλη και χλωροφόρμιο. Η μέθοδος αυτή εκμεταλλεύεται το γεγονός ότι η απομάκρυνση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται καλύτερα όταν χρησιμοποιούνται δύο οργανικοί διαλύτες αντί ενός. Στη συνέχεια, πρέπει να ακολουθήσει και νέα εκχύλιση με χλωροφόρμιο το οποίο απομακρύνει τα υπολείμματα της φαινόλης. Το πρωτόκολλο καθαρισμού περιλαμβάνει:

- Προσθήκη ίσου όγκου (με αυτόν του υπερκειμένου) μίγματος φαινόλης/χλωροφορμίου. Απαλή ανάδευση (vortex) μέχρι να δημιουργηθεί γαλάκτωμα.
- Φυγοκέντρωση στη μικροφυγόκεντρο για 5 λεπτά, ώστε να δημιουργηθούν δύο φάσεις. Η οργανική που συνήθως βρίσκεται στο κάτω μέρος του σωλήνα και η υδατική στο πάνω. Ανάλογα με τις συνθήκες και την καθαρότητα του δείγματος μπορεί να υπάρξει και μια άσπρη μεσόφαση.

- Ακολουθεί με προσοχή συλλογή της υδατικής φάσης με πιπέτα και μεταφορά της σε καινούργιο σωληνάκι.
- Προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου και απαλή ανάδευση.
- Επανάληψη βημάτων 2 και 3.

2.1.3 Κατακρήμνηση DNA με αιθανόλη:

- Προσθήκη δύο με τρεις όγκους αιθανόλης 95%, ανάδευση και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.
- Φυγοκέντρηση στη μικροφυγόκεντρο για 15 λεπτά. Προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου.
- Προσθήκη δύο - τριών όγκων 70% παγωμένης αιθανόλης και ξέπλυμα του ιζήματος του DNA με απαλές κινήσεις. Φυγοκέντρηση ξανά για 5 λεπτά.
- Προσεκτική απόχυση του υπερκείμενου και απομάκρυνση των τελευταίων σταγόνων αιθανόλης με την πιπέτα. Τα σωληνάκια αφήνονται ανοικτά έως ότου στεγνώσει το ιζήμα του DNA.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση σε 100 μl διαλύματος TE.

Από το DNA που απομονώθηκε από το κάθε άτομο ηλεκτροφορείται ένα μικρό μέρος (5μl), με σκοπό την εκτίμηση της ποσότητας και της ποιότητάς του. Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % παρουσία του μάρτυρα μοριακού βάρους (Gene Ruller DNA Ladder mix).

2.1.4 Παρασκευή του πηκτώματος αγαρόζης

- Σε 100 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης (0,5X TBE) διαλύεται με θέρμανση στους 100 οC η αντίστοιχη ποσότητα αγαρόζης (1 gr).
- Στο διάλυμα προστίθεται βρωμιούχο αιθίδιο σε τελική συγκέντρωση 1μg/ml.
- Όταν η θερμοκρασία του διαλύματος κατέβει στους 50 οC, το διάλυμα τοποθετείται στα ειδικά εκμαγεία ηλεκτροφόρησης.
- Πριν το διάλυμα πήξει, τοποθετούνται σε αυτό τα κτενάκια ηλεκτροφόρησης, τα οποία θα επιτρέψουν το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης του DNA στο πήκτωμα (πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης), όταν το πήκτωμα στερεοποιηθεί.
- Το πήκτωμα αφήνεται να πήξει καλά για τουλάχιστον 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- Στα δείγματα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής (loading dye A), το οποίο περιέχει και γλυκερόλη. Το διάλυμα αυτό επιτρέπει στο DNA να τοποθετηθεί στα πηγαδάκια και να

μην διαχυθεί στο διάλυμα της ηλεκτροφόρησης, ενώ η χρωστική επιτρέπει την παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης.

- Σε ένα από τα πηγαδάκια τοποθετείται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους (π.χ. λDNA που έχει πεφθεί με τα ένζυμα περιορισμού HindIII/EcoRI και δίνει ποικίλα τμήματα DNA γνωστών μεγεθών).
- Το πήκτωμα τοποθετείται στις ειδικές οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης, οι οποίες γεμίζονται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0,5 x TBE.
- Οι παράμετροι της ηλεκτροφόρησης ρυθμίζονται ως εξής: η τάση στα 100V περίπου και το ρεύμα στα 70 mA περίπου.

2.1.5 Ηλεκτροφόρηση γονιδιωματικού DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Μικρή ποσότητα του DNA ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, προκειμένου να καθοριστεί η ποιότητά και η ποσότητά του. Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση DNA μορίων (Sambrook et al., 1989). Μόρια DNA μεγέθους 200 bp έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όταν ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται στα άκρα του πηκτώματος, το DNA που είναι αρνητικά φορτισμένο σε ουδέτερο pH, κινείται προς την άνοδο με ταχύτητα αντιστρόφως ανάλογη του λογάριθμου του μοριακού του βάρους.

Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA εξαρτάται επίσης και από τη συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 .

Πίνακας 2. Αντιστοιχία μεταξύ της συγκέντρωσης αγαρόζης στο πήκτωμα και του μεγέθους των τμημάτων DNA που μπορούν να αναλυθούν.

Ποσοστό αγαρόζης (% w/v)	Μέγεθος DNA (bp)
0,3	60-5
0,6	20-1
0,7	10-0,8
0,9	7-0,5
1,2	6-0,4
1,5	4-0,2
2,0	3-0,1

Το DNA γίνεται ορατό σε υπεριώδες φως, με τη βοήθεια βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο δεσμεύεται στη διπλή έλικα του DNA.

Η ποσοτικοποίηση βασίζεται στην εκτίμηση του φθορισμού που εκπέμπεται από τα μόρια του βρωμιούχου αιθιδίου κάτω από υπεριώδες φως. Το βρωμιούχο αιθίδιο ενσωματώνεται στο DNA σε ποσότητα ανάλογη με τη συγκέντρωση του DNA. Έτσι, η σύγκριση του φθορισμού που εκπέμπεται από το προς ανάλυση DNA με το φθορισμό γνωστής ποσότητας DNA, μας παρέχει την εκτίμηση της ποσότητας του προς ανάλυση DNA. Με αυτόν τον τρόπο κατ' ελάχιστο 10ng DNA μπορούν να ανιχνευθούν μετά από ηλεκτροφόρηση σε ένα πήκτωμα 1% αγαρόζης που περιέχει 0,5gr βρωμιούχο αιθίδιο /1ml διαλύματος. Με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης μπορεί να εκτιμηθεί επίσης η ποιότητα του DNA, αν δηλαδή αυτό είναι μεγαλομοριακό ή όχι.

2.2 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR)

Η PCR είναι μια ενζυμική μέθοδος σύνθεσης και πολλαπλασιασμού του DNA που μπορεί να ενισχύσει μια αλληλουχία από ένα μόνο μόριο DNA.

Σε μια τυπική αντίδραση PCR, ένα δείγμα DNA αναμιγνύεται με τριφωσφορικά νουκλεοτίδια, τους δυο κατάλληλους εκκινητές (συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια) και μια θερμοσταθερή DNA πολυμεράση σε κατάλληλο διάλυμα. Το δείγμα θερμαίνεται στους 95 °C προκειμένου να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 50-65 °C, ανάλογα με την θερμοκρασία επαναδιάταξης (T_m) των εκκινητών ώστε αυτοί να υβριδοποιηθούν με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72 °C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται για 30 κύκλους, έως ότου συντεθεί αρκετό προϊόν. Η αντίδραση είναι εκθετική και ένα μόριο DNA δίνει μετά από 30 επαναλήψεις της αντίδρασης περίπου 109 μόρια DNA. Μετά το τέλος των κύκλων ακολουθεί η αντίδραση τελικής επέκτασης αφήνοντας το δείγμα στους 72 °C για 15-30 min. Ακολουθεί πίνακας με τη σύσταση της PCR (για μία αντίδραση) που χρησιμοποιήσαμε, καθώς και το πρόγραμμα που ρυθμίσαμε την PCR συσκευή να εκτελέσει.

Σύσταση PCR για μία αντίδραση τελικού όγκου 10 μ l.

DNA 10 ng/ μ l	1 μ l
10X PCR buffer:	1 μ l
MgCl ₂ (25mM)	0,6 μ l
Εκκινητής F (10 μ M):	1 μ l
Εκκινητής R (10 μ M):	1 μ l
Taq polymerase (5 u/ μ l):	0,1 μ l
dntp mix (2,5mM each):	1 μ l

ddH ₂ O:	5,3μl
Τελικός όγκος:	10 μl

Βήματα του προγράμματος της PCR συσκευής

1. 94 °C για 4 min (αποδιάταξη DNA)
2. 94 °C για 30 sec
3. 50 °C ή 52 °C για 30 sec (υβριδοποίηση εκκινητών- DNA)
4. 72 °C για 1 min (πολυμερισμός)
5. 30 φορές τον παραπάνω κύκλο (βήματα 2 έως και 4)
6. 72 °C για 5 min (τελική επέκταση)
7. Διατήρηση στους 4 °C

Η απόδοση μιας PCR αντίδρασης εξαρτάται από μια σειρά παραγόντων όπως η συγκέντρωση των διαφόρων συστατικών της αντίδρασης, η ειδική πολυμεράση που χρησιμοποιείται, το χρονικό διάστημα που διαρκεί κάθε στάδιο της αντίδρασης, ο αριθμός των κύκλων που πραγματοποιούνται, η θερμοκρασία στην οποία πραγματοποιείται η υβριδοποίηση των εκκινητών με τις θέσεις στόχους στα μόρια του DNA και τέλος ο σωστός σχεδιασμός των εκκινητών.

2.2.1 PCR ενίσχυση με χρήση σημασμένων εκκινητών

Η ραδιενεργή σήμανση μόνο ενός εκ των δύο εκκινητών είναι αρκετή. Τα συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια συνήθως έχουν υδροξυλικές μονάδες στο 5'τελικό άκρο και συνεπώς είναι έτοιμα για την αντίδραση της κινάσης (Zheng, 1997). Η κινάση που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Fermentas. Η πολυνουκλεοτιδική κινάση απομονώνεται από ένα στέλεχος *E.coli* το οποίο μεταφέρει ένα πλασμίδιο με το κλωνοποιημένο γονίδιο το οποίο κωδικοποιεί αυτό το ένζυμο. Το ένζυμο καταλύει τη μεταφορά της γ-φωσφορικής ομάδας από το ATP στο 5'-OH άκρο του DNA. Αφού έχουμε σημάνει τον εκκινητή όλα τα κομμάτια που θα έχουν ενισχυθεί με βάση το σημασμένο εκκινητή, θα είναι ραδιενεργά σημασμένα. Σ' αυτήν την περίπτωση τα προϊόντα της PCR ανιχνεύονται με αυτοραδιογραφία μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης. Για τη σήμανση χρησιμοποιείται [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP.

Ως μια μονάδα ενζύμου για την T₄ πολυνουκλεοτιδική κινάση, ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για τη μεταφορά 1 nmol ^{32}P από το ATP στο 5'-OH άκρο ενός DNA σε 30 min στους 37 °C (Sambrook, 1989).

Η σήμανση που περιγράφεται στη συνέχεια είναι αρκετή για την ανάλυση 60 ατόμων.

Σε σωληνάκι του 1,5 ml τοποθετούνται τα παρακάτω:

Εκκινητής F (10 μ M):	6,0 μ l
10X kinase buffer:	1,5 μ l
γ - ³² P ATP (>5.000 Ci/mMol):	1,5 μ l
T ₄ polynucleotide kinase (10 u/ μ l):	1,5 μ l
ddH ₂ O:	4,5 μ l
Τελικός όγκος:	15,0 μ l

- Επώαση στους 37 °C για 30 min.
- Μεταφορά στους 65 °C για 10 min (αδρανοποίηση του ενζύμου).
- Στη συνέχεια αφήνεται στον πάγο.

Η χρήση της ραδιενέργειας, κάνει την διαδικασία της PCR να απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή στο χειρισμό. Οι αντιδράσεις αυτές μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ο περιοριστικός παράγοντας είναι μόνο το ραδιενεργό, που έχει χρόνο ημισείας ζωής περίπου 14 ημέρες.

Από το DNA (single-fly) που απομονώθηκε όπως περιγράφηκε στο πρωτόκολλο 'Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ένα άτομο (single fly)', λαμβάνεται μια μικρή ποσότητα και προστίθεται σε αυτή τόσο ddH₂O, ώστε το DNA να έχει συγκέντρωση ίση με 5-10 ng/ μ l. Έπειτα σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου τοποθετείται 1 μ l αραιωμένου DNA και το πώμα κλείνεται.

Ετοιμάζεται μίγμα, το οποίο είναι αρκετό για 60 αντιδράσεις PCR:

10X PCR buffer:	60 μ l
Εκκινητής F (10 μ M):	24 μ l
Εκκινητής R (10 μ M):	30 μ l
Taq polymerase (5 u/ μ l):	6 μ l
dNTP mix (2,5 μ M each):	60 μ l
ddH ₂ O:	345 μ l
Τελικός όγκος:	525 μ l

Το παραπάνω μίγμα μεταφέρεται στο σωληνάκι που είναι ο σημασμένος εκκινητής. Ακολουθεί καλή ανάδευση και 8,75 μ l μεταφέρονται σε κάθε σωλήνα όπου υπάρχει 1 μ l μήτρας DNA.

Τα σωληνάκια τοποθετούνται στη συσκευή της PCR, η οποία ρυθμίζεται να εκτελέσει το πρόγραμμα που αναφέρθηκε παραπάνω. Μετά το πέρας της PCR ακολουθεί αποθήκευση στους 4 °C (σε κουτί προστατευτικό από τη ραδιενέργεια).

2.2.2 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμιδίου:

Το πήκτωμα που χρησιμοποιείται αποτελείται από πολυακρυλαμίδιο, το οποίο έχει τόσο μεγάλη διαχωριστική ικανότητα, ώστε να ξεχωρίζει θραύσματα DNA που διαφέρουν μεταξύ τους κατά μία μόνο βάση. Τα πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μήκος (συνήθως 40-50cm, τα μακρύτερα είναι δύσκολα στο χειρισμό), το πλάτος (συνήθως 20cm), το πάχος (0,3-0,4mm, τα πιο λεπτά έχουν μεγαλύτερη αναλυτική ικανότητα, αλλά είναι πολύ εύθραυστα) και τον τύπο των πηγαδιών φόρτωσης (Zheng, 1997).

Σε ποτήρι ζέσεως προσθέτονται τα παρακάτω:

Διάλυμα ουρίας 46,7% :	40ml
TBE 5X:	16ml
Ακρυλαμίδιο (50%)	10ml
dH ₂ O:	14ml

- Τα δύο τζάμια, όπου θα πακεταριστεί το πήκτωμα, πλένονται πολύ καλά.
- Αφήνονται να στεγνώσουν και καθαρίζονται με αιθανόλη.
- Τοποθετούνται 2 ml σιλικόνης αποκόλλησης στο ένα από τα δύο τζάμια (στο ίδιο πάντα, το μεγαλύτερο) και απλώνονται γρήγορα με χαρτί.
- Το μεγάλο τζάμι τοποθετείται σε οριζόντια θέση και επάνω του τοποθετούνται οι δύο ειδικές πλαστικές ταινίες, με τρόπο που να επικάθονται στα άκρα των δύο μεγάλων πλευρών του τζαμιού. Από πάνω αφήνεται το μικρό τζάμι, έτσι ώστε να καλύπτει ακριβώς το μεγάλο τζάμι.
- Τα άκρα των τζαμιών ενώνονται σε διάφορες θέσεις με μεταλλικά clips, έτσι ώστε να υπάρχει καλύτερη επαφή μεταξύ τους.
- Στο διάλυμα που έχει ήδη φτιαχτεί προσθέτονται 350 μl APS και 45 μl TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine), ώστε να αρχίσει ο πολυμερισμός του ακρυλαμιδίου.

- Το διάλυμα αφήνεται να ρεύσει αργά και σταθερά, στο τμήμα του μεγάλου τζαμιού που προεξέχει. Το διάλυμα αρχίζει να εισχωρεί μεταξύ των τζαμιών. Με μικρά χτυπήματα οδηγείται προς το κάτω μέρος, προσέχοντας να μην κάνει φυσαλίδες.
- Όταν το διάλυμα γεμίσει όλο το χώρο μεταξύ των τζαμιών, τοποθετούνται στο πάνω μέρος (εκεί που τελειώνει το μικρό τζάμι) και κατά 0.5cm σφηνωμένα μεταξύ των δύο τζαμιών τα ειδικά πλαστικά κτενάκια, με τα δοντάκια προς τα πάνω, για να δημιουργηθεί το μέτωπο στο οποίο μετά θα γίνουν τα πηγαδάκια.
- Το πήκτωμα αφήνεται για τουλάχιστον 2 ώρες να στερεοποιηθεί, πριν φορτωθούν τα δείγματα.

2.2.3 Προετοιμασία PCR προϊόντων για ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου

Τα προϊόντα της PCR αποδιατάχθηκαν με θέρμανση (90 °C για 15min) και αμέσως τοποθετήθηκαν στον πάγο. Το μονόκλωνο DNA διαχωρίστηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου και η μία από τις δύο αλυσίδες εμφανίστηκε με αυτοραδιογραφία.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση

- Το πήκτωμα τοποθετείται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και η συσκευή ρυθμίζεται σε 1500 V και 50 W (όχι παραπάνω).
- Τα κτενάκια τοποθετούνται ανάποδα, ώστε να σχηματιστούν τα πηγαδάκια της ηλεκτροφόρησης. Φορτώνονται 3 μl μόνο χρωστικής σε κάθε δεύτερο πηγαδάκι και η συσκευή μπαίνει σε λειτουργία. Έτσι, από την πορεία της χρωστικής διαπιστώνεται ποια πηγαδάκια είναι καλά (δηλαδή δεν παρατηρείται διάχυση σε διπλανά πηγαδάκια), ώστε να φορτωθεί το DNA, ενώ παράλληλα θερμαίνεται το πήκτωμα (πρέπει να έχει θερμοκρασία 45-50 οC σε όλη του την επιφάνεια).
- Μετά από μια ώρα περίπου, η συσκευή σταματά και φορτώνονται 3 μl δείγματος ανά πηγαδάκι.
- Η συσκευή ρυθμίζεται στο ίδιο πρόγραμμα.
- Η ηλεκτροφόρηση αφήνεται να εξελιχθεί για χρονικό διάστημα που εξαρτάται από την περιοχή βάσεων που θέλουμε να αναλύσουμε (και πόσο αυτή απέχει από τον εκκινητή). Το πήκτωμα απομακρύνεται από τη συσκευή και τα δύο τζάμια αποχωρίζονται, προσέχοντας να μείνει όλο το πήκτωμα στο ένα τζάμι.

- Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, το πήκτωμα μεταφέρεται σε χαρτί 3MM Whatmann και σκεπάζεται με νάιλον μεμβράνη. Ξηραίνεται για περίπου 90 min σε υψηλή θερμοκρασία υπό κενό.
- Το πήκτωμα εκτίθεται σε φιλμ αυτοραδιογραφίας. Εμφανίζεται το φιλμ.

2.3 Αλληλούχηση Αλληλομόρφων

2.3.1 PCR ομόζυγων ατόμων

Σύμφωνα με την εικόνα των ατόμων στο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου επιλέξαμε ομόζυγα άτομα για κάθε αλληλόμορφο προκειμένου να γίνει η αλληλούχηση πρωτοδιάταξης.

Στο πινακάκι περιγράφεται η *pcr* για 1 αντίδραση:

DNA(5ng/μl)	2μl
Buffer	2μl
dNTPs(2,5mM each)	2μl
PrimerF 5Mμ	2μl
PrimerR 5Mμ	2μl
Tag polymerase	0.15μl
H ₂ O	9.85μl
Τελικός όγκος	20μl

Τα PCR προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1,3%. Οι διαδικασίες της παρασκευής του πηκτώματος αγαρόζης και της ηλεκτροφόρησης είναι όμοιες με αυτές που περιγράφηκαν παραπάνω.

2.3.2 Απομόνωση PCR προϊόντων από πήκτωμα αγαρόζης

Χρησιμοποιήθηκε το JETQUICK gel extraction spin kit (GENOMED GmbH)

- Αφού ηλεκτροφορήθηκαν τα PCR προϊόντα, εντοπίζεται με την βοήθεια UV ακτινοβολίας την θέση της ζώνης στο πήκτωμα.
- Κόβεται προσεχτικά με ένα κοπίδι το πήκτωμα στις θέσεις αυτές και τοποθετείται η κάθε ζώνη σε σωληνάκι μικροφυγοκέντρου.
- Στη συνέχεια ζυγίζονται οι ζώνες μέσα στα σωληνάκια με την βοήθεια ενός ζυγού και αφαιρείται το βάρος που έχει το σωληνάκι προκειμένου να προκύψει το καθαρό βάρος της ζώνης.
- Για κάθε 100mg κομματιού πηκτώματος-ζώνης προσθέτονται 300μl L1 διαλύματος και το σωληνάκι τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 50°C για 15 λεπτά.
- Κάθε 3 λεπτά γίνεται vortex στο σωληνάκι προκειμένου να διαλυθεί καλά η αγαρόζη.

- Έπειτα τοποθετείται ένα JETQUICK spin column σε ένα σωληνάκι των 2ml και τοποθετείται σε αυτό το περιεχόμενο του σωληνακίου από το βήμα 1.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000g για 1 λεπτό.
- Αποχύση του υλικού που περνά στο σωληνάκι των 2ml (εάν το βάρος της φέτας του πηκτώματος είναι πάνω από 250mg επαναλαμβάνεται το βήμα 2 με άλλα 500μl L1 διαλύματος).
- Για να ξεπλυθεί η στήλη (JETQUICK spin column), προστίθεται σε αυτή 500μl L2. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 14.000g για ένα λεπτό, απόχυση το υλικού που περνά από την στήλη στο σωληνάκι και επαναφυγοκέντρηση στα 14.000g για ένα λεπτό.
- Τέλος για την παραλαβή του DNA, τοποθετείται η στήλη σε ένα σωληνάκι μικροφυγοκέντρου 1,5ml και προστίθενται 30μl αποστειρωμένου νερού που έχει προθερμανθεί στους 65-70°C . Ακολουθεί φυγοκέντρηση στα 14.000g για 2 λεπτά. Φυλλάσσεται το DNA στους -20°C.

Μετά ηλεκτροφορήσαμε σε πήκτωμα αγαρόζης 10 από τα 30μl του DNA για να εκτιμήσουμε την ποσότητα και το μέγεθος του DNA μας.

2.3.3 Ανάλυση αλληλουχίας

Η αλληλούχιση των δειγμάτων έγινε στον αυτόματο γενετικό αναλυτή μονού τριχοειδούς ABI 310. Προκειμένου τα τοποθετηθούν τα δείγματα στο SEQUENCER υφίσταται μια προεργασία η οποία για κάθε αντίδραση περιλαμβάνει εισαγωγή των ακολούθων σε 0,2ml tube που περιέχει το reaction mix.

Αντιδραστήριο	Ποσότητα
Terminator ready Reaction mix	2ul (ήδη στο tube)
Εκκινητής	1ul (3.2pmoles)
DNA	Χul (όχι παραπάνω από 5 ul)
Απιονισμένο νερό	Υul
Ολικός όγκος	10ul

Έπειτα τοποθετούμε τις αντιδράσεις στην συσκευή PCR την οποία ρυθμίζουμε για να ακολουθήσει το παρακάτω πρόγραμμα:

- 96 °C για 10 min
- 96 °C για 10 sec

- 50 °C για 20 sec
- 60 °C για 4 min
- 40 φορές τον παραπάνω κύκλο από το βήμα 2
- Διατήρηση στους 4 °C

Στη συνέχεια ακολουθεί κατακρήμνιση με αιθανόλη/EDTA (περιγραφή για μία αντίδραση).

- Προετοιμάζεται ένα σωληνάκι φυγοκέντρησης 1,5ml που περιέχει 5μl EDTA 125mM, pH 8.0 .
- Μεταφέρεται το περιεχόμενο από το σωληνάκι που είχαμε τοποθετήσει στην συσκευή PCR στο νέο σωληνάκι των 1,5ml .
- Προστίθενται 60μl 100% αιθανόλης σε κάθε σωληνάκι. Ακολουθεί vortex και spin.
- Αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 15min.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 20min σε μέγιστη ταχύτητα και απόχυση του υπερκείμενου με προσοχή.
- Γρήγορο spin ξανά και αφαίρεση όποιου υπόλοιπου υπερκείμενου.
- Προσθήκη 250μl 70% αιθανόλη. Ακολουθεί ανάδευση με vortex.
- Φυγοκέντρηση για 5min σε μέγιστη ταχύτητα. Απόχυση του υγρού.
- Γρήγορο spin ξανά και απομάκρυνση του υπόλοιπου υγρού.
- Το σωληνάκι στεγνώνει σε ξηραντήρα.
- Ακολουθεί επαναδιάλυση του ιζήματος σε 12 μl HD-Φορμαμίδιο.
- Vortex για 30-45 sec .
- Γίνεται ένα spin και μεταφέρεται το περιεχόμενο σε ένα ABI-tube.
- Το δείγμα αποδιατάσσεται με θέρμανση για 5 min στους 95 οC.
- Διατήρηση στο πάγο μέχρι να εισαχθεί το δείγμα στον sequencer (ABI310).

2.4 Επεξεργασία αποτελεσμάτων γενοτυπικής ανάλυσης

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω προγράμματα πληθυσμιακής ανάλυσης:

Το πρόγραμμα Popgene 1.31 (Yeh et. al., 1999) χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση της γενετικής ποικιλότητας μέσω υπολογισμού του πραγματικού αριθμού αλληλομόρφων n_a , του δραστικού αριθμού αλληλομόρφων n_e , την παρατηρούμενη (H_o) και αναμενόμενη (H_e) ετεροζυγωτία. Επίσης χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της ισορροπίας κατά HW, το τεστ ομογέν-

νειας μέσω του κριτηρίου G^2 . Τέλος χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων κατά Nei (1972) και του βαθμού γονιδιακής ροής.

Το πρόγραμμα Genepop (Raymond and Rousset, 1995) χρησιμοποιήθηκε για την συσχέτιση γεωγραφικής και γενετικής απόστασης μεταξύ των δειγμάτων (επιλογή ISOLDE). Τα αποτελέσματα εισήχθησαν στο Excel, όπου υπολογίστηκε ο δείκτης συσχέτισης R του Pearson. Οι γεωγραφικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με την χρήση της σελίδας του διαδικτύου (<http://www.movable-type.co.uk/scripts/latlong.html>) όπου η εισαγωγή των συντεταγμένων ανά ζεύγη περιοχών μετατρέπεται στην αντίστοιχη μεταξύ τους γεωγραφική απόσταση.

Το πρόγραμμα FSTAT (Goudet, 2001) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό της σημαντικότητας της πληθυσμιακής ποικιλότητας (Fst), με βαθμό σημαντικότητας 0,05.

Το πρόγραμμα Genalex 6.1 (Peakall and Smouse 2006) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των ποσοστών της ανάλυσης της μοριακής ποικιλότητας (AMOVA) και για να υπολογιστούν οι PhiPT τιμές ανά ζεύγος πληθυσμών. Οι PhiPT τιμές υπολογίζονται ως το τμήμα της ποικιλότητας ανάμεσα στους πληθυσμούς σε σχέση με την συνολική ποικιλότητα. Αντιπροσωπεύουν την συσχέτιση μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού σε σχέση με το σύνολο των ατόμων όλων των πληθυσμών. Η μήτρα PhiPT χρησιμοποιήθηκε για την Principal Components Analysis (PCA).

Το πρόγραμμα PHYLIP 3.6C (Felsenstein, 2004) είναι ένα πακέτο προγραμμάτων για φυλογενετικές αναλύσεις. Δίνει την δυνατότητα κατασκευής δενδρογράμματος, με τη μέθοδο neighbor-joining ή UPGMA. Η πιθανότητα κάθε κλάδου να αντιπροσωπεύει ένα πραγματικό διαχωρισμό ελέγχεται με τη μέθοδο bootstrap. Εκατό bootstrap επαναλήψεις είναι αρκετές για να δώσουν μια καθαρή εικόνα της δομής των πληθυσμών. Ως αρχική μήτρα δεδομένων χρησιμοποιούμε τις συχνότητες αλληλομόρφων. Η μήτρα δέχεται διαδοχικές τροποποιήσεις μέσω των προγραμμάτων 1) Seqboot 2) Gendist 3) Neighbor και η τελική μέσω του προγράμματος 4) Consense. Όταν σχηματιστεί η τελική μορφή της μήτρας η απεικόνιση της που θα δώσει το δενδρόγραμμα γίνεται μέσω του προγράμματος TREEVIEW (δεν είναι αυτή η αναφορά, νομίζω Roderick 2001).

Το πρόγραμμα STRUCTURE (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του αριθμού των πιθανών ομάδων (clusters) στις οποίες διαχωρίζονται όλα τα άτομα των πληθυσμών μας. Το πρόγραμμα Structure ελέγχει την πιθανότητα να είναι πραγματικός ο αριθμός πληθυσμών που εμείς του ζητάμε να ελέγξει. Η Μπαγιεσιανή αυτή μέθοδος υποθέτει πως οι δείκτες βρίσκονται σε ισορροπία κατά HWE μεταξύ των πληθυσμών και διαχωρίζει τα άτομα σε πληθυσμούς έτσι ώστε να ισχύει η ισορροπία. Χρησιμοποιήσαμε και τα 4 διαθέσιμα μοντέλα με μια burn-in period 50000 και 50000 MCMC επανα-

λήψεις μετά το αρχικό burn-in, για $K=1$ ως $K=5$ (όπου K ο πιθανολογούμενος αριθμός διακριτών πληθυσμών).

3 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ - ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

- **Διάλυμα βρωμιούχου αιθιδίου** (10mg/ml)
- **Διάλυμα ομογενοποίησης:** 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 8.0, 0.15 mM σπερμιδίνη και 0.15 mM σπερμίνη.
- **Διάλυμα TE:** 10 mM Tris-HCl pH 8.0 και 1 mM EDTA.
- **Διάλυμα λύσης:** 300 mM Tris-HCl (pH 9.0), 100 mM EDTA (pH 8.0), 0.625% SDS, 5% σουκρόζη, dH₂O.
- **Φαινόλη:** Έχει pH όξινο (pH 4,8) και γι' αυτό γίνονται διαδοχικές εκχυλίσεις με Tris-HCl (pH 7.6). Στο τέλος, αφού το pH έχει φτάσει στο 7.6, αφήνεται από πάνω μία φάση Tris-HCl, για να προστατεύει το pH. Προστίθεται και 0.1% υδροξυ-κουινολίνη (προστατεύει από την οξειδωση και δίνει κίτρινο χρώμα).
- **Διάλυμα 10% SDS:** Διαλύονται 100 gr SDS σε 900 ml H₂O. Θερμαίνεται στους 68°C για να διευκολυνθεί η διαλυτοποίηση και ρυθμίζεται το pH στο 7.2 με προσθήκη λίγων σταγόνων πυκνού HCl. Προστίθεται επιπλέον H₂O μέχρι τελικού όγκου 1 lt.
- **Tris-Cl 1M:** Σε 800 ml H₂O διαλύονται 121.1 g Tris-base. Ρύθμιση του pH στο επιθυμητό με πυκνό HCl.
- **NaCl 5M:** 292.2gr NaCl σε 800ml νερό. Αφού διαλυθεί προσθέτω νερό σε τελικό όγκο 1lt.
- **Διάλυμα 5 M CH₃COOK pH 7,5:** Διαλύονται 49.1 gr CH₃COOK σε 90 ml ddH₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 7.5 με 2 M οξικό οξύ. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στα 100 ml με επιπλέον H₂O.
- **Διάλυμα 0,5 M EDTA pH 8,0:** Προστίθενται 186.1 g ένυδρου EDTA σε 800 ml H₂O. Ρυθμίζεται το pH στο 8,0 με καυστικό νάτριο. Ο τελικός όγκος ρυθμίζεται στο 1 lt με επιπλέον H₂O και το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο.
- **Διάλυμα ηλεκτροφόρησης 5X TBE:** 0.45 M Tris, 0.45 M βορικό οξύ, 100 mM EDTA
- **Διάλυμα χρωστικής (loading dye A) 6X:** 0.25% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.25% κυανούν της ξυλόλης, 15% φικόλλη σε H₂O.
- **Διάλυμα dNTPs:** 25μl dATP(1 μM), 25μl dTTP(1 μM), 25μl dCTP(1 μM), 25μl dGTP(1 μM)
- **Διάλυμα ουρίας 46.7%:** 233.5gr ουρίας σε 500ml νερό
- **Διάλυμα 50% ακρυλαμίδιου:** 100 gr ακρυλαμίδιου, 3.3 gr bis και H₂O σε τελικό όγκο 200 ml
- **Διάλυμα χρωστικής (loading dye B):** 98% φορμαμίδιο, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.025% μπλε της βρωμοφαινόλης, 0.025% κυανούν της ξυλόλης
- **Διάλυμα 10X σήμανσης (PNK):** 500 mM Tris-HCl pH 6.4, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM spermidine και 1 mM EDTA
- **Διάλυμα υπερθευκού αμμωνίου(APS) 10% :** 1gr Ammonium persulfate και 10ml dd H₂O.
- **Διαλύματα για Gel Extraction:** Διάλυμα L1 (διαλυτοποίηση του πηκτώματος): περιέχει NaClO₄, οξικό νάτριο και TBE-solubilizer, Διάλυμα L2 (για ξέπλυμα στήλης) : περιέχει αιθανόλη, NaCl, EDTA και Tris/HCl

4 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

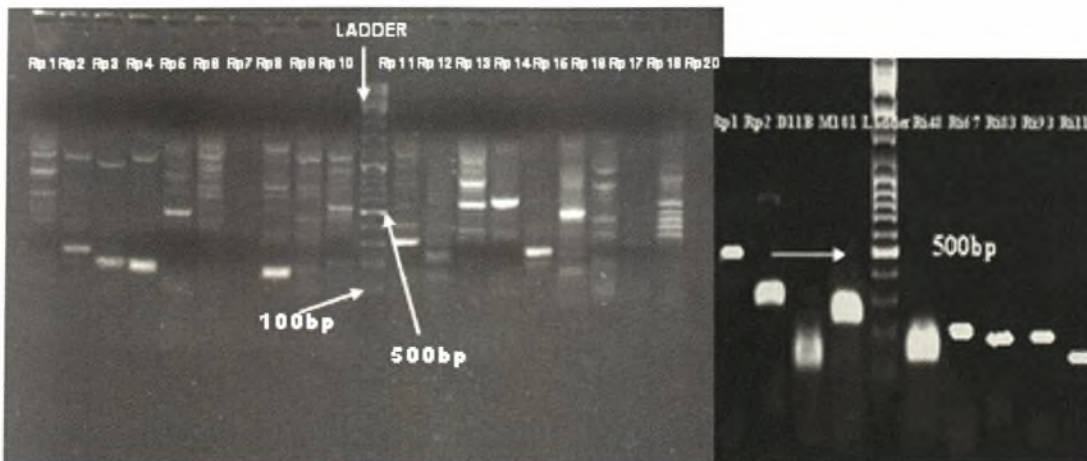
Στόχος της εργασίας αυτής ήταν η μεταφορά μικροδορυφορικών δεικτών που είχαν αναπτυχθεί στα είδη *Rhagoletis pomonella*, *Rhagoletis indifferens*, *Bactrocera oleae* και *Ceratitis capitata* στο είδος *Rhagoletis cerasi*.

Το έντομο *Rhagoletis pomonella* (το πιο μελετημένο είδος από το γένος *Rhagoletis*) ανήκει στο ίδιο γένος με την μύγα της κερασιάς, συνεπώς είναι αναμενόμενο να έχουν μεγάλες γονιδιωματικές ομοιότητες. Άρα είναι πιθανό ζεύγη εκκινητών σχεδιασμένα για το είδος *Rhagoletis pomonella* να ενισχύουν αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές και στο είδος *Rhagoletis cerasi*. Πολλοί είναι οι μικροδορυφόροι (>80) που έχουν απομονωθεί από το είδος *Rhagoletis pomonella*. Αυτοί οι μικροδορυφορικοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μελετηθεί η γενετική δομή και η εξελικτική πορεία άλλων ειδών της οικογένειας *Rhagoletis* και άλλων συγγενικών εντόμων (Velez et al., 2006). Η μύγα *Rhagoletis indifferens* γνωστή και ως μύγα της κερασιάς της Δύσης, συναντάται κυρίως στις περιοχές της Αμερικής: Καναδά, Αριζόνα, Καλιφόρνια, Μοντάνα, Νέο Μεξικό, Όρεγκον και Ουάνσιγκτον προκαλώντας εξαιρετικές ζημιές στις καλλιέργειες κερασιών (Smith, 2003). Το έντομο *Rhagoletis indifferens* ανήκει και αυτό στο ίδιο γένος με την μύγα της κερασιάς. Η Μεσογειακή μύγα *Ceratitis capitata* είναι ένα δίπτερο, ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην οικογένεια Tephritidae. Η Μεσογειακή μύγα είναι από γενετική και μοριακή άποψη το καλύτερα μέχρι σήμερα μελετημένο είδος της οικογένειας Tephritidae (Robinson & Zacharopoulou, 1996). Ο δάκος της ελιάς (επιστημονική ονομασία *Bactrocera oleae*) είναι ένα ολομετάβολο έντομο που ανήκει επίσης στην οικογένεια Tephritidae. Λόγω της συγγένειας τους με την μύγα της κερασιάς ζεύγη εκκινητών σχεδιασμένα για αυτά τα τέσσερα έντομα μπορεί να ενισχύουν αντίστοιχες γονιδιωματικές περιοχές και στο είδος *Rhagoletis cerasi*.

Συνολικά εξετάστηκαν 38 ζεύγη εκκινητών: 19 ζεύγη από *R. pomonella* (Velez et al., 2006), 16 από *R. indifferens* (Maxwell et al. 2009), 2 από *C. capitata* (Stratikopoulos et al., 2009) και 1 από *B. oleae* (Augustinos et al., 2008)}.

Αρχική αξιόλογηση δυνατότητας μεταφοράς μικροδορυφορικών δεικτών μέσω της διαειδικής ενίσχυσης: Ο πρώτος έλεγχος για το ποιοί από τους 38 δείκτες ενίσχυαν κάποια γονιδιωματική περιοχή έγινε με ένα μίγμα DNA 20 ατόμων *Rhagoletis cerasi* από την περιοχή της Καλλιπεύκης Λάρισας. Μετά από PCR και βλέποντας την εικόνα που παρουσίαζαν τα προϊόντα της σε ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα αγαρόζης, (Εικόνα 5) μεταβάλλαμε τις συνθήκες PCR (θερμοκρασία αποδιάταξης, συγκέντρωση διαφόρων συστατικών της αντίδρασης καθώς και

το είδος της *Taq* πολυμεράσης) για να βελτιοποιήσουμε την εικόνα κάποιων δεικτών (Εικόνα 5). Τελικά, καθαρό προϊόν έδωσαν 14 από τους 19 διαθέσιμους δείκτες του είδους *R. pomonella* και 10 στους 16 από το είδος *R. indifferens*.



Εικόνα 5. Αποτελέσματα PCR δεικτών από *R. pomonella*, *R. Indifferens*, *B. oleae* και *C. capitata* σε *mix DNA* ατόμων *R. cerasi*

Επιλογή δεικτών για την τελική πληθυσμιακή ανάλυση : Οι παραπάνω δείκτες χρησιμοποιήθηκαν για τη γενοτύπωση ενός πληθυσμού 20 ατόμων από την περιοχή Καλλιπεύκης Λάρισας και επιλέξαμε για την τελική πληθυσμιακή ανάλυση αυτούς που είχαν:

1. Αλληλόμορφα (περισσότερα από 1)
2. Καθαρές ζώνες-καλή ενίσχυση-εύκολα αναγνωρίσιμα αλληλόμορφα

Η ανάλυση έγινε μέσω PCR με ραδιενεργά σημασμένους εκκινητές και ηκεκτροφόρηση των προϊόντων σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου. Συνολικά 11 δείκτες ήταν κατάλληλοι για την εκτεταμένη πληθυσμιακή ανάλυση (6 δείκτες στους 14 για την *R. pomonella* και 5 στους 10 για την *R. indifferens*). Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3. Μικροδορυφορικοί δείκτες διαειδικής ενίσχυσης στο *Rhagoletis cerasi*

Μικροδ.Δείκτες	Ενίσχυση συγκεκριμένων προϊόντων*	Μονομορφικός**	Χαμηλή ενίσχυση**	Null ** αλληλόμορφα	Πολυμορφικός**
<i>R.pomonella</i> primer pairs					
Rhag-uSat-1	+				+
Rhag-uSat-2	+				+
Rhag-uSat-4	+				+
Rhag-uSat-5	+			+	
Rhag-uSat-6	-				
Rhag-uSat-7	-				
Rhag-uSat-8	+	+			
Rhag-uSat-9	-				
Rhag-uSat-10	+			+	
Rhag-uSat-11	+		+		

Rhag-uSat-12	+				+
Rhag-uSat-13	+	+			
Rhag-uSat-14	+	+			
Rhag-uSat-15	+				+
Rhag-uSat-16	+	+			
Rhag-uSat-17	-				
Rhag-uSat-18	+				+
Rhag-uSat-19	+	+			
Rhag-uSat-20	-				
Σύνολο	14/19	5/14	1/14	2/14	6/14
<i>R.indiferens</i> primer pairs					
WCFF-007	+		+		
WCFF-011	+		+		
WCFF-024	+	+			
WCFF-031	-				
WCFF-048	+				+
WCFF-049	-				
WCFF-057	-				
WCFF-061B	+	+			
WCFF-065B	-				
WCFF-067	+				+
WCFF-083	+				+
WCFF-084A	-				
WCFF-086A	+	+			
WCFF-093	+				+
WCFF-105	-				
WCFF-111	+				+
Σύνολο	10/16	3/10	2/10	0	5/10
<i>C.capitata</i> primer pairs					
Medflymic101	+				+
Medflymic75	+	+			
<i>B. oleae</i> primer pairs					
D11b	+				+

*: σύμφωνα με την εικόνα που έδωσαν στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης

** : σύμφωνα με την εικόνα στην ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου σε έλεγχο 20 ατόμων *R.cerasi* από Καλλιπεύκη Λάρισας

Οι μικροδορυφορικοί δείκτες που τελικά επιλέχθηκαν από κάθε είδος για την πληθυσμιακή ανάλυση και τα χαρακτηριστικά τους αναφέρονται στον Πίνακα 4.

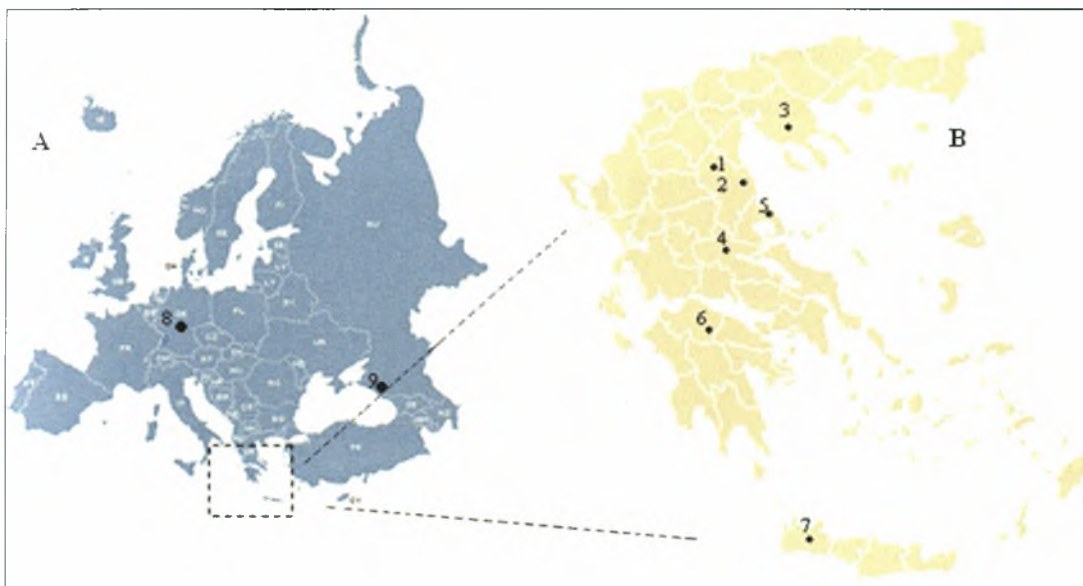
Πίνακας 4. Χαρακτηριστικά μικροδορυφόρων που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση

A/A	Γενετικός τύπος	Μικροδορυφορικό Μοτίβο Στο Είδος Προέλευσης	Μέγεθος (bp)	Tm	Εκκινητές
1	RcRp1	(CA) ₅ AA(CA) ₈	486-498	50	P:GGAAACGACATCCGGTAAAA M:ACGGGCTCACAAACGAAATA
2	RcRp2	(CA) ₂₇	204-220	52	P:TCCAATCAAATACGGCAACA M:AGAGATCCCGGTGTCGTTTC

3	RcRp4	(GT) ₁₂	178-180	50	P:GCAAGCGAGTCGTAATCACA M:CCCTCATCATTTGTGGTCTC
4	RcRp12	(GT) ₂ GG(GT) ₉	190-204	52	P:GGGTGTTTCATGGTAGTTGTAGAT M:ACTAGTAAAGGAAAGGCGCAAT
5	RcRp15	(TG) ₁₁	236-252	50	P:CGCGAGAATTTAGTTGAGCA M:TGCCAAGAAGTGTGTTTCC
6	RcRp18	(TG) ₁₅	272-282	50	P:CCCAATGTCCCGTAAACTTC M:TCACTCAATGCCATTTC
7	RcRi48	(GA) ₁₄	160-180	50	F:GTCAGCATTTACCCATTGTCC R:GGGAATTTGAACCACGAAAC
8	RcRi67	(TG) ₁₂	198-210	52	F:GTTGCTCTGGAGATGCTGATG R:CCAGAGCTTTCTTCAAGTTTATGG
9	RcRi83	(TG) ₉	190-194	52	F:CTTGAATGCGCTAAGGTAAAGAG R:ACGTGAGCAGCACAAAGGTAG
10	RcRi93	(CA) ₉	198-220	52	F:GGCATAACAAGACGACGAGTTC R:GCGTGTTGAGTTTCGTTTAC
11	RcRi111	(CA) ₁₃	164-170	50	F:AAAGGCTAAATCTTAGTATTCTC R:TGCAAACCTCCATAGCTGTC
A/A	Γενετικός τύπος	Μικροδορυφορικό Μοτίβο Στο <i>R.cerasi</i>			
12	RcM101	(A) ₉ (Arich)	405	52	F:ATTGTGCGTTGTCAAGTGG R:AGCTGCGAACGGAAGTAAA
13	RcD11b	(A) ₄ (Arich)	195	50	F:TGCGCCTACATGAAAACAC R:ATGAAATTGGCACGCTGTT

Tm : θερμοκρασία επαναδιάταξης Προέλευση εκκινήτων: RcRP: *R. pomonella*, RcRi: *R. Indifferens*, RcM: *C. capitata*, RcD: *B. oleae*

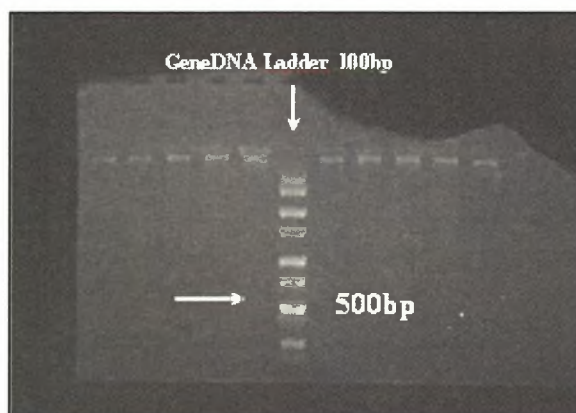
Πληθυσμιακή ανάλυση: Συνολικά αναλύθηκαν 233 άτομα από 9 γεωγραφικές περιοχές. Οι περιοχές αυτές φαίνονται στους παρακάτω χάρτες (A,B):



Χάρτες Α).Ευρωπαϊκές περιοχές συλλογής δειγμάτων Β).Ελληνικές περιοχές συλλογής δειγμάτων

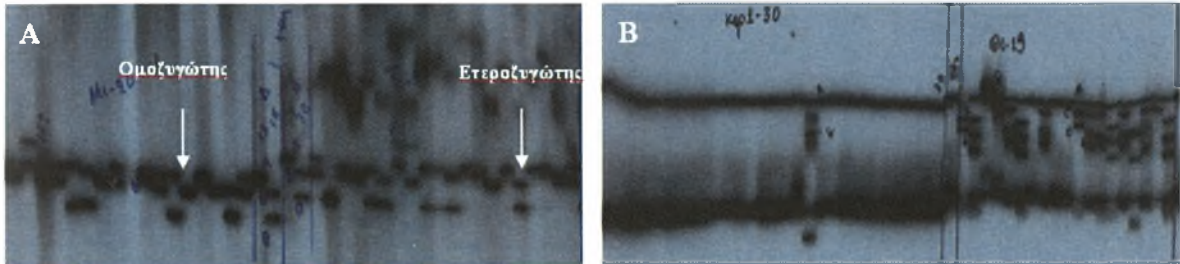
1.Καλλιπεύκη (Λάρισα) 2.Αγιά Λάρισα 3.Θεσσαλονίκη 4.Καρδίτσα 5.Καμάρι (Πήλιο)
6.Κερνίτσα (Καλάβρυτα) 7.Χανιά (Κρήτη) 8.Stecklenberg (Γερμανία) 9.Κρασνοδάρ (Κριμαία)

Ποσοτικοποίηση γενετικού υλικού: Από κάθε άτομο απομονώθηκε γονιδιωματικό DNA, όπως περιγράφεται στο “Υλικά και μέθοδοι”. Μετά την απομόνωση DNA ακολούθησε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης (Εικόνα 6), με μάρτυρα μοριακού βάρους τον GeneDNA Ladder 100bp προκειμένου να πιστοποιηθεί η ποιότητα του απομονωμένου DNA και να καθοριστεί η συγκέντρωσή του. Μετά τον ποσοτικό προσδιορισμό του απομονωμένου DNA, έγινε αραιώσή του ώστε να έχουμε τελική συγκέντρωση DNA 10 ng/μl σε κάθε δείγμα.



Εικόνα 6 :Ποσοτικός προσδιορισμός DNA από άτομα της περιοχής Κερνίτσας Καλαβρύτων.

Γενοτυπική ανάλυση των πληθυσμών της μύγας της κερασιάς: Ο γενοτυπικός έλεγχος των ατόμων έγινε με την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη χρήση σημασμένων εκκινητών. Η σήμανση του ενός από τους δύο εκκινητές (Forward) έγινε με σκοπό την οπτικοποίηση των αποτελεσμάτων με αυτοραδιογραφία και αποτύπωσή τους σε φιλμ μετά την ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (παραδείγματα στην Εικόνα 7) .



Εικόνα 7. Γενοτυπικός έλεγχος των πληθυσμών της μύγας της κερασιάς από *A)* Καμάρι Πηλίου και Καρδίτσα με τον δείκτη *RcRi93* και *B)* των ατόμων της Κερνίτσας Καλαβρύτων και Θεσσαλονίκης με τον δείκτη *RcRp12*.

Ανάλυση γενετικής ποικιλότητας: Στον Πίνακα 1 του παραρτήματος παρουσιάζονται οι γενότυποι όλων των ατόμων που αναλύθηκαν. Τα δεδομένα που προέκυψαν αναλύθηκαν στατιστικά με το πρόγραμμα πληθυσμιακής ανάλυσης Popgene. Η πρώτη ανάλυση αφορούσε τον πολυμορφισμό των συγκεκριμένων δεικτών, καθώς και το κατά πόσο βρίσκονται σε ισορροπία κατά Hardy-Weinberg (HWE) (Πίνακας 5). Στον Πίνακα 5, αναφέρεται ακόμα το εύρος αλληλομόρφων κάθε μικροδορυφόρου, δηλαδή η απόσταση σε ζεύγη βάσεων (bp) από το μικρότερο ως το μεγαλύτερο αλληλόμορφο καθώς και ο δείκτης Nm προκειμένου να υπολογιστεί ο βαθμός γονιδιακής ροής μεταξύ των δειγμάτων .

Πίνακας 5. Χαρακτηριστικά γενετικών τόπων που χρησιμοποιήθηκαν στην τελική πληθυσμιακή ανάλυση.

Γεν.τόπος	N Μέγεθος Δείγματος	Εύρος μεγέθους αλληλομόρφων	n_a	n_e	H_o	H_e	Nm	HWE G^2	Τεστ ομογένειας G^2
RcRp1	194	10	3	1,9057	0,2629	0,4765	0,9742	-	-
RcRp2	200	18	8	3,0359	0,6900	0,6723	5,2591	+	-
RcRp4	192	2	2	1,6978	0,4323	0,4121	4,7089	+	-
RcRp12	210	14	6	2,3569	0,4143	0,5771	1,3293	-	-
RcRp15	206	18	6	2,0718	0,4660	0,5186	3,6276	+	-
RcRp18	206	10	4	3,1793	0,2573	0,6871	4,7770	-	-

RcM101	200	11	6	2.1299	0.3650	0.5318	3.1119	-	-
RcD11b	208	30	4	1.2754	0.1779	0.2164	7.9255	-	-
RcRi48	203	20	8	1.7020	0.2857	0.4135	4.1979	-	-
RcRi67	203	12	6	1.3191	0.2315	0.2425	2,5983	+	-
RcRi83	206	4	2	1,5751	0,3641	0,3660	2,6603	+	-
RcRi93	204	20	9	5,1066	0,6422	0,8061	1,6518	-	-
RcRi 111	201	6	3	1,3031	0,1891	0,2332	4,5745	-	-
M.O.	203		5,15	2,2045	0,3676	0,4733	2,5585		

N: μέγεθος δείγματος, n_a : αριθμός αλληλομόρφων, n_e : δραστικός αριθμός αλληλομόρφων,

Ho: παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, He: αναμενόμενη ετεροζυγωτία, HWE: επίπεδο 5% κριτήριο G^2 -: εκτός ισορροπίας, +: εντός ισορροπίας, Nm: γονιδιακή ροή, M.O: Μέσος Όρος

Ο πολυμορφισμός των δεικτών αυτών δεν χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα υψηλός, δεδομένου ότι εμφάνισαν 2-9 αλληλόμορφα, όμως η μέση ετεροζυγωτία τους είναι αρκετά υψηλή. Ο πραγματικός αριθμός των αλληλομόρφων (n_a) είναι μια ένδειξη πολυμορφισμού, αλλά επηρεάζεται από το μέγεθος του δείγματος, ενώ δεν λαμβάνει υπόψη και τη σχετική συχνότητα των αλληλομόρφων στον πληθυσμό. Ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο είναι 5,15 αλληλόμορφα. Πιο πολυμορφικός από όλους τους γενετικούς τόπους βρέθηκε ο RcRi93 με εννέα αλληλόμορφα και λιγότερο πολυμορφικός ο RcRp4 και ο RcRi83 με δύο αλληλόμορφα. Ωστόσο ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (n_e), που λαμβάνει υπόψη τόσο το μέγεθος του δείγματος όσο και τη σχετική συμμετοχή των αλληλομόρφων στο δείγμα, είναι πιο κατάλληλος δείκτης πολυμορφισμού. Η μέση τιμή του στην παρούσα μελέτη βρέθηκε 2,2045. Σύμφωνα με αυτόν, ως πιο πολυμορφικός δείκτης παραμένει ο RcRi93 με 5,1066 αλληλόμορφα αλλά ως λιγότερο πολυμορφικός εμφανίζεται ο RcD11b με 1,2754 αλληλόμορφα.

Σύμφωνα με την παρατηρούμενη ετεροζυγωτία πιο πολυμορφικός δίνεται ο γενετικός τόπος RcRp2 (0,6900) και λιγότερο ο RcD11b (0,1779). Ακόμα σύμφωνα με την αναμενόμενη ετεροζυγωτία πιο πολυμορφικός παρουσιάζεται ο RcRi93 γενετικός τόπος (0,8061) και λιγότερο πολυμορφικός ο RcD11b (0,2164). Συνεπώς σύμφωνα με τις περισσότερες παραμέτρους ο πιο πολυμορφικός είναι ο RcRi93 και ο λιγότερο ο RcD11b.

Το μεγαλύτερο εύρος στο μέγεθος των αλληλομόρφων εμφάνισε ο RcD11b με απόσταση 30 bp από το μικρότερο ως το μεγαλύτερο αλληλόμορφο, ενώ το μικρότερο το εμφάνισε ο RcRp4 (2bp).

Η εξέταση για το κατά πόσο οι γενετικοί τόποι είναι σε ισορροπία κατά Hardy-Weingberg έδειξε ότι 8/13 δείκτες εμφάνισαν απόκλιση από την ισορροπία H-W (για επίπεδο σημαντικότητας 5%). Θεωρώντας τα δείγματα ως τμήμα ενός παμμικτικού πληθυσμού, το τεστ ομογένειας που έγινε με την βοήθεια του προγράμματος Popgene, έδειξε ότι για επίπεδο σημαντικότητας 5% κανένας από τους 13 γενετικούς τόπους δεν συμφωνεί με την υπόθεση αυτή .

Ακολούθησε η στατιστική ανάλυση των 8 δειγμάτων από τις διάφορες γεωγραφικές περιοχές (η περιοχή της Θεσσαλονίκης δεν συμπεριλήφθηκε στις αναλύσεις λόγω της μειωμένης ενίσχυσης που παρατηρήθηκε σε κάποιους δείκτες). Η ανάλυση αφορά όλους τους μικροδορυφόρους που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε δείγμα. Οι μετρήσεις έγιναν με τις ίδιες παραμέτρους που αναφέρθηκαν και πιο πάνω. Η ανάλυση αυτή έδειξε ότι η πλειονότητα των δεικτών αυτών δεν εμφανίζει ιδιαίτερα προβλήματα, όπως μεγάλες αποκλίσεις από HWE (Πίνακας 6) .

Πίνακας 6. Ανάλυση των επιμέρους δειγμάτων ως προς το επίπεδο πολυμορφισμού.

Περιοχή συλλογής	N	n_a	n_e	H_o	H_e	HWE
Καλλιπεύκη	20	3,3077	2,0922	0,3765	0,4661	11/13
Αγιά Λάρισα	30	3,9231	2,0260	0,4038	0,4411	11/13
Καρδίτσα	20	3,0769	1,9048	0,3327	0,4164	10/13
Καμάρι	20	3,0000	2,0174	0,3763	0,4374	11/13
Κερνίτσα	30	2,9231	1,8404	0,2906	0,3858	10/13
Χανιά	30	3,3077	1,9481	0,3688	0,4614	12/13
Γερμανία	32	3,7692	1,8895	0,3776	0,4267	12/13
Ρωσία	32	3,9231	2,1962	0,3969	0,4584	9/13

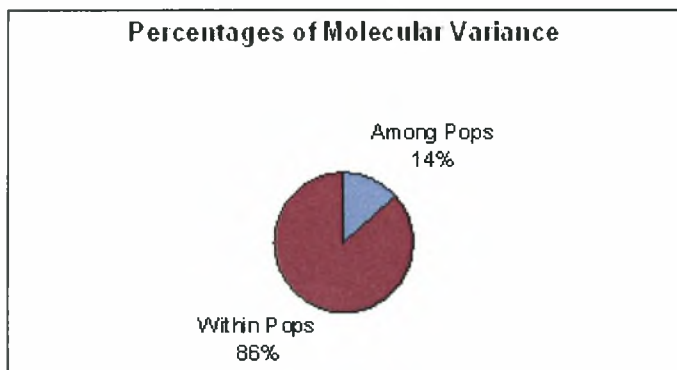
N: μέγεθος δείγματος, n_a : αριθμός αλληλομόρφων, n_e : δραστικός αριθμός αλληλομόρφων

H_o : παρατηρούμενη ετεροζυγωτία, H_e : αναμενόμενη ετεροζυγωτία. HWE: εντός ισορροπίας

Με βάση τον αριθμό των αλληλομόρφων, περισσότερο πολυμορφικά είναι τα δείγματα Αγιάς Λάρισας και Ρωσίας με 3,9231 αλληλόμορφα ανά γενετικό τόπο και λιγότερο πολυμορφικό το δείγμα Κερνίτσας με 2.9231 αλληλόμορφα. Ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (n_e) έδειξε ως πιο πολυμορφικό το δείγμα Ρωσία (2.1962) και λιγότερο την Κερνίτσα (1,8404), η αναμενόμενη ετεροζυγωτία έδειξε το δείγμα Καλλιπεύκη ($H_e = 0,4661$) ως πιο πολυμορφικό, ενώ η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία έδειξε το δείγμα Αγιά Λάρισα ως πιο πολυμορφικό ($H_o = 0,4038$). Με βάση τους τρεις δείκτες φαίνεται ότι λιγότερο πολυμορφικό είναι το δείγμα Κερνίτσα ($n_e=1,8404$, $H_o=0,2906$, $H_e=0,3858$).

Γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών της μύγας της κερασιάς

Ανάλυση μοριακής ποικιλότητας: Η ανάλυση μοριακής ποικιλότητας (AMOVA) που έγινε με την βοήθεια του προγράμματος Genalex έδειξε ότι ένα αρκετά μεγάλο ποσοστό (14%) της παρατηρούμενης ποικιλότητας οφείλεται στην μεταξύ των δειγμάτων ποικιλότητα (Εικόνα 8). Το ποσοστό αυτό είναι ιδιαίτερα υψηλό και δείχνει μια αρκετά μειωμένη γονιδιακή ροή μεταξύ των διαφόρων πληθυσμών.



Εικόνα 8. Ποσοστά μοριακής ποικιλότητας (AMOVA)

Γενετικές αποστάσεις: Με την βοήθεια του προγράμματος Popgene φτιάξαμε τον πίνακα γενετικών αποστάσεων με βάση τις διαφορές γονιδιακών συχνοτήτων, που φαίνονται στον Πίνακα 7 όπου η μεγαλύτερη γενετική απόσταση αποδίδεται μεταξύ Κερνίτσας Καλαβρύτων και Γερμανίας (0,1389), ενώ η μικρότερη μεταξύ των ελληνικών περιοχών Αγιάς Λάρισας και Καρδίτσας (0,0266). Στον ίδιο πίνακα εμφανίζουμε και τον δείκτη Fst (ανα ζεύγος δειγμάτων) που υπολογίστηκε με την βοήθεια του προγράμματος FSTAT και αποκαλύπτει την ομοιογένεια ανά ζεύγος πληθυσμών αν αυτή υπάρχει. Εδώ βλέπουμε τις περιοχές Καλλιπεύκη Λάρισας, Αγιά Λάρισας, Καρδίτσα και Καμάρι Πηλίου να εμφανίζονται ως τμήματα του ίδιου πληθυσμού.

Πίνακας 7. Γενετικές αποστάσεις και FSTs όπως προκύπτουν από τις διαφορές γονιδιακών συχνοτήτων.

Πληθυσμοί	Καλλιπεύκη	Αγιά Λάρισας	Καρδίτσα	Καμάρι	Κερνίτσα	Χανιά	Γερμανία	Ρωσία
Καλλιπεύκη	*****	NS	NS	NS	*	*	*	*
Αγιά Λάρισας	0,0290	*****	NS	NS	*	*	*	*
Καρδίτσα	0,0419	0,0266	*****	NS	*	*	*	*
Καμάρι	0,0417	0,0409	0,0566	*****	*	*	*	*
Κερνίτσα	0,0921	0,1014	0,0620	0,0793	*****	*	*	*
Χανιά	0,0989	0,1276	0,1039	0,1177	0,1180	*****	*	*
Γερμανία	0,0987	0,1209	0,1030	0,0928	0,1389	0,0393	*****	*
Ρωσία	0,0956	0,1307	0,1046	0,1063	0,1170	0,0761	0,0787	****

NS= μη σημαντική διαφορά στην στατιστική ανάλυση μεταξύ των δειγμάτων *σημαντική διαφορά στην στατιστική ανάλυση

Κατασκευή δενδρογράμματος: Με τη μέθοδο UPGMA, και εισάγοντας τις γενετικές αποστάσεις στο πρόγραμμα PHYLIP 3.6C (Felsenstein, 2004) κατασκευάστηκε το δενδρογράμμα (δενδρογράμμα 1). Το δενδρογράμμα αντιπροσωπεύει το πιθανότερο δέντρο, μετά από 100 bootstrap επαναλήψεις.

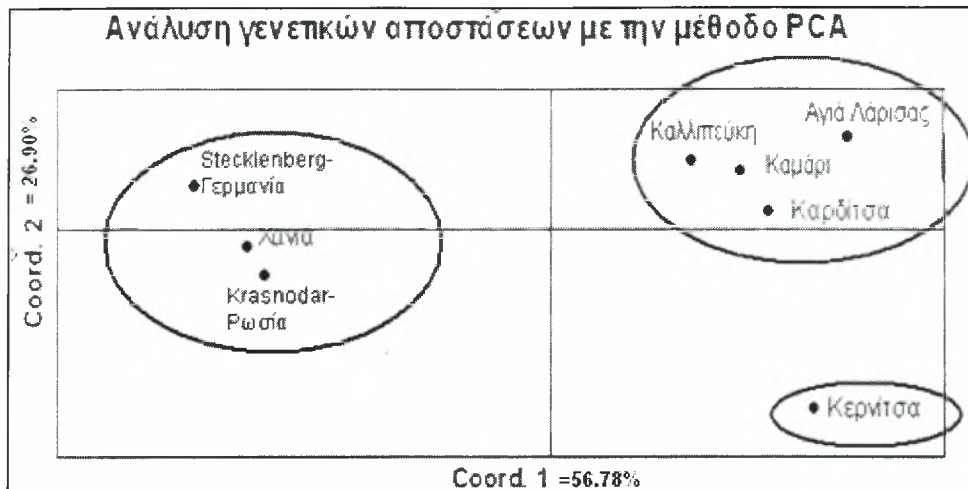


Δενδρογράμμα 1. Σχηματική απεικόνιση γενετικών αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων

Οι επαναλήψεις bootstrap είναι αρκετά υψηλές άρα ενισχύεται η ομαδοποίηση σύμφωνα με το δενδρογράμμα των Θεσσαλικών περιοχών (Καμάρι, Αγιά Λάρισας, Καλλιπεύκη Λάρισας). Ωστόσο το δείγμα της Καρδίτσας σύμφωνα με το δενδρογράμμα αποτελεί έναν κλάδο με την περιοχή της Ρωσίας (αν και παρουσιάζει από τις μικρότερες επαναλήψεις, 58) ενώ η γενετική τους απόσταση σύμφωνα με τον Πίνακα 6 φαίνεται αρκετά υψηλή, πράγμα που δεν δικαιολογεί τον μεταξύ τους κλάδο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει ο κλάδος μεταξύ Γερμανίας – Χανίων με πολύ υψηλή επαναληψιμότητα (89), εικόνα που επαληθεύεται και με την ανάλυση PCA που ακολούθησε.

Principal Components Analysis: Για μια καλύτερη απεικόνιση των γενετικών αποστάσεων των δειγμάτων μας έγινε ανάλυσή τους με τη μέθοδο PCA μέσω του προγράμματος Genalex (Εικόνα 9). Φάνηκε πως οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των δειγμάτων της μύγας της κερασιάς τόσο μεταξύ πληθυσμών του ελληνικού χώρου όσο και μεταξύ ελληνικών και ευρωπαϊκών περιοχών είναι πολύ υψηλές. Βλέπουμε την δημιουργία τριών ομάδων: α) των θεσσαλικών περιοχών: Καμάρι, Αγιά Λάρισας, Καλλιπεύκη Λάρισας, Καρδίτσα (η Καρδίτσα εντάσσεται και πάλι στον ίδιο κλάδο με τις υπόλοιπες θεσσαλικές περιοχές σε αντίθεση με το δενδρογράμμα), β) των ευρωπαϊκών: Ρωσία, Γερμανία με τα Χανιά και την τρίτη γ) να αποτελείται μόνο από την Κερνίτσα Καλαβρύτων. Είναι χαρακτηριστική η πολύ μεγάλη γενετική

απόσταση μεταξύ των δειγμάτων που απέχουν και γεωγραφικά. Ωστόσο παρατηρούμε την ελληνική περιοχή των Χανίων να απέχει γενετικά αρκετά από τις ελληνικές περιοχές και να ομαδοποιείται με τις ευρωπαϊκές.



Εικόνα 9. Ανάλυση γενετικών αποστάσεων με PCA ;

Συσχέτιση Γεωγραφικής-Γενετικής απόστασης (isolation by distance): Ένας από τους κύριους παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε γενετική διαφοροποίηση είναι η γεωγραφική απόσταση. Για να ελέγξουμε αυτή την υπόθεση για τα δικά μας δεδομένα σχηματίσαμε την μήτρα γενετικών αποστάσεων και γεωγραφικών αποστάσεων και υπολογίσαμε το βαθμό της συσχέτισης τους, μέσω της συνάρτησης Pearson (συντελεστής R) (Εικόνα 10). Υπάρχει αρκετά υψηλή θετική συσχέτιση ($R=0,65112$) που δείχνει πως η γεωγραφική απόσταση μεταξύ των δειγμάτων παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παρατηρούμενη μεγάλη γενετική απόσταση.

Χαρακτηριστικά σημεία του γραφήματος: το σημείο Α όπου οι περιοχές Καρδίτσα και Αγιά Λάρισα που έχουν την μικρότερη γεωγραφική απόσταση χαρακτηρίζονται και από πολύ μικρή γενετική απόσταση, το σημείο Β που αντιπροσωπεύει την μεγάλη γεωγραφική αλλά ταυτόχρονα και μεγάλη γενετική απόσταση μεταξύ των περιοχών Γερμανίας και Κερνίτσας Καλαβρύτων. Το σημείο που παρουσιάζει όμως το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι το σημείο Γ που αντικατοπτρίζει μεν την μεγάλη γεωγραφική απόσταση μεταξύ των περιοχών Χανίων Κρήτης και Γερμανίας και την πάρα πολύ μικρή τιμή γενετικής απόστασης μεταξύ τους δε.

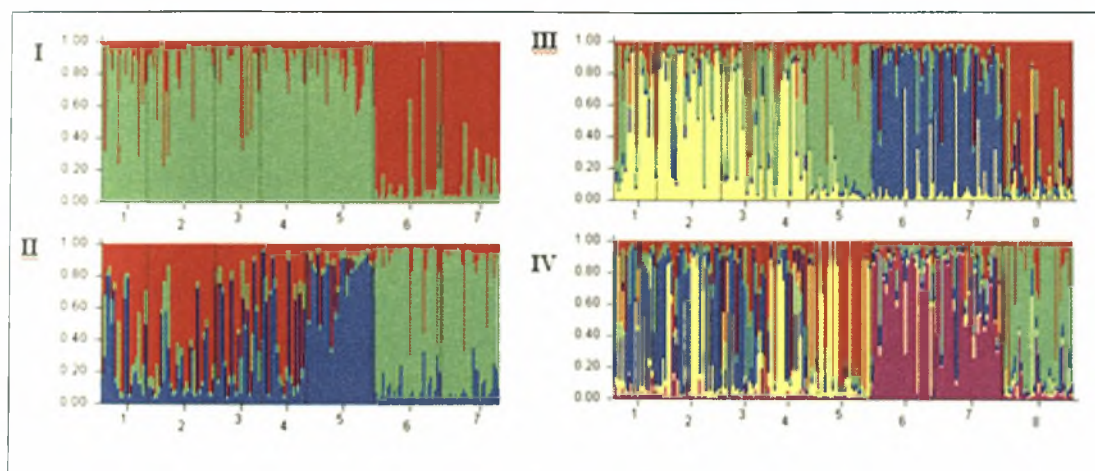


$R=0,65112$

Εικόνα 10. Συσχέτιση γενετικής και γεωγραφικής απόστασης μεταξύ των δειγμάτων, με το δείκτη R του Pearson.

Ωστόσο ενδιαφέρον αποτελεί πως η τιμή του συντελεστή R αν εφαρμόσουμε την συνάρτηση Pearson στους 7 πληθυσμούς χωρίς να συμπεριλαμβάνουμε τα Χανιά αυξάνεται στο 0,850129. Αυτός ο συντελεστής μας δείχνει πολύ πιο έντονα πως η γενετική απόσταση επηρεάζεται σε πολύ μεγάλο βαθμό από την γεωγραφική απόσταση για όλες τις περιοχές, εκτός των Χανίων που εμφανίζει μια ιδιαίτερη σύνδεση με τα Ευρωπαϊκά δείγματα όπως φάνηκε άλλωστε και στο δενδρόγραμμα αλλά και στην ανάλυση PCA.

Εκτίμηση πιθανού αριθμού διακριτών πληθυσμών: Για να καταλήξουμε στον ακριβή αριθμό διακριτών πληθυσμών (clusters) που μπορούν να διαχωριστούν τα άτομα όλων των δειγμάτων ακολούθησε μία Μπαγιεσιανή ανάλυση με την βοήθεια του προγράμματος Structure. Το πρόγραμμα Structure ελέγχει την πιθανότητα να είναι πραγματικός ο αριθμός πληθυσμών που εμείς του ζητάμε να ελέγξει. Υποθέσαμε έναν αριθμό πληθυσμών από $K=1$ έως $K=5$ (Εικόνα 11) και ελέγξαμε όλα τα διαθέσιμα μοντέλα.



Εικόνα 11. Υπόθεση για αριθμό πληθυσμών K όταν: I) $K=2$, II) $K=3$, III) $K=4$, IV) $K=5$

1: Καλλιπεύκη Λάρισας 2: Αγία Λάρισας 3: Καμάρι Πηλίου 4: Καρδίτσα 5: Κερνίτσα Καλαβρύτων 6: Χανιά Κρήτης
7: Γερμανία 8: Ρωσία

Όλα τα μοντέλα μας οδήγησαν στο συμπέρασμα πως την καλύτερη εικόνα δίνει ο διαχωρισμός των ατόμων σε τέσσερα διακριτά clusters-πληθυσμούς (Εικόνα 11^{III}). Στο πρώτο cluster με το κίτρινο χρώμα ομαδοποιούνται οι θεσσαλικοί πληθυσμοί: Καλλιπεύκη Λάρισας, Αγία Λάρισας, Καμάρι Πηλίου και Καρδίτσα. Το δεύτερο αποτελείται από την περιοχή της Κερνίτσας Καλαβρύτων, το τρίτο από την περιοχές Steklenberg της Γερμανίας και των Χανίων Κρήτης και τέλος το τέταρτο cluster αποτελείται από την περιοχή Krasnodar της Ρωσίας. Η εικόνα αυτή που μας δίνει το STRUCTURE επαληθεύει την εικόνα που μας είχε δώσει και η PCA.

5 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η μύγα της κερασιάς, *Rhagoletis cerasi*, αποτελεί το σημαντικότερο εχθρό της κερασιάς σε πολλές ευρωπαϊκές χώρες. Τα τελευταία έτη υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη νέων φιλικότερων προς το περιβάλλον μεθόδων αντιμετώπισης των πληθυσμών της (Katsoyannos et al., 2000).

Παρά το μεγάλο ενδιαφέρον που συγκεντρώνει η μύγα της κερασιάς, σχεδόν τίποτα δεν είναι γνωστό σε γενετικό και μοριακό επίπεδο. Στην παρούσα εργασία με αφορμή την έλλειψη μοριακών – γενετικών εργαλείων για το *R. cerasi* προσπαθήσαμε να αναπτύξουμε μια σειρά μικροδορυφορικών δεικτών μέσω της δια-ειδικής ενίσχυσης διαθέσιμων δεικτών από συγγενικά είδη. Έχει ήδη αποδειχτεί ότι υπάρχει μεγάλη δυνατότητα μεταφοράς των μικροδορυφορικών δεικτών μεταξύ ειδών της οικογένειας Tephritidae, ιδιαίτερα αν τα είδη είναι του ίδιου γένους (Stratikopoulos et al. 2009; Augustinos et al., 2008). Οι μικροδορυφόροι αποτελούν πολύτιμους γενετικούς και μοριακούς δείκτες γιατί είναι υψηλά πολυμορφικοί, άφθονοι και διάσπαρτοι στο γονιδίωμα, εξελικτικά σταθεροί, συνυπερέχοντες Μεντελικοί δείκτες. Όλα αυτά τα χαρακτηριστικά τους κάνουν πολύ χρήσιμα εργαλεία για πληθυσμιακές αναλύσεις. Η εξελικτική τους σταθερότητα τους προσθέτει ένα ιδιαίτερο πλεονέκτημα καθώς η κατασκευή *de novo* μικροδορυφορικών δεικτών είναι μια χρονοβόρα και ακριβή διαδικασία. Πολλές μελέτες στα Tephritidae έχουν δείξει ένα αρκετά υψηλό βαθμό συντήρησης μικροδορυφόρων, ιδιαίτερα μεταξύ ειδών του ίδιου γένους (Baliraine et al. 2003; Augustinos et al. 2008; Stratikopoulos et al., 2009) χωρίς ωστόσο να παρουσιάζεται μια πληθυσμιακή ανάλυση βασισμένη σε αυτούς τους δείκτες (εκτός από Baliraine et al. 2004). Στην Μεσογειακή μύγα, περίπου το 80% των μικροδορυφορικών δεικτών που είχαν αναπτυχθεί για το είδος *Ceratitis capitata* μεταφέρθηκαν μέσω διαειδικής ενίσχυσης σε άλλα είδη *Ceratitis* (Baliraine et al., 2003). Ακόμα στα *Bactrocera* πάνω από το 90% των δεικτών που αναπτύχθηκαν για τα είδη *B. parvayae* και *B. dorsalis* μεταφέρθηκαν σε άλλα *Bactrocera*. Η ίδια προσπάθεια διαειδικής ενίσχυσης ανάμεσα σε είδη διαφορετικών γενών είχε ως αποτέλεσμα τα ποσοστά επιτυχούς μεταφοράς μειώνονταν στο 40% (Shearman et al., 2006). Γενικά τα ποσοστά ποικίλουν από 40% με 90% σε διαφορετικά είδη Διπτέρων, μέσα στο ίδιο γένος, ενώ μειώνονται δραματικά όταν μιλάμε για διαφορετικά είδη (Augustinos et al. 2008; Stratikopoulos et al., 2009).

Ανάπτυξη της διαειδικής ενίσχυσης στο γένος Rhagoletis: Συνολικά οι δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν από όλα τα συγγενικά είδη ήταν 38: (19 ζεύγη από *R. pomonella* (Velez et al.

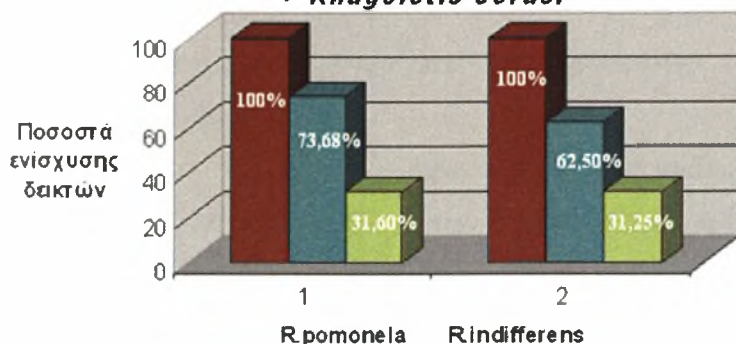
2006), 16 από *R. indifferens* (Maxwell et al. 2009), 2 από *C. capitata* (Stratikopoulos et al. 2009) και 1 από *B. oleae* (Augustinos et al. 2008)}.

Για την χρησιμοποίηση των δεικτών αυτών απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ενίσχυση γονιδιωματικών περιοχών στο *Rhagoletis cerasi*, η ύπαρξη πολυμορφισμού και η ευκολία ανάλυσης και χαρακτηρισμού των αλληλομόρφων. Για το λόγο αυτό αρχικά οι 38 διαθέσιμοι δείκτες ελέγχθηκαν μέσω PCR με μήτρα DNA ένα μίγμα ατόμων *Rhagoletis cerasi*. Τα προϊόντα ηλεκτροφορήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης με κάποιες επαναλήψεις της διαδικασίας αυτής με μεταβολές στις συνθήκες της PCR (για βελτιστοποίηση της εικόνας κάποιων δεικτών).

Στην συνέχεια οι δείκτες που παρουσίασαν ενίσχυση (στην ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης) χρησιμοποιήθηκαν σε μια προκαταρκτική πληθυσμιακή ανάλυση σε ένα δείγμα 20 ατόμων (ανάλυση πολυμορφισμού). Η ανάλυση αυτή έγινε για να αποκαλύψει ποιοι δείκτες είναι οι καταλληλότεροι για να χρησιμοποιηθούν, δηλαδή ποιοι είναι πολυμορφικοί και σε ποιους είναι ευκολότερη η διάκριση των αλληλομόρφων.

Αν και περισσότεροι από το 70% των διαθέσιμων δεικτών (14/19 από *Rhagoletis pomonella* και 10/16 *Rhagoletis indifferens*) παρουσίαζαν καλή εικόνα στην ηλεκτροφόρηση με πήκτωμα αγαρόζης, δεν μπορέσαμε να τους χρησιμοποιήσουμε όλους στην τελική πληθυσμιακή ανάλυση παρά μόνο 6 από την *Rhagoletis pomonella* και 5 από την *Rhagoletis indifferens*. Οι υπόλοιποι ήταν είτε μονομορφικοί είτε δεν παρουσίαζαν καλή εικόνα στο πολυακρυλαμίδιο (ασθενής ενίσχυση, πολλαπλές ζώνες). Η συνολική εικόνα όλων των δεικτών απεικονίζεται στον Πίνακα 3 και στην Εικόνα 12. Για τους δείκτες από την *Ceratititis capitata* (Stratikopoulos et al., 2009) και *Bactrocera oleae* (Augustinos et al., 2008) είχαμε ήδη δεδομένα πρωτοδιάταξης και σχεδιασμένους νέους εκκινητές.

Διαειδική ενίσχυση μικροδορυφορικών δεικτών στο είδος *Rhagoletis cerasi*



Ενίσχυση δεικτών στο είδος προέλευσης.

Ενίσχυση συγκεκριμένων προϊόντων στην ηλεκτροφόρηση αγαρόζης στο *R. cerasi*.

Πολυμορφικοί δείκτες στην ηλεκτροφόρηση σε πολυακρυλαμίδιο στο *R. cerasi*.

Εικόνα 12. Σύγκριση διαειδικής ενίσχυσης δεικτών στο σε σχέση με τα είδη προέλευσης τους.

Στην εικόνα βλέπουμε πως η επιτυχία μεταφοράς των μικροδορυφορικών δεικτών μέσω της διαειδικής ενίσχυσης ξεπερνά και για την *R.pomonella* και για την *R.indifferens* το 30%. Αυτό το ποσοστό χαρακτηρίζεται αρκετά υψηλό και ήταν κάτι αναμενόμενο σύμφωνα με τα ποσοστά ενίσχυσης που έχουν παρατηρηθεί σε πολλές μελέτες που προαναφέρθηκαν για συγγενικά είδη. Η επιτυχία αυτή μεταφοράς καθιστά τους συγκεκριμένους δείκτες εξαιρετικά χρήσιμους προκειμένου να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα στην εκτεταμένη πληθυσμιακή ανάλυση.

Με βάση τα αποτελέσματα της ανάλυσης πολυμορφισμού επιλέχθηκαν δεκατρείς μικροδορυφορικοί δείκτες για την τελική εκτεταμένη πληθυσμιακή ανάλυση σε οχτώ δείγματα μέσου μεγέθους 25 ατόμων. Τα δείγματα από *Rhagoletis cerasi* που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από έξι διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας (Καλλιπεύκη, Αγία Λάρισα, Θεσσαλονίκη, Καρδίτσα, Καμάρι, Κερνίτσα), μια Γερμανική (Stecklenberg) και μια Ρωσική (Krasnodar).

Αποκαλύφθηκε ένας μέσος όρος 5,15 αλληλομόρφων ανά γενετικό τόπο, για τους 13 γενετικούς τόπους που αναλύθηκαν. Ο πολυμορφισμός αυτός δεν χαρακτηρίζεται ιδιαίτερα υψηλός, ωστόσο η μέση ετεροζυγωτία τους εμφανίζεται αρκετά υψηλή, αποδεικνύοντας την χρησιμότητα των δεικτών αυτών για την πληθυσμιακή ανάλυση του είδους.

Ακολούθησε ο έλεγχος των μικροδορυφόρων για το αν βρίσκονται σε ισορροπία κατά H-W, σύμφωνα με το G^2 κριτήριο, για επίπεδο σημαντικότητας 5%. Οχτώ από τους δεκατρείς γενετικούς τόπους έδειξαν απόκλιση από την ισορροπία σύμφωνα με το G^2 κριτήριο. Αυτό μπορεί να αποδοθεί εν μέρει στην έλλειψη γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών του είδους, δεδομένου ότι οι δείκτες για τους οποίους φαινόταν να υπάρχουν null αλληλόμορφα (αλληλόμορφα που ενισχύονται ελάχιστα ή δεν ενισχύονται καθόλου, λόγω μεταλλάξεων στην περιοχή πρόσδεσης των εκκινητών) είχαν ήδη αποκλειστεί από την ανάλυση. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το τεστ ομογένειας (G^2) σύμφωνα με το οποίο κανένας δείκτης από τους 13 δεν μπορεί να επαληθεύσει την υπόθεση πως τα δείγματά μας αποτελούν έναν ομοιογενή πληθυσμό, γεγονός που ενισχύει το συμπέρασμα της μειωμένης γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών.

Στην συνέχεια ακολούθησε ξεχωριστή στατιστική ανάλυση των οχτώ επιμέρους δειγμάτων η οποία έδειξε ότι η πλειονότητα των δεικτών αυτών δεν εμφανίζει ιδιαίτερα προβλήματα, όπως μεγάλες αποκλίσεις από HWE.

Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με βάση τις διαφορές των γονιδιακών συχνοτήτων και βρέθηκαν σχετικά μεγάλες. Το εύρος των αποστάσεων κυμαίνεται από 0,0266 έως 0,1389. Σύμφωνα με τον δείκτη F_{st} (Nm) διαπιστώσαμε πως οι Θεσσαλικοί πληθυσμοί απο-

τελούν πιο ομοιογενή δείγματα και θα μπορούσαν να αποτελούν έναν διακριτό πληθυσμό. Το ίδιο συμπέρασμα προκύπτει και από την ανάλυση PCA όπου έχουμε ένα σαφή διαχωρισμό των δειγμάτων σε τρεις διακριτούς πληθυσμούς 1) τα Θεσσαλικά δείγματα (Καμάρι, Καλλιπεύκη, Αγιά Λάρισας, Καρδίτσα), 2) τα δείγματα Χανιά, Stecklenberg, Krasnodar και 3) η Κερνίτσα Καλαβρύτων.

Η συσχέτιση των γενετικών αποστάσεων με τις γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ των δειγμάτων, με την βοήθεια του γραφήματος Pearson (συντελεστής Pearson= 0,65112) μας βοήθησε στο να διαπιστώσουμε πως και η γεωγραφική απόσταση παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παρατηρούμενη ποικιλότητα για τα δείγματα μας με εξαίρεση τα δείγματα Γερμανίας - Χανίων όπου η μεγάλη γεωγραφική απόσταση δεν αντιπροσωπεύει και την γενετική. Αυτό μας ωθεί να σκεφτούμε πως υπάρχει κάποια ιδιαίτερη επικοινωνία μεταξύ αυτών των 2 περιοχών.

Τέλος μέσω του προγράμματος STRUCTURE γίνεται αντιληπτό πως ο καλύτερος διαχωρισμός των δειγμάτων μας είναι σε 4 διακριτούς πληθυσμούς-clusters. Στον πρώτο ανήκουν όλα τα Θεσσαλικά δείγματα (Αγιά Λάρισας, Καλλιπεύκη Λάρισας, Καρδίτσα και Καμάρι Πηλίου), στον δεύτερο η περιοχή της Κερνίτσας Καλαβρύτων, στον τρίτο η περιοχή Stecklenberg Γερμανίας μαζί με την περιοχή των Χανίων Κρήτης και στον τέταρτο το Ρωσικό δείγμα.

Συγκριτικά με μελέτες σε άλλα Tephritidae του ελληνικού χώρου διαπιστώνουμε πως το έντομο *Rhagoletis cerasi* παρουσιάζει ένα εντελώς διαφορετικό μοντέλο με μια πιο διακριτή δομή των πληθυσμών και πιο υψηλά επίπεδα ποικιλότητας του σε σχέση με το *Bactrocera oleae* και το πολυφάγο *Ceratitis capitata* (τα άλλα Tephritidae του ελληνικού χώρου). Στο γένος *Bactrocera oleae* οι γενετικές αποστάσεις ήταν μικρές αλλά υπήρξε μια σημαντική στατιστική διαφοροποίηση των δειγμάτων σε 3 υποπληθυσμούς (Κύπρος – Ελλάδα, Τουρκία, Ιταλία – Ιβηρική χερσόνησος) με σημαντικό παράγοντα γενετικής ποικιλότητας την γεωγραφική απόσταση (Augustinos et al., 2005). Στο πολυφάγο *Ceratitis capitata* αντίθετα δεν παρουσιάζεται καμιά σαφής ομαδοποίηση, ο ξενιστής όμως φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στην διαμόρφωση της υπάρχουσας γενετικής διαφοροποίησης (Οικονόμου 2006). Τα χαμηλά επίπεδα γενετικής διαφοροποίησης στα δυο αυτά είδη μπορεί να οφείλονται στην συνεχή καλλιέργεια της ελιάς και του εμπορίου των προϊόντων της για το *Bactrocera oleae*, και στο μεγάλο εύρος ξενιστών της *Ceratitis capitata* καθώς και τις πολλές γενιές και των δύο ειδών κάθε χρόνο.

Οι αναλύσεις δείχνουν την ύπαρξη πολύ μεγάλων γενετικών αποστάσεων μεταξύ των δειγμάτων *Rhagoletis cerasi* που συλλέχθηκαν. Η εκτεταμένη αυτή ποικιλότητα στο *Rhagoletis*

cerasi μπορεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Μπορεί να οφείλεται στη γεωγραφική απόσταση, μαζί με τις ιδιαιτερότητες του είδους, όπως η πιθανή μειωμένη μετακίνηση των πληθυσμών του λόγω έλλειψης συνεχόμενης ζώνης καλλιέργειας του ξενιστή (το *Rhagoletis cerasi* είναι ένα ολιγοφάγο έντομο, κυρίως κεράσια και δεν υπάρχει συνεχής καλλιέργεια κερασιών, σε αντίθεση π.χ. με την καλλιέργεια ελιάς). Ακόμα ένα πολύ ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του είδους *Rhagoletis cerasi* είναι η διάπαυση (τους χειμερινούς κυρίως μήνες) και συνεπώς η μία γενεά ανά έτος που επίσης δυσκολεύει την μετακίνηση των πληθυσμών από περιοχή σε περιοχή. Τέλος θα μπορούσαμε να στοχεύσουμε (με επιπλέον μελέτες) ως ένα πιθανό αίτιο της έλλειψης γονιδιακής ροής, την επίδραση του παράσιτου *Wolbachia* που έχει παρατηρηθεί π.χ. στην *Drosophila* πως λόγω της κυτταροπλασματικής ασυμβατότητας που προκαλεί στα έντομα εμποδίζει την εκκόλαψη αυγών που προκύπτουν από μολυσμένα αρσενικά (Bourtzis et al., 1996).

5.1 Συμπεράσματα

Η παρούσα εργασία αποτελεί την πρώτη προσπάθεια ανάπτυξης μικροδορυφορικών δεικτών στο γένος *Rhagoletis* μέσω διαειδικής ενίσχυσης. Γίνεται εμφανές πως η διαειδική ενίσχυση μπορεί να βοηθήσει στην άμεση ανάπτυξη λειτουργικών μικροδορυφορικών δεικτών στο γένος *Rhagoletis* μειώνοντας τον χρόνο που απαιτείται για την ανάπτυξη *de novo* δεικτών. Ακόμα οι δείκτες που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία αποτελούν πολύ χρήσιμα εργαλεία για την ανάλυση των φυσικών πληθυσμών της μύγας της κερασιάς. Το γεγονός ότι πάνω από το 30% των μικροδορυφορικών δεικτών που αναπτύχθηκαν στο είδος *Rhagoletis indifferens* (5/16) και ομοίως για τους δείκτες που αναπτύχθηκαν στο *Rhagoletis pomonella* (6/19) έδωσαν αποτελέσματα μας δείχνει πως υπάρχει ήδη αρκετό υλικό για την ανάλυση και άλλων ειδών *Rhagoletis*.

Το αποτέλεσμα των αναλύσεων στην παρούσα εργασία έδωσαν μια διακριτή δομή των φυσικών πληθυσμών του είδους σε 4 clusters, με ιδιαίτερη έμφαση να δίνεται στο cluster που αποτελείται από τα δείγματα της Γερμανίας και της περιοχής των Χανίων Κρήτης παρά την μεγάλη τους γεωγραφική απόσταση. Η στενή αυτή σχέση μεταξύ των Χανίων και του Stecklenberg Γερμανίας θα μπορούσε πιθανόν να οφείλεται στο εμπόριο κερασιών μεταξύ των δύο αυτών περιοχών που είχε ως αποτέλεσμα την μεταφορά του πληθυσμού από την μία περιοχή στην άλλη. Πιο πιθανή διαδρομή θα ήταν η μεταφορά του πληθυσμού από την Γερμανία στην Ελλάδα αφού οι γενετικές αποστάσεις του Χανιώτικου δείγματος από τις άλλες ελ-

ληνικές περιοχές είναι πολύ μεγαλύτερες σε σχέση με τις μεταξύ των ελληνικών περιοχών γενετικές αποστάσεις.

Η παρούσα εργασία μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βάση για περαιτέρω αναλύσεις που θα αποτελούνται από κυρίως περισσότερα δείγματα από διάσπαρτες περιοχές της Ελλάδας και άλλων ευρωπαϊκών περιοχών για μια ακόμα καλύτερη εικόνα της δομής του είδους *Rhagoletis cerasi*.

6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aketarawong, N., Bonizzoni, M., Thanaphum, S., Gomulski, L.M., Gasperi, G., Malacrida, A.R. & Guglielmino, C.R. 2007, "Inferences on the population structure and colonization process of the invasive oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* (Hendel)". *Molecular Ecology*, vol. 16, no. 17, pp. 3522-3532.

Arthofer W., Krumböck S., Schuler H., Rasool B., Riegler M., Köppler K. and Stauffer C. (2009) Thirteen new microsatellite loci in *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae), a model host species for *Wolbachia* symbiosis in field populations. *Molecular Ecology Resources* 9, 1460-1466.

Ashburner M (1989) *Drosophila: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Augustinos, A.A., Mamuris, Z., Stratikopoulos, E., D'Amelio, S., Zacharopoulou, A. & Mathiopoulos, K.D. 2005, "Microsatellite analysis of olive fly populations in the mediterranean indicates a westward expansion of the species", *Genetica*, vol. 125, no. 2-3, pp. 231-241.

Augustinos, A.A., Stratikopoulos, E.E., Drosopoulou, E., Kakani, E.G., Mavragani-Tsipidou, P., Zacharopoulou, A. & Mathiopoulos, K.D. 2008, "Isolation and characterization of microsatellite markers from the olive fly, *Bactrocera oleae*, and their cross-species amplification in the Tephritidae family.", *BMC genomics*, vol. 9, pp. 618.

Ayala, 1982 *Population and evolutionary genetics: A primer*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 2727 Sand Hill Road Menlo Park, California 94025.

Baliraine, F.N., Bonizzoni, M., Guglielmino, C.R., Osir, E.O., Lux, S.A., Mulaa, F.J., Gomulski, L.M., Zheng, L., Quilici, S., Gasperi, G. & Malacrida, A.R. 2004, "Population genetics of the potentially invasive African fruit fly species, *Ceratitis rosa* and *Ceratitis fasciventris* (Diptera: Tephritidae)", *Molecular Ecology*, vol. 13, no. 3, pp. 683-695.

Baliraine, F.N., Bonizzoni, M., Osir, E.O., Lux, S.A., Mulaa, F.J., Zheng, L., Gomulski, L.M., Gasperi, G. & Malacrida, A.R. 2003, "Comparative analysis of microsatellite loci in four fruit fly species of the genus *Ceratitis* (Diptera: Tephritidae)", *Bulletin of Entomological Research*, vol. 93, no. 1, pp. 1-10.

Bonizzoni M., Malacrida A.R., Guglielmino C.R., Gomulski L.M., Gasperi G. and Zheng L. (2000). Microsatellite polymorphism in the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*. *Insect Mol. Biol.* 9, 251-261

Bonizzoni M., Zheng L., Guglielmino C.R., Haymer D.S. and Gasperi G. (2001). Microsatellite analysis of medfly bioinfestations in California. *Mol. Ecol.* 10: 2515-2524.

Bonizzoni, M., Gomulski, L.M., Mossinson, S., Guglielmino, C.R., Malacrida, A.R., Yuval, B. & Gasperi, G. 2006, "Is polyandry a common event among wild populations of the pest *Ceratitis capitata*?", *Journal of economic entomology*, vol. 99, no. 4, pp. 1420-1429.

Bonizzoni, M., Guglielmino, C.R., Smallridge, C.J., Gomulski, M., Malacrida, A.R. & Gasperi, G. 2004, "On the origins of medfly invasion and expansion in Australia", *Molecular Ecology*, vol. 13, no. 12, pp. 3845-3855.

Bonizzoni, M., Katsoyannos, B.I., Marguerie, R., Guglielmino, C.R., Gasperi, G., Malacrida, A. & Chapman, T. 2002, "Microsatellite analysis reveals remating by wild Mediterranean fruit fly females, *Ceratitis capitata*", *Molecular Ecology*, vol. 11, no. 10, pp. 1915-1921.

Bourtzis K., A. Nirgianaki, G. Markakis and C. Savakis, 1996, *Wolbachia* Infection and Cytoplasmic Incompatibility in *Drosophila* Species. *Genetics*, Vol 144, 1063-1073

Brown T.A. (2002). *Genomes*. Second Edition. BIOS Scientific Publishers Ltd

- Bruford MW and Wayne RK (1993) *Current Opinions in Genetics and Development*, 3: 939.
- Burt DW, Morrice DR, Sewalem A, Smith J, Paton IR, Smith EJ, Bentley J and Hocking PM (2003) Preliminary linkage map of the turkey (*Meleagris gallopavo*) based on microsatellite markers. *Animal Genetics* 34: 399-409.
- Bush, G.L., and Boller, F. 1977. Chromosome morphology of *Rhagoletis cerasi* species complex (Diptera, Tephritidae). *Ann.Entomol. Soc. Am.* 70: 316-318
- Cameron, E.C., Sved, J.A. & Gilchrist, A.S. 2009, "Pest fruit fly (Diptera: Tephritidae) in northwestern Australia: one species or two?", *Bulletin of entomological research*, , pp. 1-10.
- Dib C et al. (1996). A comprehensive genetic map of the human genome based on 5.264 microsatellites. *Nature*, 380: 149-152.
- Dietrich WF, Miller J, Steen R, Merchant MA, Damron-Boles D, Husain Z, Dredge R, Daly MJ, Ingalls KA, O'Connor TJ, Evans CA, DeAngelis MM, Levinson DM, Kruglyak L, Goodman N, Copeland NG, Jenkins NA, Hawkins TL, Stein L, Page DC and Lander ES (1996) A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, 380: 149-152.
- Estoup A, Scholl A, Pouvreau A and Solognac M (1995) Monoandry and polyandry in bumble bees (Hymenoptera: Bombinae) as evidenced by highly variable microsatellites. *Molecular Ecology*, 4: 89-93.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. 2003, "Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies", *Genetics*, vol. 164, no. 4, pp. 1567-1587.
- Felsenstein, J. 1994, PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6.
- Fimiani, P. 1989. Mediterranean region. In *Fruit flies: their biology, natural enemies and control*. Edited by A.S. Robinson and G. Hopper. Elsevier, Amsterdam, the Netherlands. pp. 39-50
- FitzSimmons NN, Moritz C, Moore SS. (1995) Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Mol Biol Evol.* 1995 May;12(3):432-40
- Gasperi G., Goulielmino R.C., Malacrida A.R. and Milani R. (1991). Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata* (Wied.). *Heredity* 67: 347-356.
- Gasperi G, Bonizzoni M, Gomulski LM, Murelli V, Torti C, Malacrida AR and Guglielmino CR (2002) Genetic differentiation, gene flow and the origin of infestations of the medfly, *Ceratitis capitata*. *Genetica*, 116: 125 – 135.
- Gilchrist, A.S., Sved, J.A. & Meats, A. 2004, "Genetic relations between outbreaks of the Queensland fruit fly, *Bactrocera tryoni* (Froggatt) (Diptera: Tephritidae), in Adelaide in 2000 and 2002", *Australian Journal of Entomology*, vol. 43, no. 2, pp. 157-163.
- Goldstein DB, Linares AR, Cavalli-Sforza LL and Feldman MW (1995) An evaluation of genetic distance for use with microsatellite loci. *Genetics*, 139: 463-471.
- Goudet, J. 2001, FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Grichanov Ya.I. & E.I. Ovsyannikova GIS-specialist - M.I. Saulich 2003-2009 Project: «Interactive Agricultural Ecological Atlas of Russia and Neighboring Countries. Economic Plants and their Diseases, Pests and Weeds»
- Harris H (1966) Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of the Royal Society of London*, B 164: 298-310.

Katsoyannos Byron 2008 European Cherry Fruit Fly *Rhagoletis cerasi* (L.), Diptera Tephritidae, Encyclopedia of entomology 2nd edition, page 1367, Capinera John L. editions

Katsoyannos, B.I., Papadopoulos, N.T. & Stavridis, D. 2000, "Evaluation of trap types and food attractants for *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae)", *Journal of economic entomology*, vol. 93, no. 3, pp. 1005-1010.

Katsoyannos, B.I. 1979. Zum Reproduktions und Wirtswahlverhalten der Kirschenfliege, *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae).

Kounatidis, I., Papadopoulos, N., Bourtzis, K. and Mavragani-Tsipidou, P. 2008. Genetic and cytogenetic analysis of the fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera: Tephritidae). *Genome*. 51: 479-491.

Kraaijeveld, K., Katsoyannos, B.I., Stavrinides, M., Kouloussis, N.A. & Chapman, T. 2005, "Remating in wild females of the Mediterranean fruit fly, *Ceratitiscapitata*", *Animal Behaviour*, vol. 69, no. 4, pp. 771-776.

Landsteiner K (1900) Zur Kenntnis der antifermentativen lytischen und agglutinierenden Wirkung des Blutserum und der Lymph. *Zentr. Bacteriol. Parasitenk.*, 27: 357-362,

Lewontin RC and Hubby JL (1966) A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations

Malacrida A.R., Marinoni F., Torti C., Gomulski L.M., Sebastiani F., Bonvicini C., Gasperi G. and Gulielmino C.R. (1998). Genetic aspects of the worldwide colonization process of *Ceratitiscapitata*. *The Journal of Heredity* 89: 501-507.

Matocq MD (2004) Reproductive success and effective population size in woodrats (*Neotoma macrotis*). *Molecular Ecology*, 13: 1635-1642.

Maxwell, S.A., Rasic, G. & Keyghobadi, N. 2009, "Characterization of microsatellite loci for the western cherry fruit fly, *Rhagoletis indifferens* (Diptera: Tephritidae)", *Molecular Ecology Resources*, vol. 9, no. 3, pp. 1025-1028.

Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA Schaffer AA, Tomlin JF, Hutton MK and O'Brien SJ (1999) A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57: 9-23.

Meselson M and Yuan R (1968) DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature*, 217: 1110-1114.

Michel, A.P., Rull, J., Aluja, M. & Feder, J.L. 2007, "The genetic structure of hawthorn-infesting *Rhagoletis pomonella* populations in Mexico: Implications for sympatric host race formation", *Molecular ecology*, vol. 16, no. 14, pp. 2867-2878.

Moore MK and Ball RM (2002) Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne beach, Florida: a microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, 11: 281-288.

Moore SS, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M, Hetzel DJ. (1991) The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*. 1991 Jul;10(3):654-60. Mowat G., Paetkau D., Proctor M. and Strobeck C. (1999) Using genetic trapping to estimate animal population parameters. *Draft*

Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K. & Frati, F. 2005, "Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae)", *Molecular Ecology*, vol. 14, no. 9, pp. 2729-2738.

Nuttall GHF (1904) Blood Immunity and Blood Relationship, Cambridge University Press, Cambridge, England.

Οικονόμου Αικατερίνη Μεταπτυχιακό δίπλωμα ειδίκευσης 2006, Ανάλυση φυσικών πληθυσμών της Μεσογειακής μύγας *Ceratitis capitata* – Διερεύνηση της σχέσης γενοτύπου και των ξενιστών της με την χρήση μικροδορυφορικών δεικτών.

Ozdem A., N. Kilincer 2005 The biology of the European cherry fruit fly [*Rhagoletis cerasi* L (Diptera Tephritidae)]

Peakall, R. & Smouse, P.E. 2006, "GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research", *Molecular Ecology Notes*, vol. 6, no. 1, pp. 288-295.

Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. 2000, "Inference of population structure using multilocus genotype data", *Genetics*, vol. 155, no. 2, pp. 945-959.

Ranson et al. 2004; Wonji et al. 2007 Ranson, H., Paton, M.G., Jensen, B., McCarroll, L., Vaughan, A., Hogan, J.R., Hemingway, J. & Collins, F.H. 2004, "Genetic mapping of genes conferring permethrin resistance in the malaria vector, *Anopheles gambiae*", *Insect Molecular Biology*, vol. 13, no. 4, pp. 379-386.

Raymond M and Rousset F (1995) Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and acumenism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.

Rico et al., 1996). Rico C, Rico I and Hewitt G (1996). 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of the Scientific Society of London. B. Biol. Sci.* 263: 549-557.

Riegler, M. and Stauffer, C. 2002. Wolbachia infections and superinfections in cytoplasmically incompatible populations of the European cherry fruit fly *Rhagoletis cerasi* (Diptera, Tephritidae). *Mol. Ecol.* 11: 2425-2434

Robinson A.S. (2002) Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes. *Genetica* 116: 5-13.

Robinson A.S. and Zacharopoulou A. (1996). Review of Session VI, Genetics/Biochemistry, pp 199-203 in: *Fruit fly Pests. A world assessment of their biology and Management*, edited by B.A. McPherson and G.J. Steck. St. Lucie Press, FL, USA

Roderick D. M Page, 2001 r.page@bio.gla.ac.uk, <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>

Sambrook L, Fritsch EF and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Savkovskii P.P. 1976. Atlas of the pests of fruit and berry plants

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

Schlotterer C and Pemberton J (1994) In: *Molecular Ecology and Evolution: approaches and applications*. Schierwater B, Streit B, Wagner GP and DeSalle R edition, p. 203, Birkhauser, Verlag, Basel.

Schlotterer C, Amos B and Tautz D (1991). Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* 354: 63-65.

Schwarz, D., McPherson, B.A., Hartd, G.B., Boiler, E.F., and Hoffmeister, T.S. 2003. A second case of genetic host races in *Rhagoletis*? A population genetic comparison of sympatric host populations in the European cherry fruit fly, *Rhagoletis cerasi*.

Shearman, D.C.A., Gilchrist, A.S., Crisafulli, D., Graham, G., Lange, C. & Frommer, M. 2006, "Microsatellite markers for the pest fruit fly, *Bactrocera papayae* (Diptera: Tephritidae) and other *Bactrocera* species", *Molecular Ecology Notes*, vol. 6, no. 1, pp. 4-7.

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

Silva, J.G., Meixner, M.D., McPherson, B.A., Steck, G.J. & Sheppard, W.S. 2003, "Recent Mediterranean Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) Infestations in Florida - A Genetic Perspective", *Journal of Economic Entomology*, vol. 96, no. 6, pp. 1711-1718.

Song, S.D., Drew, R.A.I. & Hughes, J.M. 2007, "Multiple paternity in a natural population of a wild tobacco fly, *Bactrocera cacuminata* (Diptera: Tephritidae), assessed by microsatellite DNA markers", *Molecular Ecology*, vol. 16, no. 11, pp. 2353-2361.

Southern EM (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.

Smith Timothy 2003 Washington State University Western cherry fruit fly *Rhagoletis indifferens* and its management in the Pacific Northwest USA:

Stratikopoulos, E.E., Augustinos, A.A., Petalas, Y.G., Vrahatis, M.N., Mintzas, A., Mathiopoulos, K.D. & Zacharopoulou, A. (2008) An integrated genetic and cytogenetic map for the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*, based on microsatellite and morphological markers. *Genetica* 133, 147-157.

Stratikopoulos, E.E., Augustinos, A.A., Pavlopoulos, I., Economou, K., Mintzas, A., Mathiopoulos, K.D. & Zacharopoulou, A. (2009) Isolation and characterization of microsatellite markers from the Mediterranean fruit fly, *Ceratitis capitata*: cross-species amplification in other Tephritidae species reveals a varying degree of motif conservation. *Molecular Genetics and Genomics* 282, 283-306.

Velez, S., Taylor, M.S., Noor, M.A.F., Lobo, N.F. & Feder, J.L. 2006, "Isolation and characterization of microsatellite loci from the apple maggot fly *Rhagoletis pomonella* (Diptera: Tephritidae)

Waldick RC, Kraus S, Brown M and White BN (2002) Evaluating the effects of historic bottleneck events: an assessment of microsatellite variability in the endangered, North Atlantic right whale. *Molecular Ecology*, 11: 2241-2249
Weber JJ (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n, (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-530

Weber JJ (1990) Informativeness of human (dC-dA)_n, (dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics*, 7: 524-530.

White, I.M., and Elson-Harris, M.M. 1992. Fruit flies of economic significance: their identification and bionomics. CAB International, Wallingford, UK

Wonji, C.S., Morgan, J., Coetzee, M., Hunt, R.H., Steen, K., Black IV, W.C., Hemingway, J. & Ranson, H. 2007, "Mapping a Quantitative Trait Locus (QTL) conferring pyrethroid resistance in the African malaria vector *Anopheles funestus*", *BMC Genomics*, vol. 8.

Yeh FC, Yang RC and Boyle T (1999) Popgene version 1.31. Microsoft Window – based Freeware for population genetic analysis.

Zheng L (1997) Microsatellite mapping of insect genomes. In: *Molecular Biology of Insect Disease Vectors: A methods manual*, 321-329. Crampton JM, Beard CB and Louis C Edition. Chapman & Hall

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

Zygouridis, N.E., Augustinos, A.A., Zalom, F.G. & Mathiopoulos, K.D. 2009, "Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers", *Heredity*, vol. 102, no. 4, pp. 402-412.

7 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1. Γενότυπική σύσταση 293 ατόμων για 13 μικροδορυφορικούς δείκτες

Ατομα	RcRp1	RcRp2	RcRp4	RcRp12	RcRp15	RcRp18	Rc	Rc M101	Rc D11b	RcRi 48	RcRi 67	RcRi 83	RcRi 93	RcRi 111
ID = 1 Name = Καλλιτερούκη Λάρισας														
1	AA	DD	AA	AD	AB	CC	BC	BC	..	AC	AA	BB	AB	AA
2	BB	DD	BB	AD	BB	BC	BB	BB	AB	BB	AA	BB	AB	AA
3	BB	DF	AA	AA	AA	DD	AB	AD	AD	AB	AA	BB	AC	AA
4	BB	CD	AA	AD	AB	CC	CC	DD	DD	BB	AB	BB	CC	AA
5	BB	BF	AB	AA	AB	BD	AE	AA	AA	BC	AA	BB	AC	AA
6	..	CD	AA	AA	AA	AB	BC	AD	AD	AB	AA	AB	AC	AA
7	AA	DF	AA	AA	AB	CC	BB	AA	AA	BB	AA	AB	AC	AA
8	AB	DF	AA	DD	AA	BB	BB	AA	AA	BB	AA	BB	BE	AA
9	AA	FH	AA	AC	AA	AD	CC	AC	AC	BB	AB	BB	BB	AA
10	AA	DF	AB	AA	AB	CC	CC	AA	AA	BB	AA	BB	DD	AA
11	BB	BF	AB	AA	BB	DD	AC	AA	AA	BB	AA	AB	AA	AA
12	AB	DD	AB	AD	AA	CC	CC	AA	AA	AB	..	AA	CC	AB
13	AA	DF	AB	AC	BB	DD	BC	AC	AC	CC	AA	BB	CC	AA
14	AA	DF	AA	CD	AA	CC	BD	AA	AA	BB	AA	BB	AB	AA
15	AB	DD	..	AD	AA	AD	..	AA	AA	..	AA	BB	AA	AA
16	AB	CF	AA	DE	BB	AC	BC	AA	AA	AB	AB	AB	BD	AA
17	AB	DD	AA	AC	BB	AC	BB	AA	AA	BB	AA	AB	AB	AA
18	AA	CD	AA	AC	AA	DD	BB	AA	AA	BB	AA	AB	AC	..
19	AA	FF	AA	CD	AB	CC	BC	AA	AA	BD	AA	BB	CE	AA
20	BB	DD	AB	CD	AB	CC	CC	AD	AD	BB	AA	AB	BD	AA
Id = 2 Name = Αγιά Λάρισας														
1	AA	AF	AB	CD	AA	BB	AF	AA	AA	AB	..	AB	CC	AA
2	AB	AD	AA	AA	AA	CC	BB	AC	AC	BB	AA	BB	CC	AA
3	AB	AF	AB	AA	AA	BB	BB	AC	AC	AB	AA	BB	AB	AA

4	AA	AF	AB	AD	AB	BD	BB	AB	BG	AA	BB	BD	AA
5	AC	DF	AA	AA	BB	AA	BB	AA	..	AB	BB	AD	AB
6	AA	AC	AA	DD	BB	AD	BB	AA	AB	BD	AA
7	AB	CD	AA	AA	AB	DD	CC	AA	AB	AA	BB	BC	AA
8	AB	DD	AA	AA	BB	CC	BB	AA	AH	AD	BB	AA	AA
9	BC	DD	AA	AA	AB	CC	BB	AA	AA	AA	BB	AC	AA
10	BB	BD	AB	AA	AB	AB	BB	AA	BB	AA	BB	BC	AC
11	AA	CF	AB	AA	AB	BB	BB	AC	AB	AA	BB	AC	AB
12	AA	FF	AB	AD	AB	BC	BB	AA	BB	AA	AB	BD	AA
13	AA	DF	AB	AD	AB	CC	BB	AA	AB	AA	BB	AC	AA
14	BB	DF	..	AF	AB	CD	BB	AB	CE	AA	BB	AA	AA
15	AB	DF	AB	AC	AB	CC	BB	AA	AB	AA	BB	AB	AA
16	AA	AA	..	CC	BC	AA	AB	..	AB
17	AA	DE	AA	AC	BB	DD	BB	AA	BB	AA	BB	BC	AA
18	AB	DF	AB	AC	AB	DD	BB	AA	BB	AA	BB	AB	AA
19	AA	CF	AA	AA	AB	DD	BB	AA	BB	AA	BB	BC	AA
20	AA	DD	AA	AD	AB	DD	AA	AA	BB	AA	AB	AA	AA
21	AA	DD	AB	CD	AE	CC	BB	AA	BB	AA	AB	AD	AA
22	AA	CF	AB	CD	AB	DD	BB	AA	AB	AA	BB	AC	AA
23	BB	DD	AB	AA	AB	DD	BB	AD	CC	AA	AB	AB	AB
24	AA	HF	AA	AD	AB	BB	BB	AA	BC	AA	AA	AD	AA
25	AB	DF	AA	AD	AB	DD	BC	AA	BB	AA	BB	AC	AA
26	AA	DH	..	AA	AA	CC	BC	AD	BB	AC	AB	AB	AA
27	AB	FF	AA	AA	AA	BB	AB	AD	BB	AA	BB	AC	AA
28	AA	FH	AA	AA	AA	AA	BC	AD	AB	AA	BB	BD	AA
29	AA	FF	AB	AA	AB	AA	..	AA	BB	AA	BB	AC	AB
30	AA	DF	..	AE	AA	BC	BB
Id = 3 Name = Θεσσαλονίκη													
1	AA	CE	AB	DE	AA	BC		AB	BB	AA	BB	AD	AA
2	BB	DE	AA	AD	AB	DD		AA	BB	AA	AB	CC	..
3	AA	CF	AB	AG	AA	AA		AA	BB	AB	BB	BD	AA
4	AB	DF	AB	AC	AA	BB		AC	GH	AC	BB	..	AA
5	BB	DF	BB	AC	AA	CC		AA	BB	AB	BB	CC	AA
6	BB	DD	BB	AD	AB	AA		AA	CC	AA	BB	CC	AA

7	BB	DF	AB	AA	AA	AA	DD	AC	BB	AB	BB	AA	AA
8	BB	DF	AA	AC	AA	AA	BB	AA	BB	AD	AB	BC	AA
9	AB	FF	AA	AA	AA	AA	AA	AA	BH	AA	BB	BC	AC
10	AA	CE	AA	AA	AB	BC	BC	AC	BB	..	BB	..	AA
11	BB	..	BB	CD	AA	CC	CC	AA	BB	..	BB	AA	AA
12	BB	DD	BB	AC	AA	BB	BB	AA	BG	..	BB	AD	AA
13	..	EF	AA	AE	AB	DD	DD	AC	BB	..	AB	AD	AC
14	BB	DD	AA	AD	BB	BC	BC	AC	BH	..	BB	AB	..
15	AB	DF	AB	AC	AA	CD	CD	AB	AB	..	BB	AA	..
16	AB	DF	AB	AE	AB	BB	BB	AA	BB	..	AB
17	AB	DE	AA	AC	AE	CD	CD	AA	BB	..	AB	BB	..
18	AB	..	BB	AC	AA	BB	BB	AA	BB	..	BB
19	AA	BB	AB	AD	AA	BC	BC	AA
Id = 4 Name = Κοδίστρα													
1	BB	DD	AB	AA	AA	BC	BC	AA	BB	AA	BB	AC	AA
2	..	DD	BB	AD	AA	DD	DD	AA	BC	AA	BE	DD	AB
3	BB	DF	AA	AA	AB	BC	BC	AA	BB	AA	BB	BC	AA
4	AB	DD	AB	AD	AA	DD	DD	AA	AA	AA	AB	CC	AA
5	AA	DF	AA	AD	AA	CC	CC	AA	CC	AC	AB	BD	AB
6	AA	DF	AB	AA	AA	DD	DD	CC	BB	AA	BB	CD	AA
7	AA	DF	AA	AD	BB	BC	BC	AA	BE	AA	BB	AH	AB
8	BB	CF	AA	DE	AA	CC	CC	AA	AB	AA	AB	CH	AA
9	AB	DF	AA	AA	..	BC	BC	AA	BB	AA	BB	AD	AA
10	AA	DF	AA	AA	AB	BC	BC	AA	BB	AA	BB	AD	AA
11	AB	DF	AA	AA	AA	CC	CC	AA	BB	AA	AB	BD	AB
12	AA	DF	AB	CC	AA	BB	BB	AA	BB	AA	AB	AA	AA
13	BB	DF	AA	AD	AA	BC	BC	AA	BB	AB	AA	AB	BB
14	AB	CF	AA	AA	AA	CC	CC	AA	AB	AA	BB	CC	AA
15	..	EF	BB	AA	AA	BB	BB	AA	BB	AA	AB	AA	AA
16	AA	DF	AA	AA	AB	CC	CC	AA	BB	AA	BB	CD	AA
17	..	DD	AB	AD	AB	AC	AC	AA	BB	AA	AB	AA	AA
18	BB	DE	AA	AA	AA	BD	BD	AA	AA	AA	AA	AB	AA
19	..	DD	AA	AA	AA	AD	AD	AA	BF	AA	AA	BC	AA
20	AB	DE	AA	AA	AB	BC	BC	AC	BB	AB	BB	AC	AA

Id = 5 Name = Κομάρι Πηλίου											
1	AA	AA	AB	AA	..	CD	CC	AA	BB	AA	AB
2	BB	CD	AB	AA	AC	CC	CC	AA	BB	AA	BB
3	AB	AC	BC	CC	BB	AD	AB	AA	BB
4	AA	DF	AB	AA	AB	DD	BB	AA	BB	AA	BB
5	AB	CD	..	AA	AB	DD	AA	AB	BB	AA	BB
6	BB	CF	AB	AA	AA	CC	AC	AA	BB	AA	BB
7	BB	..	BB	AD	AB	DD	AB	AA	BB	AA	BB
8	BB	DE	BB	AD	AB	DD	BC	..	BB	AA	BB
9	AB	FF	AB	..	BB	DD	AB	AD	BB	AA	BB
10	AA	CE	..	AC	AA	..	BF	AA	BB	AA	BB
11	AA	DF	AB	DD	BB	..	BB	AA	BB	AA	BB
12	AB	FF	AA	AA	AA	BB	BB	AA	BB	AA	BB
13	BB	CD	AB	AA	AB	CC	AA	AA	BB	AA	BB
14	AB	DF	AB	AA	AA	BC	BB	AA	BG	AA	BB
15	AB	DF	AB	AC	AB	DD	BB	AA	BB	AA	..
16	BB	DD	AB	AD	BB	BB	BC	AD	AB	AA	BB
17	AB	DF	AA	AC	AA	DD	BB	AA	AG	AA	BB
18	BB	CE	AB	..	AB	CC	AD	AA	AC	AC	BB
19	AA	DF	AB	..	AA	CC	AB	AA	AB	AC	BB
20	BB	FF	AB	..	AA	BC	AB	AA	BB	AA	BB
Id = 6 Name = Κερνίτσα											
1	BB	CE	AA	AA	AA	BC	CC	AA	BB	AA	AA
2	BB	CE	AA	AA	AA	DD	BB	AA	BB	AA	AB
3	BB	DF	AA	AA	AB	CC	AA	AD	AB	AA	AC
4	BB	DF	AB	AA	AA	DD	AB	AD	BB	AA	AB
5	AB	CF	AA	AA	AA	BC	AB	AA	BF	AA	BB
6	BB	CD	AA	AA	AC	CC	BC	AA	BF	AA	AB
7	AB	CF	AA	AA	AA	DD	BB	AA	CC	AA	AB
8	AB	CE	BB	AA	BC	DD	AD	AA	BB	AA	BB
9	AB	DD	AA	AA	AA	CC	AB	AA	BB	AA	BB
10	BB	DF	AA	AA	AB	BB	AB	AA	BB	AA	AA
11	BB	CD	AA	AA	AB	DD	AA	AA	BB	AA	BB
12	AA	CE	AA	AA	AA	DD	AB	AA	DD	..	BB

13	BB	CD	AA	AA	AC	BC	AA	AB	AA	AB	AA	AD	AA
14	..	DD	AB	AA	AA	DD	AA
15	BB	DD	AA	AA	AA	DD	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA
16	BB	CD	AA	AA	AA	CC	AB	BB	AA	BB	AA	BB	AA
17	BB	DF	BB	AA	AC	CC	AB	AA	AA	AB	AA	AC	AA
18	BB	DD	AA	AA	AA	BC	AC	BB	AA	AB	AA	AA	AA
19	AB	CD	AA	AE	AA	CC	BB	BB	AA	BB	AA	AA	CC
20	AB	CD	AA	AA	AA	CC	AB	FF	AA	AB	AA	BC	AC
21	BB	CD	..	AA	AA	DD	BB	CF	AA	BB	AA	AA	AA
22	BB	CE	..	AA	AB	BC	BB	BB	AA	AB	AA	AC	BB
23	BB	DD	..	AA	AA	BC	BB	BB	AA	AB	AA	AA	AB
24	BB	DE	..	AA	AA	CC	GG	BB	AA	BB	AA	AB	AA
25	BB	DD	..	AA	AC	BB	BC	BB	AA	BB	AA	AA	AB
26	BB	DD	..	AA	AA	CC	BB	..	AA	AA	AA	BC	AC
27	BB	CF	..	AA	AA	DD	AB	FF	AA	AB	AA	BC	AA
28	BB	CC	..	AA	AA	CC	AB	BB	AA	AA	AA	AA	AA
29	AB	CC	AA	AA	AA	DD	AC	FF	AA	BB	AA	BC	AA
30	BB	CD	..	AA	AA	DD	BB	BB	AA	AB	AA	CC	AC
Id = 7 Name = Χανιά													
1	BB	DF	AB	AA	AB	CC	BB	BB	AA	BB	AA	AA	AA
2	AB	BD	AB	AA	AA	CC	BB	BB	AA	BB	AA	EE	AA
3	BC	DE	AA	CC	BE	BB	AB	..	AA	BB	AA	EF	AA
4	BB	BD	AA	AA	..	AC	BB	BB	AA	BB	AA	EE	AA
5	BB	FF	AA	AD	BB	CC	AB	BC	AA	AB	AA	AF	AA
6	BC	..	AB	CC	AA	BC	AB	BB	AA	BB	AD	EF	AC
7	BB	CD	AB	CC	AA	BB	AB	BB	AA	AB	AA	AE	AA
8	AB	CD	AB	AC	AA	BB	BB	BB	AA	AB	AD	AE	AA
9	AC	DD	AA	AC	BE	BC	BB	BB	AA	AB	AA	EE	AC
10	BB	DD	AB	AC	AA	AA	BC	BB	AA	AB	AE	EG	BC
11	BB	..	AB	CC	..	AA	AA	BB	AA	AB	AA	EE	AA
12	..	DE	AA	AA	AB	CC	BB	BB	AA	BB	AA	EE	CC
13	BB	DD	AA	CD	BB	CC	BC	BF	AA	AB	AA	EE	AB
14	BB	BD	..	AC	AA	CC	BB	BB	AA	AB	AD	EG	AA
15	BB	DD	AB	CC	BB	CC	BB	BB	AA	BB	DD	AG	BC

16	BB	DD	AA	AE	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AB	EF	AC
17	AA	DF	AA	AE	AA	DD	BB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	EE	AB
18	AB	AA	AB	CC	BB	AA	CE	AA	BB	AA	BB	EG	..
19	BB	..	AA	AC	AE	BB	AA	AA	BB	AA	BB	AA	AB	EG	..
20	BB	..	AB	CC	AB	CC	AA	CC	CC	AA	AA	AA	AA	EG	..
21	BB	BB	AB	AC	AA	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	EE	AA
22	BB	BB	AB	AC	AA	BC	BB	AA	BC	AA	BB	AA	BB	EE	AA
23	AB	CD	AA	AC	AB	DD	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AC
24	AA	DF	AB	CC	AE	BB	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AB	EG	AA
25	BC	DD	AA	AA	BB	BC	AC	AA	BB	AA	BB	AA	AB	EF	AA
26	BB	CD	AA	AA	BB	CC	AB	AD	BB	AD	BB	AD	AB	EF	AA
27	BB	BD	BB	CC	BB	CC	AA	AA	BB	AD	BB	AD	BB	AE	AA
28	..	CD	AA	AC	BB	CC	..	AA	..	AA	..	AA	BB	EE	AA
29	AB	..	AB	AA	AB	DD	..	AA	AA	AA
30	AB	AA	BE	CC	..	AA
Id = 9 Name = Stecklenberg Γερμανίας															
1	AB	FF	AA	AA	BB	DD	BB	AA	AB	AB	BB	AB	BB	EE	AA
2	BB	DF	BB	AC	AB	AB	BB	AA	AB	AB	BB	AB	BB	EF	AA
3	BB	AD	AB	AC	AB	AC	BB	..	AB	AF	BB	AF	BB	EE	AA
4	BB	AD	..	CD	AA	BC	BB	AA	BB	AB	BB	AB	BB	AF	AA
5	BB	EE	BB	AC	AB	BC	BE	AA	BH	AA	BB	AA	BB	EE	AA
6	AB	DF	AB	AC	AE	CC	AB	AA	BH	BB	BB	BB	BB	AE	AC
7	BB	DD	AB	AC	AC	BB	BB	AC	BE	AA	BB	AA	BB	EE	AA
8	BB	BD	BB	CC	AA	BC	BB	AA	AB	AA	BB	AA	BB	EG	AA
9	BB	DF	AB	AC	..	CC	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	EG	AA
10	AA	CC	AB
11	..	DD	AB	AD	AA	CC	BB	CC	BB	AA	BB	AA	BB	AA	AA
12	BB	DF	AB	CC	AB	CC	AB	AA	AA	AA	BB	AA	BB	GG	AA
13	BB	DF	AA	AC	AB	CC	BB	AA	BB	AB	BB	AB	BB	EG	AA
14	AB	DF	AB	CC	BF	CC	BB	AD	BH	AD	BB	AD	BB	EE	AB
15	BB	DD	AA	AA	AA	..	BB	AA	BB	AA	BB	AA	BB	AG	..
16	..	CE	AB	CC	BB	DD	AB	AA	AA	AA	BB	AA	BB	EE	AB
17	BB	DF	..	AA	AA	AC	BB	AA	AH	AA	BB	AA	BB	AG	AB
18	AB	DF	AA	CC	AB	AC	AA	AA	BB	AA	BB	AA	BB	EE	AA

19	BB	DD	AB	CC	AB	DD	AB	CC	AB	DD	AA	BB	AA	AB	FF	AA
20	BB	DD	AB	AA	AA	BB	BB	AA	BB	BB	AA	AB	AA	BB	GG	AA
21	AA	FF	..	AC	AB	AC	AB	..	AA	BB	AA	BB	AG	AA
22	BC	DD	AA	CD	AB	BC	BC	CD	AB	BC	AB	AB	AB	BB	AE	AA
23	BB	DF	AA	AC	AA	BC	BC	AC	AB	BC	AA	BB	AB	BB	AE	AA
24	..	DF	BB	AC	AA	BC	BC	AC	AA	BC	AA	AB	AA	AB	AG	AA
25	BB	DD	AA	AC	AA	CC	CC	AC	AA	CC	AA	BH	AB	BB	AC	AA
26	BB	DF	AA	AA	AA	CC	CC	AA	AA	CC	AA	BB	AB	BB	FG	AA
27	BB	DF	AB	CC	AA	CC	CC	CC	AA	CC	AA	BB	AB	AB	..	AA
28	BB	DD	AB	AC	BB	CC	CC	AC	BB	CC	AC	BB	AA	BB	EE	AA
29	AA	DD	AA	AD	BB	BC	BC	AD	BB	BC	AA	BB	AB	BB	FG	AA
30	BB	DD	AA	AC	AA	CC	CC	AC	AA	CC	AA	AB	AA	AB	..	AA
31	BC	DF	AB	CC	AB	DD	DD	CC	AB	DD	AD	BH
32	BB	..	AA	CC	AB	CC	CC	CC	AB	CC	..	BB
Id = 10 Name = Krasnodar Ποσότητα																
1	BB	DF	AB	BD	AB	AB	AB	BD	AB	AB	AA	BB	AB	BB	AB	AA
2	BB	BE	BB	CC	DD	DD	DD	CC	DD	DD	BB	BD	AA	AB	BH	AA
3	BB	CD	AB	AA	AA	CC	CC	AA	AA	CC	AA	BB	AA	BB	BH	AA
4	BC	BD	AA	DE	AB	BB	BB	DE	AB	BB	AA	BD	AD	BB	AB	AA
5	BC	AB	AB	CD	AC	AD	AD	CD	AC	AD	BB	BB	AA	BB	AA	AA
6	..	CD	AB	AC	..	BB	BB	AC	..	BB	AA	BB	AA	AB	AA	AA
7	BB	BF	AB	DE	AB	DD	DD	DE	AB	DD	AA	BB	AD	AB	BI	AA
8	BB	CE	AB	CC	AB	AA	AA	CC	AB	AA	AA	BB	AA	AB	BF	AA
9	BB	DF	AB	AC	AB	CC	CC	AC	AB	CC	BB	BB	AC	AB	BF	AA
10	BB	DD	AA	BD	AB	BB	BB	BD	AB	BB	AA	BB	AB	AB	AB	AA
11	BB	DF	AA	BC	AC	CC	CC	BC	AC	CC	AA	BB	AA	AB	BF	AA
12	BB	DD	AB	AD	AB	BB	BB	AD	AB	BB	AA	BB	CC	AB	BB	AA
13	BB	DD	AA	CC	..	BB	BB	CC	..	BB	AA	BD	BC	AB	AA	AA
14	AA	DF	BB	AA	BD	DD	DD	AA	BD	DD	AA	BB	AB	BB	AA	AA
15	BC	EF	AB	DD	BB	BC	BC	DD	BB	BC	AA	BB	AA	AB	AA	AA
16	BB	DF	AA	AC	AB	CC	CC	AC	AD	CC	AA	BB	AD	BB	BC	AA
17	..	DD	AB	AA	BB	BB	BB	AA	BB	BB	AA	BB	AA	AB	BC	AA
18	BB	GF	AA	CC	AB	BB	BB	CC	AB	BB	AA	BB	AD	AB	BC	AA
19	AB	DF	AA	CC	AB	BB	BB	CC	AB	BB	AA	BB	AC	AB	II	AA

20	BB	BD	AA	AC	AB	BB	AB	AA	BB	AC	AB	AD	AA
21	BB	DD	AB	CC	BD	BB	AC	AA	BB	AC	AB	BC	AA
22	BB	DF	AB	DD	AA	BD	BB	AA	BB	AA	BB	AB	AA
23	BB	BD	AB	BD	AB	..	BB	AA	BB	AA	BB	AB	BB
24	BB	DF	AA	BC	AB	DD	BB	AA	BB	AB	BB	BI	AA
25	..	CD	AA	AA	AC	CC	AB	AA	BB	AF	BB	AI	AA
26	BB	DD	AA	DD	BE	BC	AA	AA	BB	AA	AB	II	AA
27	..	CF	..	DD	AC	CC	BB	AA	BB	AB	AB	AA	AA
28	BB	DD	AA	CC	AA	CC	BB	AA	BB	AB	BB	BC	AA
29	BB	DF	AB	AA	AD	BB	..	AA	BB	AA	AB	BB	AA
30	BB	DF	AA	CD	AA	BB	..	AA	BB	AA	AA	BB	BB
31	BB	DF	AB	AA	AB	AA	..	AB	AB	AB	AA
32	..	BF	AA	DD	AA	AA	..	AA	AB	AI	AA

RcRP: *R. pomonella*, RcRi: *R. Indifferens*, RcM: *C. capitata*, RcD: *B. Oleae*