

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ – ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

Ελένη - Παρασκευή Γκέμα

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΔΙΑΓΝΩΣΤΙΚΩΝ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΣΕ
ΦΥΣΙΚΟΥΣ ΠΛΗΘΥΣΜΟΥΣ ΤΟΥ ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2011

Μέλη τριμελούς επιτροπής

- Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Μαμούρης Ζήσης, Καθηγητής Γενετικής Ζωικών Οργανισμών
Τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.
- Παπαδόπουλος Νικόλαος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γεωργικής Εντομολογίας,
Τμήματος Γεωπονίας, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Γονιδιωματικής του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα, κ. Μαθιόπουλο Κωνσταντίνο για την επιλογή του θέματος της εργασίας καθώς και την πολύτιμη καθοδήγηση και βοήθειά του σε όλα τα στάδια εκπόνησης της συγκεκριμένης μελέτης.

Επίσης, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στον υποψήφιο διδάκτορα Ζυγουρίδη Νικόλαο για τη συμβολή του τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους, όσο και κατά τη διάρκεια συγγραφής της μελέτης.

Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα όλα τα μέλη του εργαστηρίου για την άψογη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα που δημιουργήθηκε.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	7
1.1. Ελιά – Εξάπλωση.....	7
1.2. Δάκος – Εξάπλωση.....	8
1.3. Επιπτώσεις της εισβολής νέων ειδών.....	10
1.4. Γενετικοί (μοριακοί) δείκτες στην οικολογία.....	12
ΣΚΟΠΟΣ	18
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	19
2.1. Βιολογικό υλικό.....	19
2.2. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA από ενήλικα άτομα δάκου, με χρήση Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).....	19
2.3. Ενίσχυση της περιοχής ITS1 (νουκλεοτιδική αλληλουχία του εσωτερικά μεταγραφόμενου διαστήματος –Internal Transcribed Spacer-) του rDNA με τη βοήθεια PCR.....	20
2.4. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης (1%).....	22
2.5. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης.....	22
2.6. Απομόνωση ζωνών DNA από πήκτωμα αγαρόζης.....	23
2.7. Ανάκτηση DNA από το ηλεκτροφορημένο πήκτωμα (kit PROMEGA).....	23
2.8. Παρασκευή δ/τος LB broth-amp.....	24
2.9. Παρασκευή φορέα κλωνοποίησης.....	25
2.10. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (miniprep kit -INVITEK).....	25
2.11. Ποσοτικοποίηση φορέα σε gel αγαρόζης (1%).....	26
2.12. Πέψη του φορέα με EcoRV για δημιουργία τυφλών άκρων.....	26
2.13. Καθαρισμός και κατακρήμνιση του κομμένου πλασμιδίου του φορέα.....	27
2.14. PCR για προσθήκη T-άκρων στο κομμένο πλασμίδιο του φορέα.....	28
2.15. Αντίδραση σύνδεσης του ενθέματος με τον φορέα για τη δημιουργία του ανασυνδυσμένου πλασμιδίου.....	29
2.16. Παρασκευή δεκτικών κύτταρων.....	31
2.17. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση.....	32
2.18. Έλεγχος επιτυχίας μετασχηματισμού.....	33
2.19. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA.....	33

2.20. Απομόνωση της περιοχής ITS1 από το πλασμιδιακό DNA με διπλή πέψη με HindIII και EcoRI	34
2.21. Αλληλούχιση.....	35
2.22. Επεξεργασία αλληλουχιών με τα προγράμματα Omiga 2.0 και Clustal W.....	36
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ.....	37
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	38
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	42
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	45
6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	49

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η εξάπλωση του δάκου της ελιάς έχει ακολουθήσει πορεία παράλληλη με αυτή της εξάπλωσης της ελαιοκαλλιέργειας. Η πρόσφατη εισβολή του εντόμου στη Καλιφόρνια, το 1998, και οι τεράστιες οικονομικές συνέπειες που προκάλεσε αυτή, σε συνδυασμό με το γεγονός ότι ο όγκος των εμπορευμάτων που διακινούνται διεθνώς καθώς και οι ρυθμοί διακίνησής τους ολοένα και αυξάνονται, έκαναν εμφανή την επιτακτική ανάγκη ελέγχου των εισβολών αλλόχθονων ειδών σε νέα ενδιαίτηματα. Προς αυτήν την κατεύθυνση είναι απαραίτητη η βαθιά γνώση τόσο της βιολογίας τους, όσο και της δυναμικής των φυσικών πληθυσμών τους και σημαντικό εργαλείο σε αυτή τη προσπάθεια είναι η χρήση των μοριακών δεικτών.

Με αφετηρία τα αποτελέσματα ερευνών που με τη χρήση μικροδορυφορικών γενετικών τύπων, κατάφεραν να διακρίνουν τη φυλογενετική συγγένεια των φυσικών πληθυσμών δάκου, έγινε προσπάθεια στα πλαίσια της παρούσας εργασίας να εντοπιστούν πολυμορφισμοί στην περιοχή ITS1 του rDNA που θα μπορούσαν να αποτελέσουν διαγνωστικούς μοριακούς δείκτες.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. ΕΛΙΑ – ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Η ελιά είναι γνωστή από τους αρχαίους χρόνους. Η εμφάνιση και η καλλιέργειά της φθάνουν στην προϊστορική εποχή. Όσον αφορά στην καταγωγή της, έχουν διατυπωθεί διάφορες απόψεις. Ο A. De Candolle στη μελέτη του “Origin of cultivated plants” (1882), καθώς και άλλοι ιστορικοί συγγραφείς, θεωρούν σαν πιο πιθανό τόπο προέλευσης της ελιάς, τις περιοχές της Συρίας και της Μικράς Ασίας, των οποίων οι βουνοπλαγιές είναι κατάφυτες με αγριελιές. Το στοιχείο όμως αυτό δε θεωρείται καθοριστικό, γιατί αγριελιές συναντώνται διάσπαρτες σ’ όλη τη λεκάνη της Μεσογείου, στα βόρεια παράλια της Αφρικής, στην Ισπανία, τη Νότια Ιταλία, στην Ελλάδα και κυρίως στην Τουρκία. Άλλοι πιστεύουν ότι η ελιά προέρχεται από την Αφρική (Αβησσυνία, Αίγυπτος). Από κει διαδόθηκε στην Κύπρο και στα βόρεια παράλια της Αφρικής (Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία και αλλού) από τους Φοίνικες που παρουσίασαν σημαντική ακμή στην Καρχηδόνα (Κατσόγιαννος, 1992). Ο ιστορικός Θεόφραστος αναφέρει ότι η ελιά φύτευε στην Κυρηναϊκή χερσόνησο, στη Νότια Ιταλία, στη Συρία και Αραβία (προς τη μεριά της θάλασσας), στην Αίγυπτο και αλλού. Στις χώρες αυτές βρέθηκαν ευρήματα που μαρτυρούν τη διασπορά της εξάπλωσης του δέντρου.

Η καλλιέργεια της ελιάς στην αρχαία Ελλάδα ξεκίνησε από την Κρήτη γύρω στο 3500 π.Χ., αλλά σύντομα επεκτάθηκε και στις υπόλοιπες περιοχές. Πολλοί ερευνητές ισχυρίζονται ότι η ύπαρξη των πρώτων άγριων ελαιόδεντρων στο νοτιότερο τμήμα του νησιού συνδέεται με τις στενές σχέσεις που είχαν οι κάτοικοι της Κρήτης με τους λαούς των βορείων ακτών της Αφρικής. Στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η ελιά καλλιεργούταν στην αρχαία Ελλάδα τόσο για τη βρώση της όσο και για το λάδι της που χρησιμοποιούταν και ως καλλυντικό, υπάρχουν στην Κνωσό, στη Θήρα, στις Μυκίνες και σε όλες σχεδόν τις ελληνικές πόλεις στις οποίες άκμασε σπουδαίος πολιτισμός κατά της αρχαιότητα.

Οι εμπορικοί δρόμοι και οι επαφές μεταξύ των λαών δημιούργησαν τις προϋποθέσεις διάδοσης αυτής της σημαντικής καλλιέργειας. Κατά τα χρόνια της Ρωμαϊκής αυτοκρατορίας η καλλιέργεια της ελιάς εξαπλώθηκε και στις υπόλοιπες χώρες της Μεσογείου (Γαλλία, Ισπανία, Πορτογαλία κτλ.), ενώ οι πρώτοι άποικοι του νέου κόσμου, με ισπανικές και πορτογαλικές караβέλες, μετέφεραν την ελιά εκεί. Υπάρχουν στοιχεία ότι καλλιεργήθηκε ακόμα και στο Περού, το Μεξικό και την Αργεντινή τον 16ο αιώνα. Στα τέλη του 18ου αιώνα είχε εξαπλωθεί στην Καλιφόρνια, ενώ κατά τον 19^ο αιώνα η καλλιέργεια της ελιάς

εισήχθη και σε αρκετές περιοχές της Αυστραλίας, Νέας Ζηλανδίας και των Νησιών του Ειρηνικού Ωκεανού.

Ανεξάρτητα από την προέλευση και τον τρόπο διάδοσης της ελιάς, είναι γεγονός ότι η καλλιέργειά της εξαπλώνεται συνεχώς. Από την αρχαιότητα όμως μέχρι και σήμερα, εξακολουθεί να παραμένει η βασικότερη καλλιέργεια για την οικονομία των χωρών της λεκάνης της Μεσογείου, όπου συγκεντρώνεται πάνω από το 90% της παγκόσμιας παραγωγής λαδιού και ελαιοκάρπου, γεγονός που κάνει επιτακτική την προστασία της από εχθρούς που μειώνουν την ποιότητα και την ποσότητα της σοδειάς και κυριότερος από αυτούς είναι ο δάκος.

1.2. ΔΑΚΟΣ- ΕΞΑΠΛΩΣΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, ανήκει στην οικογένεια Tephritidae των Δίπτερων. Είναι το σοβαρότερο επιβλαβές έντομο της ελιάς παγκοσμίως.

Τα θηλυκά άτομα του δάκου, προτιμούν να γεννούν σε καρπούς ανέπαφους, όπου δεν έχει γεννήσει άλλο θηλυκό, σε περιόδους όμως μεγάλης προσβολής ή μικρής παραγωγής, κάθε καρπός μπορεί να φέρει και περισσότερα αυγά. Πριν αποθέσει το αυγό, το έντομο φέρνει τα στοματικά του μόρια στο σημείο της οπής και πραγματοποιεί το λεγόμενο «φίλημα της πληγής», κατά το οποίο μεταδίδει το βακτήριο του καρκίνου της ελιάς (*Pseudomonas savastanoi*), το οποίο εμποδίζει την επούλωση της πληγής.



Εικόνα 1.
Ενήλικο άτομο
δάκου πάνω σε
καρπό ελιάς.

Το λάδι που βγαίνει από ελιές προσβεβλημένες από το δάκο είναι υποβαθμισμένης ποιότητας, αυξημένης οξύτητας και έχει οσμή χόματος (Neuenschwander & Michelakis 1978). Οι μεγάλοι καρποί που προορίζονται για επιτραπέζια χρήση καταστρέφονται ως προϊόν και δεν είναι δυνατόν να διατεθούν στην αγορά. Το κόστος που επιφέρει η προσβολή

από δάκο στην παραγωγή ελαιόλαδου και που έχει να κάνει με μείωση της ποσότητας των καρπών, καταστροφή του πολτού και αύξηση της οξύτητας του ελαιόλαδου μπορεί κάποιες φορές να φτάσει έως και το 80% της γεωργικής παραγωγής (Rice, 2000).

Οι περισσότεροι μελετητές του εντόμου συμφωνούν πως ο δάκος και το δέντρο της ελιάς έχουν ακολουθήσει παράλληλες πορείες εξέλιξης και εξάπλωσης στην πάροδο των χρόνων. Η στενή αυτή σχέση οφείλεται στο γεγονός ότι ο δάκος είναι ένα αυστηρά μονοφάγο είδος και οι προνύμφες του τρέφονται αποκλειστικά από το μεσοκάρπιο του ελαιοκάρπου.

Ήδη από τον 3^ο αιώνα π.Χ. υπάρχουν μαρτυρίες για προσβολές του ελαιοκάρπου από το παράσιτο στην περιοχή της ανατολικής Μεσογείου. Η γεωγραφική διασπορά πολλών συγγενικών ειδών στην περιοχή της Ινδίας αποτελεί μια ένδειξη για την πιθανή περιοχή της πρώτης εμφάνισης του είδους, αν και σήμερα εμφανίζει έλλειψη ελαιοδέντρων (Goulielmos *et al.*, 2003). Εκτός από τις μεσογειακές περιοχές της νότιας Ευρώπης, βρίσκεται επίσης στη Βόρειο Αφρική, τα Κανάρια Νησιά, τη Μέση Ανατολή, κατά μήκος των ανατολικών ακτών της Αφρικής ως τη Νότιο Αφρική και γενικότερα σε όλες σχεδόν τις περιοχές όπου φύονται φυτά του γένους *Olea*. (Δήμου, 2002). Αν και η ελιά καλλιεργείται περίπου εδώ και ένα αιώνα στην Καλιφόρνια, ο δάκος εντοπίστηκε για πρώτη φορά στο Los Angeles το 1998 (Rice, 2000). Μέσα σε πέντε χρόνια από την πρώτη σύλληψη του εντόμου στην περιοχή του Los Angeles, το έντομο μεταφέρθηκε σε όλες τις περιοχές της πολιτείας όπου καλλιεργούταν η ελιά (Zalom *et al.*, 2008). Αναλύσεις μικροδορυφόρων (Zygouridis *et al.*, 2009) έδειξαν ότι η εισβολή του εντόμου προερχόταν από το ανατολικό κομμάτι της μεσογειακής λεκάνης. Τα δείγματα από Καλιφόρνια ήταν ως ένα βαθμό διαφορετικά από τα μεσογειακά δείγματα, γεγονός που υποδηλώνει την ύπαρξη φαινομένων όπως η γενετική παρέκκλιση (genetic drift) κατά την εισβολή και εξάπλωση του δάκου στην Καλιφόρνια.

Η μετανάστευση – εξάπλωση του δάκου σε τόσο μακρινές αποστάσεις ήταν αποτέλεσμα της ανάπτυξης του τουρισμού και του διεθνούς εμπορίου. Ο ολοένα αυξανόμενος όγκος των εμπορευμάτων που διακινούνται διεθνώς και οι αυξημένοι ρυθμοί διακίνησής τους, κάνουν πολύ δύσκολο τον έλεγχο και κατ'αυτόν τον τρόπο την αποτροπή εισόδου και εγκατάστασης αλλόχθονων ειδών σε νέα περιβάλλοντα. Μεταφορές προϊόντων που διασχίζουν τον Ατλαντικό και τον Ειρηνικό παρουσιάζουν μεγαλύτερη επικινδυνότητα όσον αφορά στη μεταφορά νέων ειδών και επομένως απαιτούν μεγαλύτερη προσοχή σε σχέση με αυτές που γίνονται εντός του ίδιου ημισφαιρίου (Nugent *et al.*, 2001).

Όσον αφορά στην εξακρίβωση της πορείας εποίκησης του δάκου στον Ευρωπαϊκό χώρο, εκτεταμένη ανάλυση των πληθυσμών του δάκου στην Ευρωπαϊκή πλευρά της λεκάνης της

Μεσογείου αποκάλυψε σχετικά μικρές γενετικές αποστάσεις, που έδειχναν όμως μια στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε τρεις υποπληθυσμούς (Augustinos et al, 2005). Ο πρώτος αποτελούταν από τα δείγματα της Κύπρου, ο δεύτερος από τα δείγματα Ελλάδας, Τουρκίας και Ιταλίας και ο τρίτος από τα δείγματα της Ιβηρικής χερσονήσου. Οι στατιστικές αναλύσεις που έγιναν έδειξαν τη σημαντική επίδραση της γεωγραφικής απόστασης στη δημιουργία αυτών των ομαδοποιήσεων. Οι τρεις αυτές ομάδες χαρακτηρίζονται από διαφορά και στο επίπεδο του πολυμορφισμού, εμφανίζοντας μια καθαρή μείωσή του από την Ανατολή προς τη Δύση. Η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική και με βάση την υπόθεση ότι η πορεία εποικισμού ενός είδους συνοδεύεται από μείωση του πολυμορφισμού, δίνει σημαντικές ενδείξεις για μία προς Δυσμάς πορεία εποίκησης του είδους στον Ευρωπαϊκό χώρο, με πρώτο κέντρο εξάπλωσης την Ανατολική λεκάνη της Μεσογείου (Augustinos et al, 2005).

Το ενήλικο άτομο του δάκου της ελιάς, θεωρείται ότι έχει καλή ικανότητα πτήσης, καθώς όπως έχει καταγραφεί, μπορεί να διανύσει αποστάσεις ως και 10km (Economidou et al., 1978). Οι μετακινήσεις του μπορούν να διακριθούν σε μικρής κλίμακας, μέσα στην κόμη του δέντρου και το εσωτερικό του ελαιώνα για αναζήτηση κατάλληλου καρπού, τροφής και συντρόφου, και μεγάλης κλίμακας μαζικές μετακινήσεις λόγω της παρεννιαυτοφορίας του ελαιόδεντρου (πλήρης καρποφορία κάθε δεύτερη χρονιά). Οι τελευταίες πραγματοποιούνται όταν την άνοιξη, σε μια περιοχή που είχε καλή παραγωγή καρπού, εξέλθουν μεγάλοι αριθμοί ενηλίκων. Τη νέα περίοδο σε αυτήν την περιοχή δεν θα υπάρχουν διαθέσιμοι καρποί για ωσαπόθεση, οπότε τα έντομα πετούν σε αναζήτηση άλλης. Η έλλειψη καρπού μπορεί επίσης να οδηγήσει τα έντομα σε μεταναστεύσεις από πεδινές περιοχές προς περιοχές ημιορεινές και το αντίστροφο (Delrio, 1978), οι ελιές των οποίων, λόγω διαφορετικών κλιματικών συνθηκών, ωριμάζουν σε διαφορετικές περιόδους.

Τα αίτια της εξάπλωσης του δάκου σε νέα οικοσυστήματα, πρέπει να αναζητηθούν όπως και σε πολλές άλλες περιπτώσεις εισβολής αλλόχθονων οργανισμών σε νέα ενδιαίτηματα, στο συνδυασμό της ύπαρξης του κατάλληλου ξενιστή (στην περίπτωση του δάκου η ελιά), με την έλλειψη φυσικών εχθρών (Pimentel D., 2000).

1.3. ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΕΙΣΒΟΛΗΣ ΝΕΩΝ ΕΙΔΩΝ

Τα είδη που εισέρχονται σε ένα οικοσύστημα από ένα άλλο και εγκαθίστανται ονομάζονται αλλόχθονα. Οι λόγοι εισόδου σε ένα οικοσύστημα είναι πολλοί:

1. Φυσικές κινήσεις πληθυσμών και μεταναστεύσεις διαφόρων ειδών πανίδας για εύρεση βιοτόπων, τροφής και αναπαραγωγής.
2. Μετακινήσεις και ενεργητική διασπορά ειδών εξαιτίας των κλιματικών αλλαγών (αύξηση της θερμοκρασίας, φαινόμενο θερμοκηπίου).
3. Γεωλογικές μεταβολές ή μεγάλα έργα, όπως ρήγματα μετά από σεισμούς, διώρυγες, κανάλια που δημιουργούν διόδους ή προσβάσεις μετανάστευσης, πολλές φορές σε συνδυασμό με τις κλιματικές συνθήκες.
4. Διασπορά ζωντανών ειδών: α. Εμπλουτισμοί για ψυχαγωγία, αλιεία, κυνήγι και β. Διάδοση και διασπορά φυτικών ειδών για λόγους διακοσμητικούς ή οικονομικούς.
5. Διαφυγή εισαγόμενων για διατροφή ξένων ειδών ζώων μέσω του εμπορίου, ή διαφυγή από μονάδες εκτροφής (φάρμες, πτηνοτροφεία, δεξαμενές ιχθυοκαλλιέργειών κλπ)
6. Εισαγωγή ξένων μεταλλαγμένων ειδών φυτών σε γεωργικές καλλιέργειες.
7. Εισαγωγή ξένων ειδών για χρήση τους ως σαπροφαγούς αποικοδομητές.
8. Εγκατάσταση ξένων ειδών από ανθρώπους για τη βιολογική ρύθμιση πληθυσμών ή για να χρησιμοποιηθούν ως επικονιαστές.
9. Παθητική μεταφορά με εμπορικές-διακομετακομιστικές δραστηριότητες.
10. Εισαγωγή διαφόρων ειδών για λόγους ερευνητικούς.

Το πρόβλημα με τα αλλόχθονα είδη εμφανίζεται κυρίως όταν η είσοδος είναι βίαιη ή ξαφνική. Όταν δηλαδή έχουμε εισβολή και τα νέα είδη, χωροκατακτητικά ή χωροεπεκτατικά, αρχίζουν να αναπαράγονται πιέζοντας ή και εξαφανίζοντας τα γηγενή-αυτόχθονα είδη. Στα οικοσυστήματα, ιδίως στα απομονωμένα και τα μικρά, χωροκατακτητικά είδη που δε βρίσκουν θηρευτές ή ανταγωνιστές για να συγκρατήσουν την επέκτασή τους, είναι υπαίτια για συνεχή μείωση της βιοποικιλότητας. Η είσοδος ενός και μόνο χωροεπεκτατικού ξένου είδους – εισβολέα, όταν αναπτύσσει μεγάλους φυσικούς πληθυσμούς, μπορεί να δημιουργήσει σ' ένα κλειστό οικοσύστημα μεγάλη διαταραχή, υποβάθμιση και ανατροπή της οικολογικής του ισορροπίας με συνέπειες ακόμη και την κατάρρευσή του.

Γι' αυτόν τον λόγο και οι βιολογικοί «εισβολείς» θεωρούνται από πολλούς οργανισμούς προστασίας του περιβάλλοντος ως η δεύτερη μεγαλύτερη απειλή για τη βιοποικιλότητα παγκοσμίως. Είτε εισάγονται σκοπίμως είτε συμπτωματικά, αυτά τα είδη μπορούν να επιφέρουν καταστροφικές συνέπειες στους ανθρώπους, στα οικοσυστήματα και στα υπάρχοντα φυτικά και ζωικά είδη.

Στις Η.Π.Α., 400 από τα 984 είδη που θεωρούνται υπό εξαφάνιση, έχουν βρεθεί στην κατάσταση αυτή λόγω ανταγωνισμού με εξωτικά είδη ή λόγω θήρευσης τους από αυτά (Wilcove et al.1998). Σε άλλες περιοχές του κόσμου έως και 80% των ειδών υπό εξαφάνιση, απειλούνται λόγω πιέσεων που δέχονται από τα αλλόχθονα είδη (Armstrong 1995). Πολλά άλλα είδη ακόμη κι αν δεν θεωρούνται απειλούμενα επηρεάζονται δυσμενώς από τους «εισβολείς» ή από αλλαγές του οικοσυστήματος που έχουν προκληθεί από αυτούς (Pimentel D., 2000).

Πολλά ζιζάνια, παρασιτικά έντομα και φυτικά παθογόνα θεωρούνται βιολογικοί εισβολείς. Αυτά τα εξωτικά είδη κοστίζουν πάνω από 100 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως στην οικονομία των ΗΠΑ σε απώλειες, καταστροφές και προγράμματα πρόληψης, έγκαιρης ανίχνευσης και ελέγχου των εισβολών (Pimentel, 2000; Mumford, 2002). Σύμφωνα με μια έρευνα (Levine et al., 2003) τουλάχιστον 115 νέα είδη εντόμων αναμένεται να εισαχθούν ακούσια, μέσω του εμπορίου, στις ΗΠΑ τα επόμενα 20 χρόνια. Ακόμη και αν μόνο το 10% αυτών αποδειχθούν επιζήμια, ένα σημαντικό οικονομικό βάρος θα προστεθεί στο ποσό που δαπανάται ήδη για την αντιμετώπιση των συνεπειών της εισβολής αλλόχθονων ειδών.

Εκτός όμως βέβαια από το οικονομικό κόστος, το κόστος για το περιβάλλον είναι ανυπολόγιστο και πολλαπλασιάζεται ραγδαία με το πέρασμα του χρόνου, καθώς τα προβλήματα γίνονται σοβαρότερα και πολυπλοκότερα. Η ανάσχεση της απώλειας βιοποικιλότητας σε παγκόσμιο επίπεδο, θα είναι αδύνατη αν τα χωροεπεκτατικά είδη δεν αντιμετωπιστούν με συντονισμένες δράσεις και κοινές πολιτικές. Προς αυτήν την κατεύθυνση, για τον έλεγχο των φυσικών πληθυσμών των ειδών-εισβολέων, απαιτείται βαθιά γνώση τόσο της βιολογίας τους, όσο και της δυναμικής των φυσικών πληθυσμών τους. Σημαντικό εργαλείο σε αυτή τη προσπάθεια είναι η χρήση των μοριακών δεικτών.

1.4. ΓΕΝΕΤΙΚΟΙ (ΜΟΡΙΑΚΟΙ) ΔΕΙΚΤΕΣ ΣΤΗΝ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Το γενετικό υλικό μεταφέρεται από τους γονείς στους απογόνους με ένα προβλέψιμο τρόπο και για το λόγο αυτό οι γενετικοί δείκτες μας επιτρέπουν να βγάζουμε συμπεράσματα σχετικά με τις σχέσεις των οργανισμών. Στην Μοριακή Οικολογία, η εκτίμηση των γενετικών σχέσεων των οργανισμών λαμβάνει υπόψη της τη μετάβαση συγκεκριμένων αλληλομόρφων μέσα από εκατοντάδες, χιλιάδες ή και εκατομμύρια γενεές. Είναι γνωστό ότι δεν κληρονομείται όλο το DNA με τον ίδιο τρόπο. Οπότε η κατανόηση των διαφορετικών

μεθόδων κληρονομής του DNA είναι κρίσιμη και απαραίτητη πριν την πρόβλεψή μας σχετικά με το πώς συμπεριφέρονται οι διαφορετικές περιοχές του γενετικού υλικού κάτω από πολυάριθμα οικολογικά και εξελικτικά σενάρια.

Οι παράγοντες, σύμφωνα με τους οποίους επιλέγουμε να χρησιμοποιήσουμε συγκεκριμένους γενετικούς δείκτες ως εργαλεία για την παραγωγή δεδομένων και τη διερεύνηση οικολογικών ερωτημάτων είναι πολλοί. Καταρχήν, είναι πολύ σημαντικό να γνωρίζουμε το αναμενόμενο επίπεδο ποικιλομορφίας. Δεδομένου ότι κάποιες γενετικές περιοχές εξελίσσονται πιο γρήγορα από κάποιες άλλες, η επιλογή τους θα βασιστεί από την ταχύτητα που επιθυμούμε να έχουν για να μας δώσουν μια απάντηση στο εξελικτικό ερώτημα που έχουμε θέσει. Σε γενικές γραμμές, όταν διερευνούμε τις σχέσεις μεταξύ στενά συγγενικών οργανισμών πρέπει οι επιλεγόμενοι δείκτες να εμφανίζουν υψηλή ποικιλότητα, ενώ για σχέσεις μεταξύ ατόμων σχετικά απομακρυσμένων απαιτείται ακριβώς το αντίθετο. Παράλληλα υπάρχουν και πρακτικά θέματα που σχετίζονται με την επιλογή των δεικτών, όπως το χρέμα, ο χρόνος και η επιδεξιότητα των ερευνητών.

Για τη μελέτη των φυλογενετικών σχέσεων μεταξύ οργανισμών, πολύτιμη είναι και η συμβολή σύγχρονων μοριακών μεθόδων όπως ενδεικτικά η RAPD, η SSCP, η RFLP και η αλληλούχιση. Στη μέθοδο **RAPD** (Random Amplification of Polymorphic DNA), χρησιμοποιούνται μικροί (συνήθως 10bp), τυχαίοι εκκινητές, οι οποίοι υβριδοποιούνται σε διάφορα σημεία του γονιδιώματος, πολλαπλασιάζοντας σε μία αντίδραση PCR πολυάριθμα τμήματα του DNA, δημιουργώντας ένα ιδιαίτερο πρότυπο ζωνών για κάθε άτομο. Από τις πλέον διαδεδομένες μεθόδους για την ανίχνευση μεταλλάξεων στο DNA και την ανάλυση της ποικιλότητάς του είναι και η μέθοδος των **SSCP** (Single Strand Conformation Polymorphisms), κατά την οποία, το γονιδιωματικό DNA ενισχύεται με PCR παρουσία ενός ραδιενεργά σημασμένου νουκλεοτιδίου. Το προϊόν αποδιατάσσεται και ηλεκτροφορεύεται σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου. Αν υπάρχουν μεταλλάξεις, αλλάζει η κινητικότητα των ενισχυόμενων κομματιών DNA. Η μέθοδος ανάλυσης του πολυμορφισμού του μήκους των θραυσμάτων DNA μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (random fragment length polymorphism) **RFLP**, αναφέρεται στην ποικιλομορφία που παρατηρείται σε ομόλογες αλληλουχίες DNA και εντοπίζεται με την παρουσία διαφορετικών μηκών τμημάτων DNA μετά την πέψη του με περιοριστικά ένζυμα.. Τέλος, η **αλληλούχιση** (sequencing) είναι η μόνη μέθοδος που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό των βάσεων που διαφέρουν μεταξύ των ατόμων. Αυτή είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα της αλληλούχισης του DNA, αφού δεν αφήνει περιθώρια αμφισβήτησης. Συγκρίνοντας δύο αλληλουχίες είναι δυνατόν να

προσδιοριστεί με ακρίβεια το πού και πόσο διαφέρουν. Με αυτό τον τρόπο δίνεται η δυνατότητα να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα όσον αφορά στις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών αλληλομόρφων.

Αλλοένζυμα

Τα αλλοένζυμα ήταν οι πρώτοι δείκτες που ενοποίησαν τη γενετική και την οικολογία στα μέσα της δεκαετίας του 60. Τα αλλοένζυμα ορίζονται ως μια από τις δύο ή περισσότερες μορφές ενζύμου που κωδικοποιούνται από τον ίδιο τόπο. Τα μειονεκτήματά τους σχετίζονται με το γεγονός ότι οι ποικιλότητά τους καθορίζεται αποκλειστικά και μόνο από τις μη-συνώνυμες μεταλλαγές που συμβαίνουν σε επίπεδο DNA και ότι δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε τις εξελικτικές σχέσεις δύο αλληλομόρφων.

Μιτοχονδριακό DNA

Οι γενετικοί δείκτες που εντοπίζονται σε γονιδιώματα οργανιδίων όπως το μιτοχόνδριο, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε διάφορες οικολογικές μελέτες. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) είναι ένα μικρό, δίκλωνο, κυκλικό, υπερελικωμένο μόριο που υπάρχει σε πολλά αντίγραφα μέσα στα μιτοχόνδρια. Από το mtDNA, το οποίο και χαρακτηρίζεται από αξιοσημείωτη συντηρητικότητα ως προς το γονιδιακό του περιεχόμενο, απουσιάζουν τα ιντρόνια από τα γονίδια, ενώ οι διαγονιδιακές αλληλουχίες είναι γενικά μικρές ή απύσες. Οι εξελικτικές αλλαγές που συμβαίνουν είναι συνήθως απλές και αφορούν αντικαταστάσεις βάσεων και μεταλλαγές στο μήκος, οι οποίες συμβαίνουν συνήθως στις μικρές μη κωδικές περιοχές (Avisé et al. 1987).

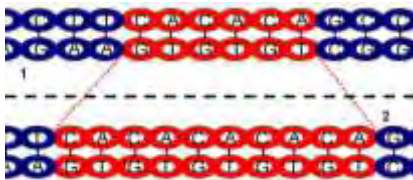
Παρόλο που ποσοτικά το πυρηνικό DNA είναι κατά πολύ μεγαλύτερο από το μιτοχονδριακό (16.000 – 20.000 ζεύγη βάσεων στο μιτοχονδριακό και 10^6 έως 10^9 στο πυρηνικό), στις περισσότερες μελέτες που αφορούν τη δομή πληθυσμών και τη γονιδιακή ροή, τον υβριδισμό, τη βιογεωγραφία και τις φυλογενετικές σχέσεις (Avisé 1994, 2000) έχει χρησιμοποιηθεί το mtDNA, αφού διαθέτει μια σειρά από χαρακτηριστικά, τόσο από εξελικτικής όσο και από τεχνικής άποψης, που το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο σύστημα για την ανίχνευση γενετικών διαφορών σε διαειδικό και ενδοειδικό επίπεδο. Τέτοια χαρακτηριστικά, που αποτελούν και πλεονεκτήματά του είναι:

- 1) Ο εξαιρετικά υψηλός αριθμός αντιγράφων του mtDNA στα κύτταρα
- 2) Το mtDNA είναι πολύ καλά χαρακτηρισμένο σε σχέση με το πυρηνικό

- 3) Ο μητρικός τρόπος κληρονομικότητας του mtDNA, γεγονός που υποδηλώνει ότι μόνο ένας τύπος μιτοχονδρίου είναι παρών σε κάθε άτομο.
- 4) Δεν ανασυνδυάζεται
- 5) Είναι απλοειδές
- 6) Έχει απλή γενετική δομή και σχετικά εύκολο να δουλευτεί σε εργαστηριακό επίπεδο.
- 7) Τα μεταθετά στοιχεία, τα ψευδογονίδια, τα ιντρόνια και το επαναληπτικό DNA απουσιάζουν (Avise et al. 1987).

Μικροδορυφορικές αλληλουχίες

Οι μικροδορυφορικές αλληλουχίες (Microsatellites ή Simple Sequence Repeats, SSRs), είναι πολυμορφικοί γενετικοί τόποι που εντοπίζονται τόσο στο πυρηνικό, όσο και στο γονιδίωμα των οργανιδίων, αποτελούνται από μικρές επαναλαμβανόμενες μονάδες νουκλεοτιδίων μήκους 1-6 βάσεων και έχουν ανιχνευθεί στο γονιδίωμα κάθε οργανισμού που έχει αναλυθεί ως τώρα (Tautz and Schlotterer, 1994). Βρίσκουν ευρεία εφαρμογή στην μοριακή οικολογία, είναι ιδανικοί για τον καθορισμό της πατρότητας, τη διερεύνηση συγγενικών αλληλομόρφων, για μελέτες πληθυσμιακής γενετικής και για χαρτογράφηση ανασυνδυασμών. Η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία είναι συνήθως απλή, αποτελούμενη από 2, 3 ή 4 νουκλεοτίδια (δι-, τρι-, τέτρα-νουκλεοτιδικές επαναλήψεις αντίστοιχα). Το πιο κοινό παράδειγμα μικροδορυφόρου είναι η επανάληψη (CA)_n, όπου το n ποικίλει μεταξύ των αλληλομόρφων.



Εικόνα 2.
Μικροδορυφορική αλληλουχία DNA (CA)_n

Οι μικροδορυφόροι οφείλουν την ποικιλότητά τους στον αυξημένο ρυθμό μεταλλαγής σε σχέση με τις άλλες ουδέτερες περιοχές του γονιδιώματος. Ο υψηλός μεταλλακτικός ρυθμός αποδίδεται σε αυτό που κοινώς είναι γνωστό ως «γλίστρημα» (slippage) της αλυσίδας DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής (Tachida & Iizuka, 1992). Κάποια από τα λάθη που δημιουργούνται από το γλίστρημα μπορεί να διορθωθούν από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του πυρήνα, όμως πολλά «δραπετεύουν» από τη διόρθωση. Μια δεύτερη θεωρία που έχει διατυπωθεί για να εξηγήσει τις αλλαγές στις μικροδορυφορικές αλληλουχίες είναι ο ανασυνδιασμός (Harding et al., 1992). Ο μηχανισμός αυτός μπορεί να οδηγήσει σε

αλλαγή του μεγέθους ενός μικροδορυφόρου είτε με άνισο διασκελισμό είτε με γονιδιακή μετατροπή.

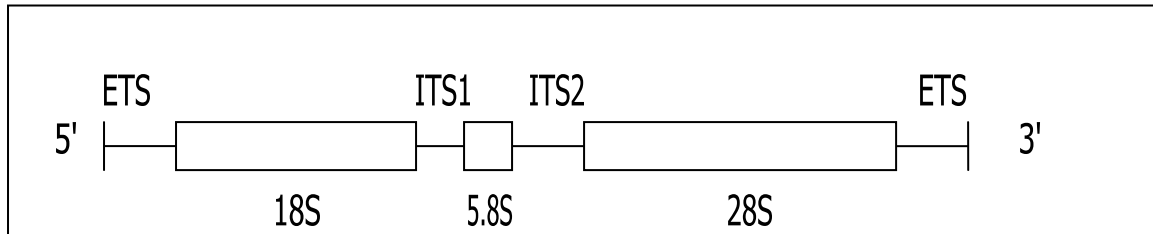
Ανάμεσα στα πλεονεκτήματα που καθιστούν τους μικροδορυφορικούς τόπους πολύ σημαντικά εργαλεία για τις πληθυσμιακές αναλύσεις και τη χαρτογράφηση γονιδίων, είναι ο αυξημένος μεταλλακτικός ρυθμός των μικροδορυφορικών τόπων που οδηγεί σε πολυάριθμα αλληλόμορφα ανά τόπο (πολυμορφισμό), η αφθονία τους στα γονιδιώματα όλων των οργανισμών, η εύκολη χαρτογράφησή τους με *in situ* υβριδοποίηση και το γεγονός ότι η ανάλυσή τους γίνεται με τη χρήση της τεχνικής της PCR. Το τελευταίο σημαίνει ότι απαιτείται ελάχιστη ποσότητα DNA από κάθε άτομο που αναλύεται το οποίο είναι ιδιαίτερα χρήσιμο σε αναλύσεις με πολλούς δείκτες ή σε περιπτώσεις με μειωμένη ποσότητα ή ποιότητα DNA. Αξίζει ωστόσο να σημειωθεί ότι αν και οι μικροδορυφόροι μπορούν να δώσουν απάντηση σε πλήθος ερωτημάτων της πληθυσμιακής γενετικής και να ανιχνεύσουν μικρές διαφορές μεταξύ πληθυσμών, φαινόμενα στενωπού (Waldick *et al.*, 2002), την πορεία εξάπλωσης ενός είδους (Bonizzoni *et al.*, 2002), φαινόμενα εισβολής, γονιδιακής ροής και μετανάστευσης (Meixner *et al.*, 2002; Gasperi *et al.*, 2002) δεν είναι οι κατάλληλοι γενετικοί δείκτες για την εκτίμηση εξελικτικών γεγονότων που συνέβησαν στο μακρινό παρελθόν.

Ριβοσωμικό DNA

Μέσα από συγκριτικές αναλύσεις του ριβοσωμικού DNA έχουν ανακαλυφθεί οι φυλογενετικές σχέσεις μεταξύ ατόμων διαφορετικών ειδών, συγγενών ειδών αλλά και πληθυσμών. Τα γονίδια που κωδικοποιούν rRNA, λόγω της εξαιρετικά αργής εξέλιξης των αλληλουχιών τους, έχουν χρησιμοποιηθεί ως μοριακοί δείκτες, για τη μελέτη αρχαίων εξελικτικών γεγονότων (Hillis & Dixon, 1991). Επιπλέον, η υψηλή συντηρητικότητα των αλληλουχιών αυτών, το φαινόμενο της εναρμονισμένης εξέλιξης, σε συνδιασμό με τον μεγάλο αριθμό αντιγράφων των γονιδίων σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς, επιτρέπει το σχεδιασμό εκκινητών για την ενίσχυση τμημάτων rDNA μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR).

Η οικογένεια γονιδίων του ριβοσωμικού DNA (rDNA), αποτελείται από τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δυο υπομονάδες του ριβοσώματος και τις εξωτερικά (ETS) και εσωτερικά (ITS) μεταγραφόμενες περιοχές. Αν και οι περιοχές ETS και ITS αρχικά μεταγράφονται και αποτελούν μέρος του πρόδρομου μορίου rRNA, προοδευτικά αποκόπτονται και απομακρύνονται και κατ'αυτόν τον τρόπο δεν συμβάλλουν άμεσα στην κατασκευή του ριβοσώματος (Reeder, 1990).

Στους ευκαρυώτες, κάθε μονάδα rDNA περιλαμβάνει τα γονίδια των 18S, 5,8S και 28S ενώ η οργάνωση της οικογένειας των γονιδίων αυτών, είναι αυτή που περιγράφεται στην Εικόνα 3. και συγκεκριμένα 5' ETS, γονίδιο 18S, ITS1, γονίδιο 5.8S, ITS2, γονίδιο 28S και τέλος 3'ETS.



Εικόνα 3. Οργάνωση της οικογένειας γονιδίων του rDNA

Το ριβοσωμικό DNA δεν εξελίσσεται ανεξάρτητα, αλλά αντίθετα, όπως έχει ήδη αναφερθεί, φαίνεται να εξελίσσεται με συντηρημένο τρόπο, τέτοιο που αντίγραφα του είναι όμοια μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους και διαφορετικά μεταξύ διαφορετικών ειδών (concerted evolution). Η εξέλιξη του εξαρτάται από την αλληλεπίδραση μεταξύ της φυσικής επιλογής, της γενετικής παρέκκλισης και των μηχανισμών μοριακής εξισορρόπησης (Dover, 1982).

Από την άλλη πλευρά, το προϊόν της μεταγραφής της περιοχής ITS, το οποίο δεν αποτελεί μέρος του ριβοσώματος στην τελική του μορφή, εξελίσσεται με ταχύτερους ρυθμούς συγκριτικά με τις περιοχές που κωδικοποιούν στοιχεία του ριβοσώματος. Ο βαθμός πολυμορφισμού αυτής της περιοχής, την κάνει κατάλληλη για την ανίχνευση γενετικής ποικιλομορφίας τόσο μεταξύ των γενών ή ειδών όσο και εντός των ειδών (Chen et al., 1999; Gornulski et al., 2006; Qiao et al., 2009, Douglas et al., 2001, Shen Yulong et al., 1998). Διαφορές στην περιοχή ITS1 μιας και μόνο βάσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αναγνώριση είδους.

ΣΚΟΠΟΣ

Όπως προαναφέρθηκε, για τη διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ οργανισμών και την απάντηση οικολογικών ερωτημάτων είναι απαραίτητη η ανάλυση γενετικών δεικτών. Τα δεδομένα όμως από ένα γενετικό τόπο μας επιτρέπουν να ιχνηλατήσουμε την ιστορία ενός μόνο γενετικού τόπου, η οποία είναι πιθανό να μην συμφωνεί με την εξελικτική ιστορία του υπό εξέταση είδους. Για παράδειγμα, εάν η διασπορά ή μετακίνηση ατόμων ενός πληθυσμού γίνεται μόνο από τα αρσενικά άτομα, ενώ τα θηλυκά παραμένουν στάσιμα, τότε τα δεδομένα του mtDNA θα μας οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με τις μετακινήσεις των ατόμων μεταξύ των πληθυσμών. Η προσέγγιση ωστόσο της γενεαλογίας πολλών γενετικών τόπων, με διαφορετική εξελικτική ιστορία, κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να είναι δυνατή η διερεύνηση της τυχόν ασυμφωνίας μεταξύ του φυλογενετικού δέντρου των γονιδίων και αυτού των ειδών.

Προς αυτήν την κατεύθυνση και με βάση προϋπάρχουσες αναλύσεις τόσο της πληθυσμιακής δυναμικής του δάκου στη λεκάνη της Μεσογείου (Augustinos et al., 2005) όσο και της εισβολής του εντόμου στην Καλιφόρνια (Zygouridis et al., 2009) με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών, η παρούσα εργασία εστίασε στη μελέτη της περιοχής ITS1 του ριβοσωμικού DNA (rDNA) ενήλικων ατόμων δάκου από φυσικούς πληθυσμούς διαφόρων περιοχών. Η προσέγγιση αυτή θα μπορούσε επιπρόσθετα να αποφέρει διαγνωστικούς μοριακούς δείκτες των πληθυσμών του δάκου της ελιάς.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Βιολογικό υλικό

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν δείγματα από φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου *Bactrocera oleae* από διαφορετικές περιοχές (Πίνακας 1).

Πίνακας 1. Προέλευση δειγμάτων μελέτης

a/a	Χώρα προέλευσης δείγματος	Περιοχή προέλευσης δείγματος	Χρονολογία συλλογής δείγματος
1	Η.Π.Α.	California Fresno	
2	Η.Π.Α.	California Los Angeles	
3	Ισπανία	Cordoba	2007
4	Μαρόκο	Ourika	2007
5	Γαλλία		2007
6	Ελλάδα	Δρέπανο Κοζάνης	
7	Ελλάδα	Πήλιο	2007
8	Κύπρος	Λευκωσία	
9	Κύπρος	Πάφος	
10	Ισραήλ	Jerusalem	2007
11	Ισραήλ	Sdeboker	2007

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

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε βασίζεται στο εγχειρίδιο (Technical Bulletin) της εταιρίας Promega.

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα Λύσης Πυρήνων (Nucleic lysis solution),
- Διάλυμα Κατακρήμνισης Πρωτεϊνών (Protein precipitation solution),
- Ισοπροπανόλη,
- Αιθανόλη 70%,
- Διάλυμα Ενυδάτωσης DNA (DNA rehydration solution)

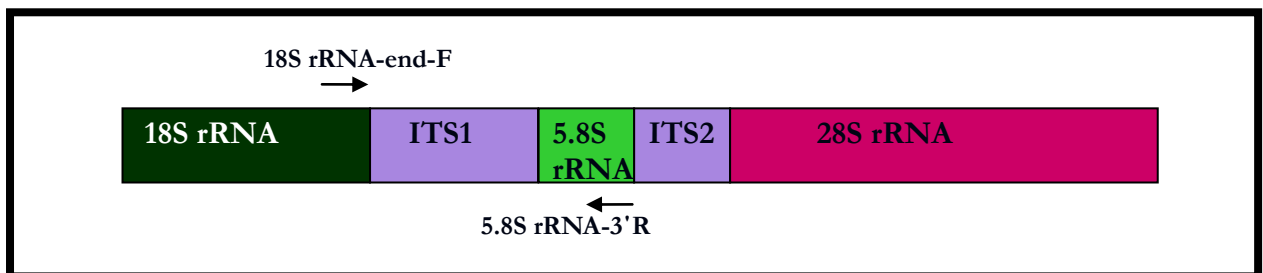
1. Τοποθέτηση ενήλικου ατόμου δάκου σε σωληνάκι eppendorf του 1,5 ml και 200μl Διαλύματος Λύσης Πυρήνων. Με τη βοήθεια πλαστικού εμβόλου γίνεται

ομογενοποίηση και στη συνέχεια εισαγωγή 200 μl Διαλύματος Λύσης επιπλέον, με ταυτόχρονη απόπλυση του οργάνου ομογενοποίησης.

2. Επώαση στους 65°C για 25 λεπτά και στη συνέχεια περίπου 5λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 135μl Διαλύματος Κατακρήμνισης Πρωτεϊνών, και έπειτα από ισχυρή ανάδευση του erpendorf σε συσκευή Vortex, επώαση για 5 λεπτά στον πάγο.
4. Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 14.000 στροφές και μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σημειωμένο erpendorf.
5. Προσθήκη 400μl ισοπροπανόλης και ήπια ανάδευση.
6. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές και απομάκρυνση του υπερκείμενου.
7. Προσθήκη 500μl αιθανόλης 70% στο ίζημα και ήπια ανάδευση.
8. Φυγοκέντρηση για 2 λεπτά στις 14.000 στροφές
9. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου.
10. Ενυδάτωση του ιζήματος με 100μl Διαλύματος Ενυδάτωσης DNA και επώαση στους 65°C για 1 ώρα.
11. Αποθήκευση του DNA σε θερμοκρασία -20°C.

2.3. Ενίσχυση της περιοχής ITS1 (νουκλεοτιδική αλληλουχία του εσωτερικού μεταγραφόμενου διαστήματος –Internal Transcribed Spacer-) του rDNA με τη βοήθεια PCR

Η ενίσχυση της ITS1 περιοχής του rDNA από γονιδιωματικό DNA του εντόμου, πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Γνωρίζοντας την νουκλεοτιδική αλληλουχία της περιοχής αυτής, χρησιμοποιήθηκαν οι κατάλληλοι εκκινητές και συγκεκριμένα: α) **5,8S rRNA-3' R** και β) **18S rRNA-end-F**.



Εικόνα 4. Θέση υβριδοποίησης των εκκινητών

Πίνακας 2. Αλληλουχία εκκινητών PCR για ενίσχυση τμήματος ITS1

Θέση εκκινητή	Αλληλουχία
5,8S 3' R	ATAGTCTTACAACCCTCAACC
18S-End-F	TCCGTAGGTGAACCTGCGG

ΥΛΙΚΑ

- Αποστειρωμένο απιονισμένο νερό
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)
- MgCl₂
- dNTPs
- Εκκινητές
- Taq DNA πολυμεράση (Fermentas)

Η ενίσχυση του τμήματος ITS1 πραγματοποιήθηκε με PCR τελικού όγκου 15μl. Η σύσταση των αντιδραστηρίων και οι συνθήκες φαίνονται στους πίνακες 2 και 3 αντίστοιχα.

Πίνακας 3. Σύσταση PCR τελικού όγκου 15μl

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά δείγμα, για 15μl τελικού όγκου
Αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό	7,88
10X Taq buffer (ρυθμιστικό διάλυμα)	1,5 μl
25 mM MgCl ₂	0,9μl
10 mM dNTP mix	1,2 μl
Εκκινητής I (100μM), (5,8S3'R)	0,7μl
Εκκινητής II (100μM), (18S-end-F)	0,7μl
Taq DNA Polymerase 5units/μl (Fermentas)	0,12 μl
DNA	2μl (50ng/μl)
Τελικός όγκος	15μl

Πίνακας 4. Συνθήκες PCR

Στάδιο	Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94 °C	4 λεπτά	1
Αποδιάταξη	94 °C	30 δευτερόλεπτα	24
Υβριδοποίηση εκκινητών	50 °C	30 δευτερόλεπτα	

Επιμήκυνση	72 °C	45 δευτερόλεπτα	
Τελική επιμήκυνση	72 °C	7 λεπτά	1
Διατήρηση	4 °C	-	-

2.4. Παρασκευή πηκτώματος αγαρόζης (1%)

ΥΛΙΚΑ

- Αγαρόζη
 - TBE 0,5X
 - Βρωμιούχο αιθίδιο
 - Χρωστική
 - Ladder
1. Διάλυση 0,4g αγαρόζης σε 40 ml διαλύματος ηλεκτροφόρησης (0,5X TBE) σε κωνική φιάλη, με θέρμανση στους 100 °C .
 2. Ψύξη του διαλύματος, προσθήκη 1,5μl βρωμιούχου αιθιδίου και ανάδευση.
 3. Τοποθέτηση του διαλύματος στα ειδικά εκμαγεία ηλεκτροφόρησης όπου τοποθετούνται και τα ειδικά χτενάκια ηλεκτροφόρησης, τα οποία θα επιτρέψουν το σχηματισμό των θέσεων τοποθέτησης του DNA στο πήκτωμα (πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης), όταν το πήκτωμα στερεοποιηθεί.
 4. Πολυμερισμός του πηκτώματος σε θερμοκρασία δωματίου για τουλάχιστον 20 λεπτά.

2.5. Ηλεκτροφόρηση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Το προϊόν της PCR (15μl) ηλεκτροφορείται, με σκοπό την εκτίμηση της ποσότητας (Heiling et al., 1974) και της ποιότητας (Thorne, 1966) του DNA που απομονώθηκε από το κάθε άτομο. Η ηλεκτροφόρηση γίνεται σε πήκτωμα αγαρόζης 1 % παρουσία του μάρτυρα μοριακού βάρους Gene Ruler 331 της Fermentas. Το DNA γίνεται ορατό σε υπεριώδες φως, με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου.

1. Στα δείγματα DNA προστίθεται διάλυμα χρωστικής “loading dye”, 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.

2. Σε ένα από τα πηγαδάκια τοποθετείται και ένας μάρτυρας μοριακού βάρους και δίνει ποικίλα τμήματα DNA γνωστών μεγεθών.
3. Το πήκτωμα τοποθετείται στις ειδικές οριζόντιες συσκευές ηλεκτροφόρησης, οι οποίες γεμίζονται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης 0,5X TBE.
4. Οι παράμετροι της ηλεκτροφόρησης ρυθμίζονται ως εξής: η τάση στα 120V περίπου και το ρεύμα στα 45 mA περίπου.
5. Η παρακολούθηση της πορείας της ηλεκτροφόρησης πραγματοποιείται με έκθεση του πηκτώματος σε UV ακτινοβολία.

2.6. Απομόνωση ζωνών DNA από πήκτωμα αγαρόζης

Μετά τον διαχωρισμό των μορίων DNA στο gel αγαρόζης, επιλέγουμε, με τη βοήθεια του μάρτυρα, τις ζώνες που περιλαμβάνουν μόρια DNA μεγέθους 850bp, σε επαρκή ποσότητα, γεγονός που διακρίνεται από το πόσο έντονα φαίνεται η ζώνη.

2.7. Ανάκτηση DNA από το ηλεκτροφορημένο πήκτωμα (kit PROMEGA)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την ανάκτηση - απομόνωση του DNA από τις ζώνες DNA που έχουμε κόψει από το πήκτωμα ηλεκτροφόρησης, βασίζεται στο εγχειρίδιο (Technical Bulletin) της εταιρίας Promega.

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα πρόσδεσης στη μεμβράνη (Membrane binding solution)
 - Διάλυμα πλύσης της μεμβράνης (Membrane wash solution)
 - Υδατικό διάλυμα ελεύθερο νουκλεασών (Nuclease free water)
1. Προσθήκη 10μl «Membrane Binding Solution» για κάθε 10μl πηκτώματος (1: 1).
 2. Ισχυρή ανάδευση σε συσκευή vortex και επώαση στους 50-65°C μέχρι να διαλυθεί το πήκτωμα.
 3. Τοποθέτηση της μικροστήλης «SV Minicolumn», που περιέχεται στο kit, μέσα σε σωληνάκι τύπου erpendorf που επίσης περιλαμβάνεται.
 4. Μεταφορά του διαλυμένου πηκτώματος μέσα στη στήλη και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό.

5. Φυγοκέντρηση στις 14000rpm για ένα λεπτό. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επανατοποθέτηση της μικροστήλης μέσα στο σωληνάκι τύπου erpendorf.
6. Προσθήκη 700μl «Membrane Wash Solution» και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για ένα λεπτό. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και επανατοποθέτηση της μικροστήλης μέσα στο σωληνάκι τύπου erpendorf.
7. Προσθήκη 500μl υδατικού διαλύματος ελεύθερου νουκλεασών και φυγοκέντρηση στις 14000rpm για πέντε λεπτά.
8. Απομάκρυνση του υπερκείμενου και φυγοκέντρηση για ένα λεπτό με ανοικτό το καπάκι (για να εξατμιστεί τελείως η αιθανόλη)
9. Μεταφορά της μικροστήλης μέσα σε καθαρό erpendorf (1,5ml)
10. Προσθήκη 50μl υδατικού διαλύματος ελεύθερου νουκλεασών στη στήλη. Επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για ένα λεπτό. Φυγοκέντρηση στις 14000rpm για ένα λεπτό.
11. Απομάκρυνση του υπερκείμενου της μικροστήλης και αποθήκευση του DNA στους - 20°C ή στους 4°C (για άμεση περαιτέρω επεξεργασία).

2.8. Παρασκευή δ/τος LB broth-amp

Πίνακας 5. Υλικά αντίδρασης

Αντιδραστήριο	Ποσότητα αντιδραστηρίων, για 200ml LB broth-amp
LB broth	3g
NaCl	1g
Ampicilin	200μl
Απιονισμένο νερό	200ml
Τελικός όγκος	200ml

1. Εισαγωγή των στερεών ουσιών σε φιάλη με καπάκι (500ml)
2. Προσθήκη 200ml απιονισμένου νερού
3. Ανάδευση με μαγνητικό αναδευτήρα
4. Αποστείρωση για 20 λεπτά
5. Προσθήκη 200μl ampicilin
6. Διατήρηση στους 4°C

2.9. Παρασκευή φορέα κλωνοποίησης

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα LB broth-amp,
 - *E. coli* DH 5α
1. Εμβολιασμός υποστρώματος (LB broth-amp) με κύτταρα *E. coli* DH 5α με βρόγχο υπό ασηπτικές συνθήκες.
 2. Επώαση στους 37°C στις 210-220rpm για 12-16 ώρες

2.10. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA (miniprep kit -INVITEK)

Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε για την απομόνωση του πλασμιδιακού DNA, βασίζεται στο εγχειρίδιο (Technical Bulletin) της εταιρίας INVITEK.

ΥΛΙΚΑ

- *E. coli* DH 5α:
 - Διάλυμα A
 - Διάλυμα B
 - Διάλυμα C
 - Διάλυμα Πλύσης (Wash Solution)
 - Διάλυμα Έκλουσης
1. Προσθήκη σε δύο σωλήνες τύπου erpendorf από 1,5ml περίπου από την καλλιέργεια *E. coli* DH 5α που έχουμε αφήσει overnight σε υπόστρωμα LB broth-amp.
 2. Φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 14000rpm και απόρριψη υπερκείμενου.
 3. Προσθήκη επιπλέον 1,5ml στον καθένα, φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 14000rpm και απόρριψη υπερκείμενου.
 4. Πλήρης επαναδιάλυση του ιζήματος των κυττάρων σε 250μl Διαλύματος A με Vortex ή με πιπετάρισμα. Δεν θα πρέπει να είναι ορατά συσσωματώματα.
 5. Προσθήκη 250μl Διαλύματος B, και ήπια ανάδευση.
 6. Το στάδιο της λύσης δεν πρέπει να ξεπερνάει τα πέντε λεπτά. Αυτό το στάδιο είναι κρίσιμο για τον διαχωρισμό του βακτηριακού χρωμοσωμικού από το πλασμιδιακό DNA. Μηχανικό στρες από το Vortex ή εκτεταμένη ανάδευση οδηγεί σε αποκοπή υψηλού MB χρωμοσωμικού DNA με αποτέλεσμα τη “μόλυνση” του πλασμιδιακού DNA

7. Προσθήκη 250μl Διαλύματος C, και ήπια ανάδευση.
8. Φυγοκέντρηση στις 14000rpm για πέντε λεπτά.
9. Μετάγγιση του καθαρού υπερκείμενου μέσα στα ειδικά φίλτρα του kit. Επώαση για ένα λεπτό.
10. Φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 10.000 στροφές
11. Απομάκρυνση του διηθήματος. Προσθήκη 750μl Διαλύματος Πλύσης (Wash Solution). Απομάκρυνση του διηθήματος.
12. Φυγοκέντρηση για τρία λεπτά στις 14000rpm.
13. Τοποθέτηση των φίλτρων μέσα σε δύο νέους σωλήνες των 1.5ml και προσθήκη 100μl Διαλύματος Έκλυσης κατευθείαν στο κέντρο του φίλτρου. Επώαση για ένα λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου
14. Φυγοκέντρηση στις 14000rpm για ένα λεπτό για την εξαγωγή του πλασμιδιακού DNA.

2.11. Ποσοτικοποίηση φορέα σε gel αγαρόζης (1%)

Μικρή ποσότητα του φορέα ηλεκτροφορήθηκε σε πήκτωμα αγαρόζης, με σκοπό να προσδιοριστεί η ποιότητα του πλασμιδιακού DNA και η συγκέντρωσή του.

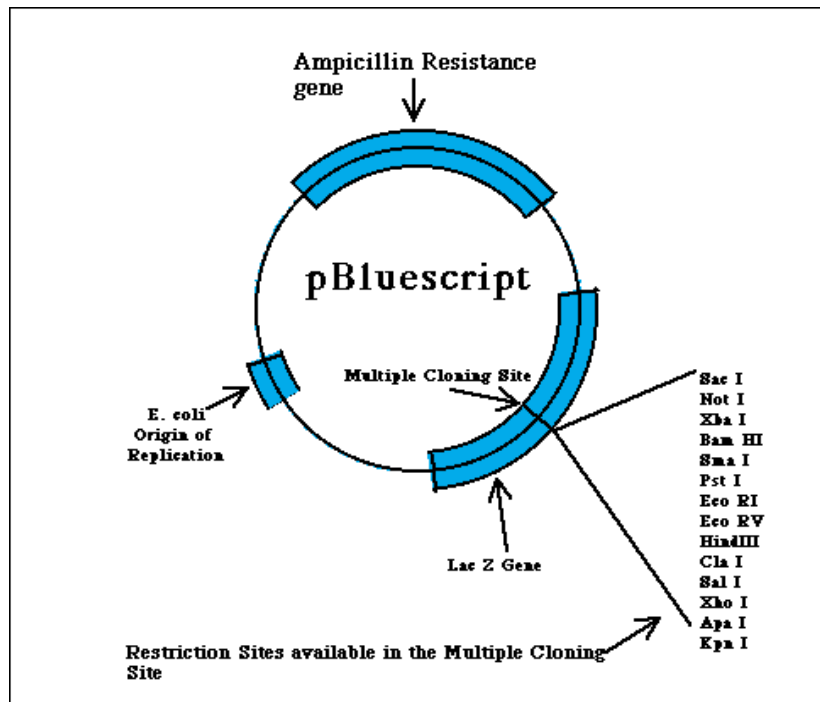
Φόρτωση 1μl DNA του φορέα που απομονώθηκε με 2μl χρωστικής, και ladder (331 Fermentas). Η αναμενόμενη ζώνη εμφανίζεται στις 3kb.

2.12. Πέψη του φορέα με EcoRV για δημιουργία τυφλών άκρων

Η πέψη του φορέα κλωνοποίησης (πλασμίδιο pBS1) γίνεται με το ένζυμο περιορισμού EcoRV, το οποίο αναγνωρίζει την παλίνδρομη ακολουθία του DNA «5'-GAT/ATC-3'», και κόβει το πλασμίδιο στο σημείο που σημειώνεται παρακάτω, με αποτέλεσμα αυτό να γραμμοποιείται.



Το κόψιμο αυτό γίνεται εντός της περιοχής του πολυσυνδέτη (τεχνητή αλληλουχία νουκλεοτιδίων που έχει ενσωματωθεί στο πλασμίδιο, εντός του αναγνωστικού πεδίου του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης).



Εικόνα 5. Πλασμίδιο pBluescript. Διακρίνονται οι θέσεις περιορισμού εντός του πολυσυνδέτη

ΥΛΙΚΑ

- Φορέας pBS1
- Ένζυμο περιορισμού (EcoRV)
- Ρυθμιστικό διάλυμα

Για την πέψη 2μg πλασμιδιακού DNA, χρησιμοποιήθηκαν 0,7μl ενζύμου και 5μl ρυθμιστικού διαλύματος με τελικό όγκο αντίδρασης 50μl. Για την ολοκλήρωση της πέψης, επώαση στους 37°C για 4 ώρες.

2.13. Καθαρισμός και κατακρήμνιση του κομμένου πλασμιδίου του φορέα.

ΥΛΙΚΑ

- Φαινόλη
- Χλωροφόρμιο
- CH₃COONa
- Αιθανόλη 100%
- Γλυκογόνο
- Αιθανόλη 70%

1. Σε 400μl διαλύματος που περιέχει 50μl κομμένου φορέα και 350μl νερού στείρου μικροβίων προσθήκη 400μl φαινόλης-χλωροφόρμιου σε αναλογία 50-50% (200μl φαινόλη και 200μl χλωροφόρμιο).
2. Έπειτα από ανακίνηση και φυγοκέντρηση (3 λεπτά στις 14000rpm), μεταφορά της υδατικής φάσης (της πάνω φάσης) –όπου βρίσκεται το DNA- σε καθαρό σωλήνα τύπου erpendorf, ογκομέτρηση αυτής και προσθήκη ίσου όγκου χλωροφορμίου.
3. Επανάληψη του σταδίου 2.
4. Όμοια, ανακίνηση, φυγοκέντρηση και μεταφορά της υδατικής φάσης σε καθαρό σωλήνα erpendorf. Ογκομέτρηση υδατικής φάσης.
5. Προσθήκη τόσης ποσότητας CH_3COONa (2,31M) ώστε η τελική συγκέντρωση αυτής να είναι 0,3M.
6. Προσθήκη 2,5 όγκους παγωμένης αιθανόλης 100%, και 0,5μl γλυκογόνου για καλύτερη απόδοση.
7. Ήπια ανάδευση με συσκευή vortex, ψύξη των δειγμάτων για 10 λεπτά στους -20°C και φυγοκέντρηση για 15 λεπτά, στις 14000rpm.
8. Προσεκτική απομάκρυνση υπερκείμενου και προσθήκη μισού όγκου αιθανόλης 70%.
9. Ήπια ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 5λεπτά, στις 14000rpm.
10. Απομάκρυνση υπερκείμενου και ξήρανση του ιζήματος που περιέχεται στα erpendorfs με τοποθέτησή τους σε ειδικό θάλαμο στους 40°C μέχρι να στεγνώσουν (περίπου 15 λεπτά).
11. Αναδιάλυση του ιζήματος με 20μl νερό και ανακίνηση σε συσκευή vortex.

2.14. PCR για προσθήκη T-άκρων στο κομμένο πλασμίδιο του φορέα

ΥΛΙΚΑ

Ρυθμιστικό Διάλυμα

MgCl_2

Dttp

Taq DNA πολυμεράση

Πίνακας 6. Σύσταση PCR για προσθήκη T-άκρων, τελικού όγκου 50μl

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά δείγμα, για 50μl τελικού όγκου
Αποστειρωμένο, απιονισμένο νερό	20,5μl
10X <i>Taq</i> buffer (ρυθμιστικό διάλυμα)	5μl
25 mM MgCl ₂	3μl
100 mM dTTP	1μl
<i>Taq</i> DNA Polymerase 5units/μl (Fermentas)	0,5μl
DNA (μετά τον καθαρισμό και κατακρήμνιση του κομμένου πλασμιδίου)	20μl
Τελικός όγκος	50μl

Πίνακας 7. Συνθήκες PCR για προσθήκη T-άκρων

Θερμοκρασία(°C)	Χρόνος
72 °C	2 h και 30min

Μετά την προσθήκη T άκρων, επαναλαμβάνεται η διαδικασία 2.13 για τον καθαρισμό και την κατακρήμνιση με αναδιάλυση του ιζήματος στο τέλος σε 50μl νερό.

Ακολουθεί ποσοτικοποίηση του DNA.

2.15. Αντίδραση σύνδεσης του ενθέματος με τον φορέα για τη δημιουργία του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

ΥΛΙΚΑ

- Φορέας pBS - T vector
- Προϊόν PCR (ένθεμα προς κλωνοποίηση)
- Ρυθμιστικό διάλυμα
- T4 λιγάση

Για να λάβουμε ένα καλό ποσοστό προϊόντων σύνδεσης, στην κλωνοποίηση τμημάτων DNA με τυφλά άκρα, είναι σημαντικό, τόσο ο φορέας όσο και το ένθεμα, να βρίσκονται στην κατάλληλη αναλογία.

Η σύνδεση καταλύεται από το ένζυμο DNA λιγάση, που μπορεί να ενώνει μόρια DNA που έχουν συνεκτικά ή τυφλά άκρα (Sambrook *et al.*, 1989). Χρησιμοποιήθηκε το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T₄, σύμφωνα με τις οδηγίες της παρασκευάστριας εταιρίας. Ακολούθως περιγράφεται η αντίδραση σύνδεσης, σε τελικό όγκο 10 μl (Πίνακας 8). Ο μοριακός λόγος ενθέματος DNA/πλασμιδίου, δηλαδή ο λόγος των προς κλωνοποίηση

μορίων του DNA προς τα μόρια του πλασμιδίου θα πρέπει να είναι από 1:1 έως 3:1. Η ποσότητα του DNA που θέλουμε να κλωνοποιήσουμε υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{ng ενθέματος} = \text{ng φορέα} \times \alpha \times \beta$$

όπου $\alpha = (\text{kb ενθέματος} / \text{kb φορέα})$ και $\beta = \text{μοριακός λόγος ενθέματος/φορέα}$

Στο παρόν πείραμα, το μέγεθος του ενθέματος είναι 0,8kb, του φορέα 3kb, ο λόγος ενθέματος/φορέα 3:1, ενώ ο φορέας 50ng/μl. Επομένως η ποσότητα του ενθέματος, από τον παραπάνω τύπο είναι 40ng.

Πίνακας 8. Σύσταση PCR τελικού όγκου 10μl, για τη δημιουργία ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά δείγμα, για 10μl τελικού όγκου
Φορέας Pbs/BamHI(50ng/μl)	2μl
DNA*/ H ₂ O**	3μl
H ₂ O***	3μl
10X Ρυθμιστικό διάλυμα****	1μl
T4 λιγάση (0,1 Weiss unit)	1μl
Τελικός όγκος	10μl

*βάσει ποσοτικοποίησης

**συμπλήρωση μέχρι τα 3μl με H₂O

*** για να συμπληρωθεί V_{total} 10μl

**** $10 \times V_1 = 1 \times V_{\text{total}} \rightarrow V_1 = 1 \mu\text{l}$

$$(\text{ng vector} \times \text{kb insert}) / \text{kb vector} \times \text{insert/vector} = \text{ng insert}$$

$$\begin{array}{cccc} \downarrow & \downarrow & \downarrow & \downarrow \\ \mathbf{50\text{ng}} & \mathbf{0.8} & \mathbf{3} & \mathbf{3/1} \end{array}$$

$$\rightarrow (50 * 0.8 / 3) * 3 / 1 = 40\text{ng} \text{ (ένθεμα που θέλουμε να βάλουμε)}$$

1. Σωληνάκι τύπου Eppendorf τοποθετείται στον πάγο και προσθέτονται περίπου 100 ng πλασμιδιακού φορέα, ίση ποσότητα από το κατάλληλα κομμένο γονιδιωματικό DNA και H₂O, ώστε ο συνολικός όγκος να είναι 10 μl.
2. Προσθέτονται 1μl 10X bacteriophage T4 DNA ligase buffer.
3. Τελευταία προστίθεται ποσότητα 1μl από το ένζυμο DNA λιγάση του βακτηριοφάγου T4 (0,1 Weiss unit).
4. Επώαση στους 22°C για 2,5 ώρες σε συσκευή PCR.

2.16. Παρασκευή δεκτικών κύτταρων

Η διαδικασία πραγματοποιείται σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Hanahan & Meselson (1983).

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα SOB
 - DH5α (στέλεχος κυττάρων *E. coli*)
 - FSB
 - DMSO (κρυοπροστατευτικός παράγοντας)
1. Με τη βοήθεια βρόγχου, εισάγονται κύτταρα του στελέχους DH5α της *E. coli* σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιέχει 1ml SOB, εμπλουτισμένου με 20mM MgSO₄.
 2. Επώαση overnight στους 37°C και 220 στροφές
 3. Vortex στα κύτταρα
 4. Μεταφορά της καλλιέργειας σε 100ml SOB με 20mM MgSO₄ και επώαση στους 37°C και 220 στροφές για 2 περίπου ώρες.
 5. Πρώτη φωτομέτρηση (O.D.) στα 600nm. (Στο τυφλό φωτομετρείται καθαρό SOB)
 6. Επόμενες φωτομετρήσεις κάθε 10 περίπου λεπτά, μέχρι η οπτική πυκνότητα (OD) να είναι 0,450-0,550.
 7. Όταν συμβεί αυτό, το διάλυμα μοιράζεται σε 2 φιάλες τυπου falcon των 50ml (οι οποίες έχουν παγώσει στους -20°C).
 8. Τοποθέτηση για 10 λεπτά στον πάγο.
 9. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000 στροφές στους 4°C
 10. Απομάκρυνση υπερκείμενου, τοποθέτηση των φιαλών ανεστραμμένων για 1 λεπτό πάνω σε χαρτί για να στεγνώσουν.
 11. Προσθήκη 20ml FSB/falcon. Προσεκτική αναδιάλυση στον πάγο με σιφόνια επίσης παγωμένα
 12. Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 4000 στροφές στους 4°C
 13. Απομάκρυνση υπερκείμενου, τοποθέτηση των φιαλών ανεστραμμένων για 1 λεπτό πάνω σε χαρτί για να στεγνώσουν.
 14. Προσθήκη 4ml FSB/falcon
 15. Προσθήκη 140μl DMSO σε κάθε falcon
 16. Ελαφριά ανακίνηση για 15 λεπτά στον πάγο

17. Προσθήκη επιπλέον 140μl DMSO σε κάθε falcon
18. Μεταφορά του περιεχόμενου των falcon σε σημασμένα παγωμένα eppendorfs (200ml ανά eppendorf) και αποθήκευση στους -80°C

Η παραπάνω διαδικασία γίνεται γρήγορα

2.17. Μετασηματισμός δεκτικών κυττάρων με ηλεκτροδιάτρηση (ELECTROPORATION)

Ο μετασηματισμός των δεκτικών κυττάρων για την εισαγωγή του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου στα κύτταρα, γίνεται με ηλεκτροδιάτρηση (electroporation), κατά την οποία σχηματίζονται παροδικά κανάλια στην κυτταρική μεμβράνη λόγω έκθεσης σε ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο (Neuman *et al.*, 1982).

ΥΛΙΚΑ

- Διάλυμα SOC
- Εναιώρημα δεκτικών κυττάρων *E. coli*
- Εναιώρημα ανασυνδυασμένου πλασμιδίου

Όσον αφορά στην προετοιμασία για την εκτέλεση της μεθόδου, αξίζει να σημειωθεί ότι οι κυβέτες που θα χρησιμοποιηθούν, τοποθετούνται στους 4°C για 1 ώρα για να παγώνουν και το διάλυμα SOC τοποθετείται εκτός κατάψυξης για να αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου.

1. Αραίωση 10% στο διάλυμα που περιέχει το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο
2. Σε 40μl εναιωρήματος δεκτικών κυττάρων προσθήκη 2μl από την αραίωση του εναιωρήματος με το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο. Ήπια ανάδευση (η διαδικασία γίνεται στον πάγο).
3. Τοποθέτηση για ένα λεπτό στον πάγο.
4. Τοποθέτηση στη συσκευή ηλεκτροδιάτρησης (electroporator)
5. Μετά την ηλεκτροδιάτρηση, προσθήκη 1ml διαλύματος SOC στην κυβέτα (δεν πρέπει να περάσει πάνω από ένα λεπτό από τη στιγμή που θα προσθέσουμε το SOC)
6. Ανάδευση με πιπέτα των 1000μl του περιεχομένου της κυβέτας και μεταφορά σε αποστειρωμένο δοκιμαστικό σωλήνα.

2.18. Έλεγχος επιτυχίας μετασχηματισμού.

A. Εμβολιασμός κυττάρων σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό μέσο LB agar. Επώαση overnight

ΥΛΙΚΑ

- IPTG
- SOC
- X-GAL
- Agar

1. Από κάθε δείγμα (με τα 1042μl) προσθήκη αντίστοιχα 50μl και 500μl υγρής καλλιέργειας σε 2 σωλήνες τύπου erpendorf. Στο σωλήνα με τα 50μl προστίθενται 150μl διαλύματος SOC. Ο σωλήνας με τα 500μl, φυγοκεντρείται στις 2000rpm για 2 λεπτά και απομακρύνονται από το υπερκείμενο 300μl χωρίς τη διαταραχή του ιζήματος.
2. Στο κάθε erpendorf εισάγονται 30μl διαλύματος X-GAL και 3μl διαλύματος IPTG.
3. Υπο ασηπτικές συνθήκες προστίθεται στο στερεοποιημένο LB agar το περιεχόμενο του erpendorf.
4. Με γυάλινο εργαστηριακό εργαλείο (που έχει εμβαπτιστεί σε αιθανόλη) επιστρώνονται τα κύτταρα στο θρεπτικό υπόστρωμα.
5. Μετά την απορρόφηση του μίγματος από το gel τοποθετούνται τα τρυβλία στη συσκευή επώασης, όπου και τα διατηρούνται ανεστραμμένα στους 37°C overnight

B. Επιλογή λευκών αποικιών και εμβολιασμός σε LB broth. Επώαση overnight.

2.19. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

ΥΛΙΚΑ

- Οξικό κάλιο
- Διάλυμα GET
- Διάλυμα ALKALI
- Αιθανόλη 100%
- Αιθανόλη 70%
- TE-RNase

- 1) Ήπια ανάδευση της καλλιέργειας σε συσκευή vortex
- 2) Προσθήκη 15ml κορεσμένης καλλιέργειας σε σωλήνες erpendorf
- 3) Φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 3000rpm και απόρριψη υπερκείμενου. *Αν μετά τη φυγοκέντρηση δεν έχει κολλήσει καλά το ίζημα (υπερκείμενο θολό), επαναλαμβάνεται η φυγοκέντρηση για ένα λεπτό στις 14000rpm και στη συνέχεια απορρίπτεται το υπερκείμενο.*
- 4) Προσθήκη παγωμένου διαλύματος GET 100μl σε κάθε erpendorf και ανακίνηση σε συσκευή vortex για διάλυση του ιζήματος. Διατήρηση για πέντε λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 5) Τοποθέτηση σε πάγο των σωλήνων erpendorf και προσθήκη σε κάθε ένα 200μl δ/τος ALKALI
- 6) Ήπια ανάδευση και τοποθέτηση για 7-8 λεπτά συνολικά στον πάγο.
- 7) Προσθήκη 150μl παγωμένου διαλύματος οξικού καλίου (για να σταματήσει η αντίδραση) ενώ τα erpendorf είναι στον πάγο. Ανάδευση του περιεχομένου και τοποθέτηση για 7-8 λεπτά στον πάγο.
- 8) Φυγοκέντρηση για 9 λεπτά στις 14000rpm. Μεταφορά το υπερκείμενου με πιπέτα σε καθαρό σημασμένο σωλήνα erpendorf.
- 9) Προσθήκη 1ml αιθανόλης 100%. Ανάδευση και τοποθέτηση στους -80 °C για 15 λεπτά περίπου.
- 10) Φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 14000rpm. Απομάκρυνση του υπερκείμενου. Στο ίζημα προστίθεται 0,5ml αιθανόλης 70%. Ανακίνηση και φυγοκέντρηση για 8 λεπτά στις 14000rpm.
- 11) Απομάκρυνση του υπερκείμενου και διατήρηση του σωλήνα erpendorf ανοικτό, για να στεγνώσει το ίζημα.
- 12) Αναδιάλυση του στεγνού ιζήματος σε 1000μl TE-RNAαση. Η αναδιάλυση υποβοηθείται με παρατεταμένο vortex.

2.20.Απομόνωση της περιοχής ITS1 από το πλασμιδιακό DNA με διπλή πέψη με HindIII και EcoRI

ΥΛΙΚΑ

- Ένζυμα περιορισμού: Hind III, EcorI (εταιρίας Takara)
- Ρυθμιστικό διάλυμα

Πίνακας 9. Σύσταση αντίδρασης διπλής πέψης

Αντιδραστήριο	Ποσότητα ανά δείγμα, για 15μl τελικού όγκου
DNA	3μl
Απιονισμένο H ₂ O	9,7μl
10X Ρυθμιστικό διάλυμα	1,5μl
Ένζυμο περιορισμού Hind III(15units/μl)	0,5μl
Ένζυμο περιορισμού EcoRI(15units/μl)	0,3μl
Τελικός όγκος	15μl

Επώαση στους 37°C για 1 ώρα. Ακολουθεί ποσοτικοποίηση με ηλεκτροφόρηση, προετοιμασία δειγμάτων και αποστολή για αλληλούχιση.

2.21. Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση (sequencing) έγινε από την εταιρία MACROGEN.

Χρησιμοποιήθηκε ένας reverse εκκινητής, που σχεδιάστηκε ώστε να υβριδίζεται σε αλληλουχία στο 5' άκρο του 5.8S rRNA γονιδίου, με σκοπό να περιλαμβάνει όλη την περιοχή ITS1 (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Αλληλουχία εκκινητή αλληλούχισης του τμήματος ITS1

Θέση εκκινητή	Αλληλουχία
5.8S 5' R	CACGATGACGCACAGTTTGC

Η αλληλούχιση εκμεταλλεύεται την διαφορετική χρώση των ddNTPs, η οποία επιτρέπει την πραγματοποίηση της αλληλούχισης σε μία αντίδραση. Στην μέθοδο αυτή κάθε ένα από τα τέσσερα ddNTPs χρωματίζονται με διαφορετικές χρωστικές (fluorescent dyes), καθεμία από τις οποίες έχουν διαφορετικό μήκος κύματος φθορισμού ή εκπομπής. Ο περιορισμός αυτής έγκειται στα προβλήματα που δημιουργούν οι διαφορετικές χρωστικές, δίνοντας άνισες κορυφές και σχήματα στην ηλεκτρονική μορφή της αλληλουχίας του DNA (χρωματογράφημα).

Χαρακτηριστικό πρόβλημα των αλληλουχιών που παράγονται είναι η χαμηλή ποιότητα των παραγόμενων αλληλουχιών στα πρώτα 40-50 νουκλεοτίδια και η χειροτέρευση της ποιότητάς της μετά τα 600-700 νουκλεοτίδια. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται στην υβριδοποίηση μη σχετικών αλληλουχιών κατά τη διάρκεια της PCR, καταλήγοντας σε χημαιρικές αλληλουχίες που περιέχουν τμήματα από δυο διαφορετικά τμήματα DNA. Επίσης

είναι πιθανό σε ορισμένες περιπτώσεις η πολυμεράση να «σκοντάψει», τοποθετώντας με επαναλαμβανόμενο τρόπο ίδια τμήματα του DNA, δημιουργώντας έτσι ένα ψευδές μέρος της αλληλουχίας.

2.22. Επεξεργασία αλληλουχιών με τα προγράμματα Omiga 2.0 και Clustal W.

Με τη λήψη των αποτελεσμάτων έγινε η ανάλυσή τους με το στατιστικό πρόγραμμα μοριακής ανάλυσης Omiga 2.0 (Oxford Molecular Ltd) (Kramer, 2001).

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε για τη στοίχιση των αλληλουχιών το πρόγραμμα ClustalW (Thompson et al. 1994), το οποίο διατίθεται ελεύθερα στο διαδίκτυο. Η μέθοδος χρησιμοποιεί προοδευτικούς αλγόριθμους, όπου οι δυο συνολικά πιο ομόλογες αλληλουχίες στοιχίζονται πρώτες και ακολουθεί μια σειρά από νέες στοιχίσεις, προσθέτοντας σε κάθε βήμα την αμέσως συγγενέστερη αλληλουχία προς τις ήδη στοιχισμένες. Πριν από τη στοίχιση, οι αλληλουχίες τοποθετήθηκαν σε ενιαίο αρχείο με την κατάλληλη χρήση του προγράμματος Textpad.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

1. **ALKALI** :0.1 M NaOH, 1% SDS
2. **GET** : 50mM Glucose, 10mM EDTA, 25mM TrisCl
3. **LB (υγρό) (1L)**: 10g βακτοτρυπτόνη, 5g εκχύλισμα ζύμης, 5g NaCl pH=7. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq. In.).
4. **LB-agar(στερεό) (1L)**: 10g βακτοτρυπτόνη, 5g εκχύλισμα ζύμης, άγαρ 15g, 5g NaCl pH=7. Αποστείρωση σε αυτόκαυστο (20 λεπτά σε 15lb/sq. In.).
5. **SOB**: σε 950 ml dH₂O, προστίθενται 20 g bacto-tryptone, 5 g bacto-yeast extract, 0,5 g NaCl. Αναδεύονται μέχρι να διαλυθούν και προσθέτονται 10 ml 0,25mM KCl. Το pH ρυθμίζεται σε 7,2 και προστίθεται dH₂O σε τελικό όγκο 1 lt. Αποστειρώνεται και πριν τη χρήση προσθέτονται 5 ml αποστειρωμένου διαλύματος 2 M MgCl₂.
6. **SOC** (ανά λίτρο): είναι το ίδιο με το SOB και περιέχει επιπλέον 20mM γλυκόζη. Αφού αποστειρωθεί το SOB και η θερμοκρασία του πέσει στους 60 °C προστίθενται 20 ml 1M γλυκόζης.
7. **5X TBE**: 54 g Tris-base, 27,5 g boric acid, 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
8. **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 οξείδωση και δίνει κίτρινο χρώμα).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Απομονώθηκε το DNA από ενήλικα άτομα δάκου από διαφορετικές περιοχές. Η ενίσχυση της εσωτερικά μεταγραφόμενης περιοχής ITS1 της οικογένειας γονιδίων του ριβοσώματος, πραγματοποιήθηκε με PCR, χρησιμοποιώντας τους εκκινητές 18S rRNA-end-F και 5,8S rRNA-3' R που είναι συμπληρωματικοί των συντηρημένων αλληλουχιών στο 5' άκρο (forward) του γονιδίου 18S και 3' άκρο (reverse) του γονιδίου 5,8S.

Η PCR, με τη χρήση των παραπάνω εκκινητών, ενίσχυσε τμήμα DNA μήκους περίπου 850 bp για όλα τα άτομα δάκου (από όλες τις περιοχές) που αναλύθηκαν (Εικόνα 6-προϊόν PCR). Το τμήμα αυτό περιλάμβανε ολόκληρη την αλληλουχία του γονιδίου 5,8S rRNA, την αλληλουχία του ITS1 και τμήμα του γονιδίου 18S rRNA (βλέπε Εικόνα 3).

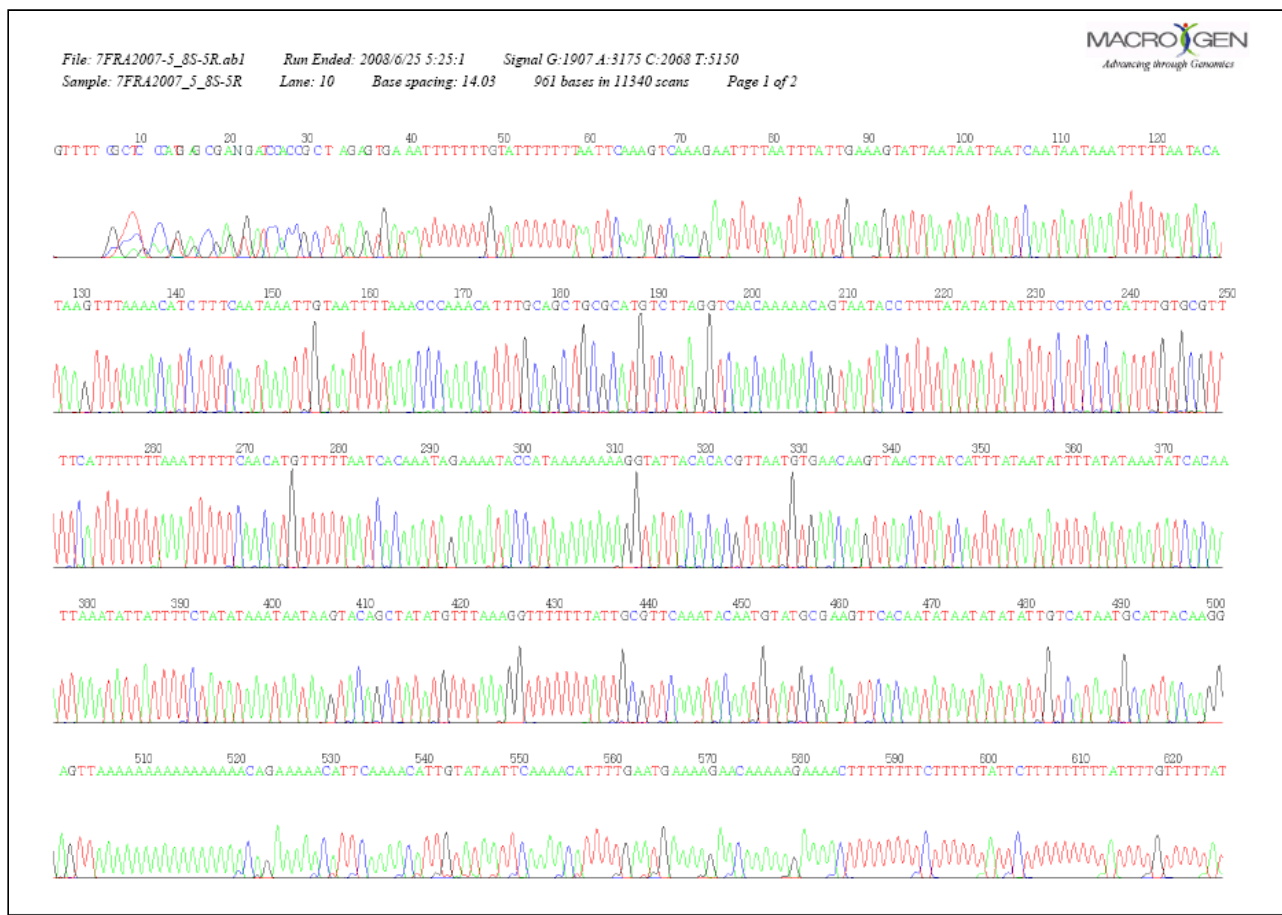


Εικόνα 6. Ποσοτικοποίηση προϊόντος PCR

Με στόχο τη διερεύνηση πολυμορφισμών εντός της περιοχής του ITS1 μεταξύ των ατόμων διαφορετικών πληθυσμών, το προϊόν της PCR κλωνοποιήθηκε στο πλασμίδιο pBS1 με σκοπό την περαιτέρω ενίσχυσή του. Στη συνέχεια, 29 πλασμίδια που περιείχαν το ένθεμα, από άτομα 11 διαφορετικών περιοχών, αλληλουχίστηκαν από την εταιρεία MACROGEN. Ακολούθως, οι αλληλουχίες επεξεργάστηκαν με το πρόγραμμα Omiga 2.0. (εικόνα 7) και στοιχίστηκαν με το Clustal W (Thompson et al.1997).

Ενδεικτικά, το χρωματογράφημα που προέκυψε από την αλληλούχιση ενός πλασμιδίου με τη βοήθεια του εκκινητή 5.8S 5' R έχει τη μορφή που φαίνεται στην Εικόνα 4.

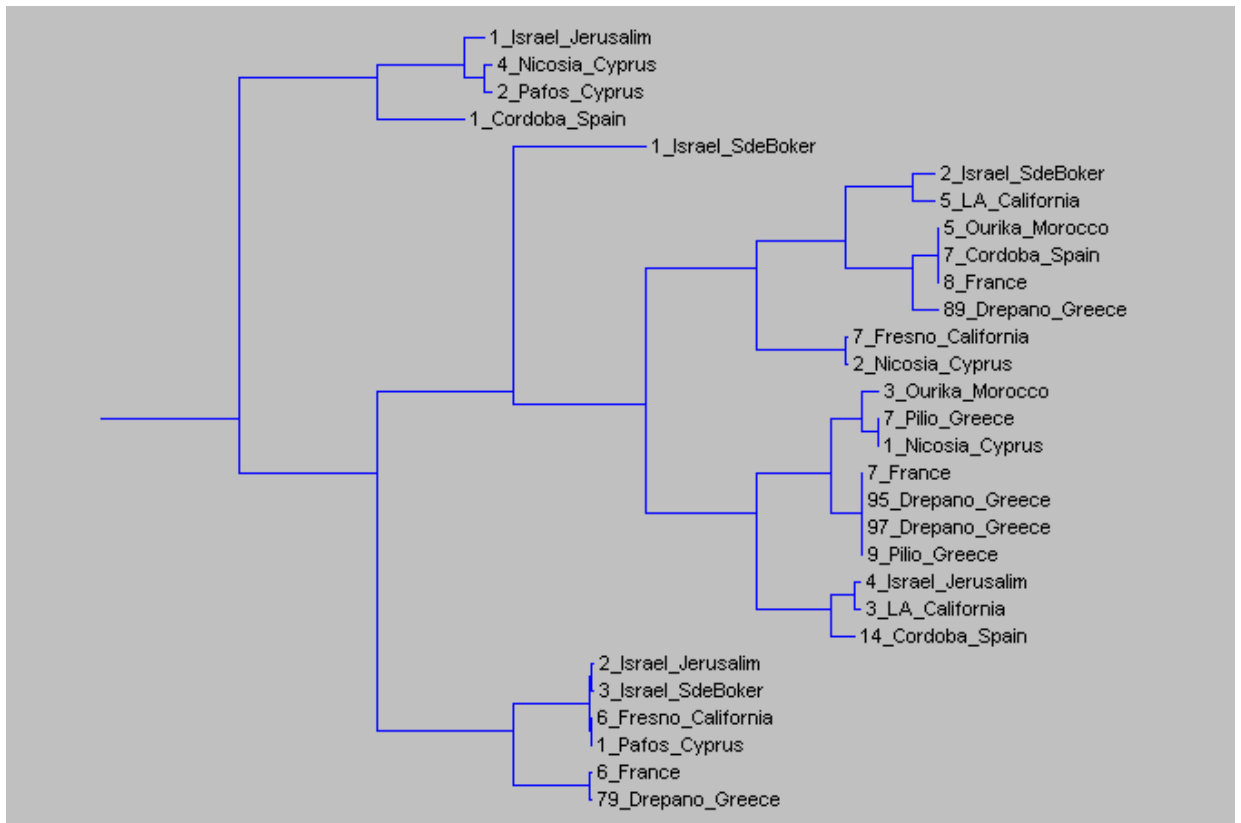
Η τελική αλληλουχία που χρησιμοποιήθηκε στη φυλογενετική ανάλυση, μετά την αφαίρεση τμημάτων από την αρχή και το τέλος των αλληλουχιών, η εικόνα των οποίων δεν ήταν καθαρή, είχε μήκος 618 με 627 βάσεων.



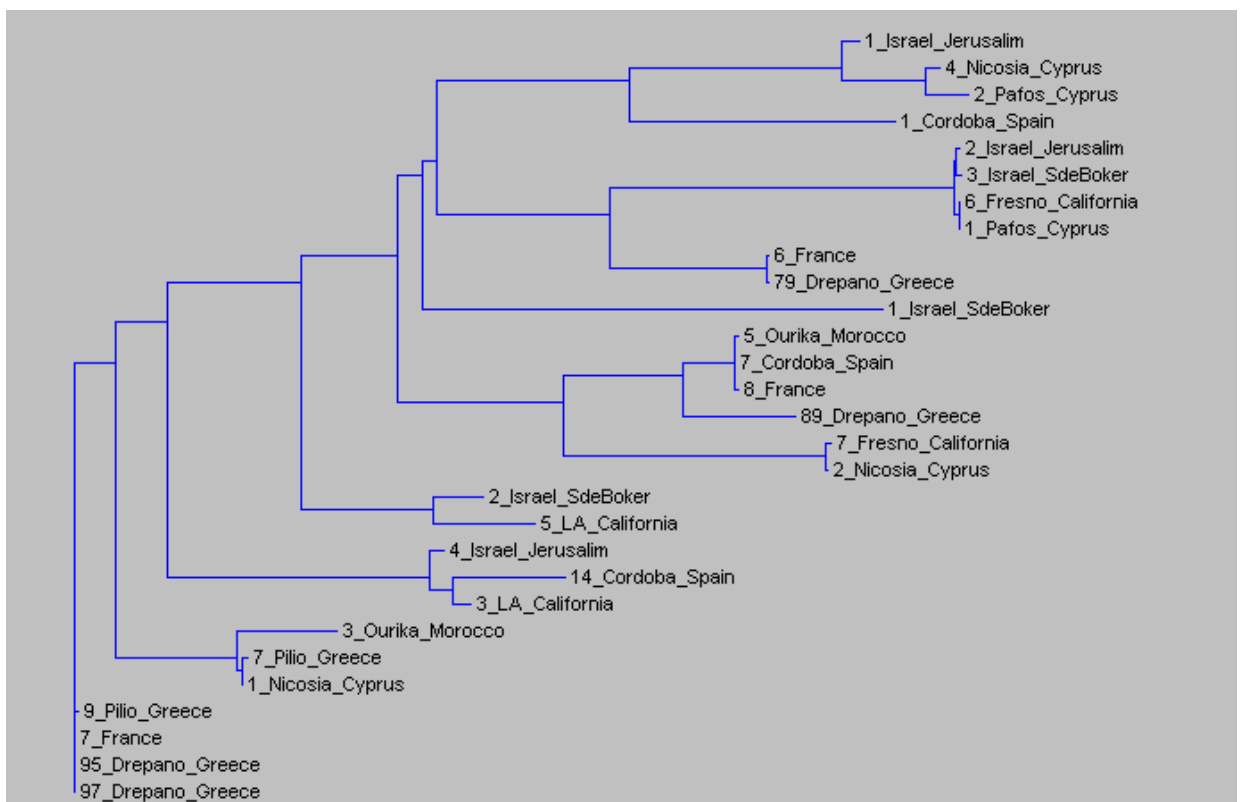
Εικόνα 7. Χρωματογράφημα αλληλούχισης πλασμιδίου

Στο σημείο αυτό αξίζει να σημειωθεί ότι πριν την ευθυγράμμιση (στοίχιση) των αλληλουχιών, έπρεπε πρώτα να διαπιστωθεί αν το ένθεμα είχε συνδεθεί στο πλασμίδιο με την φορά 18S-ITS1-5,8S ή ανάποδα. Έτσι, τα 5' και 3' άκρα της περιοχής ITS1 καθορίστηκαν βασιζόμενοι στην σύγκριση της αλληλουχίας με την αλληλουχία της θέσης περιορισμού του πλασμιδίου (φορέα) HindIII ή EcoRI. Κατ' αυτόν τον τρόπο έγινε δυνατή η σωστή ευθυγράμμιση των αλληλουχιών στη συνέχεια.

Η ευθυγράμμιση 29 αλληλουχιών από ενήλικα άτομα *B. oleae* 11 διαφορετικών περιοχών (ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ), έδωσε τα δενδρογράμματα που φαίνονται στις εικόνες 5 και 6, με τη βοήθεια των μεθόδων UPGMA και NEIGHBOUR-JOINING αντίστοιχα. Τα πληροφοριακά σημεία (διαφορές σε ομόλογες θέσεις μεταξύ **δύο ή και περισσότερων δειγμάτων**), φαίνονται στον Πίνακα 11.



Εικόνα 8. Δενδρόγραμμα UPGMA



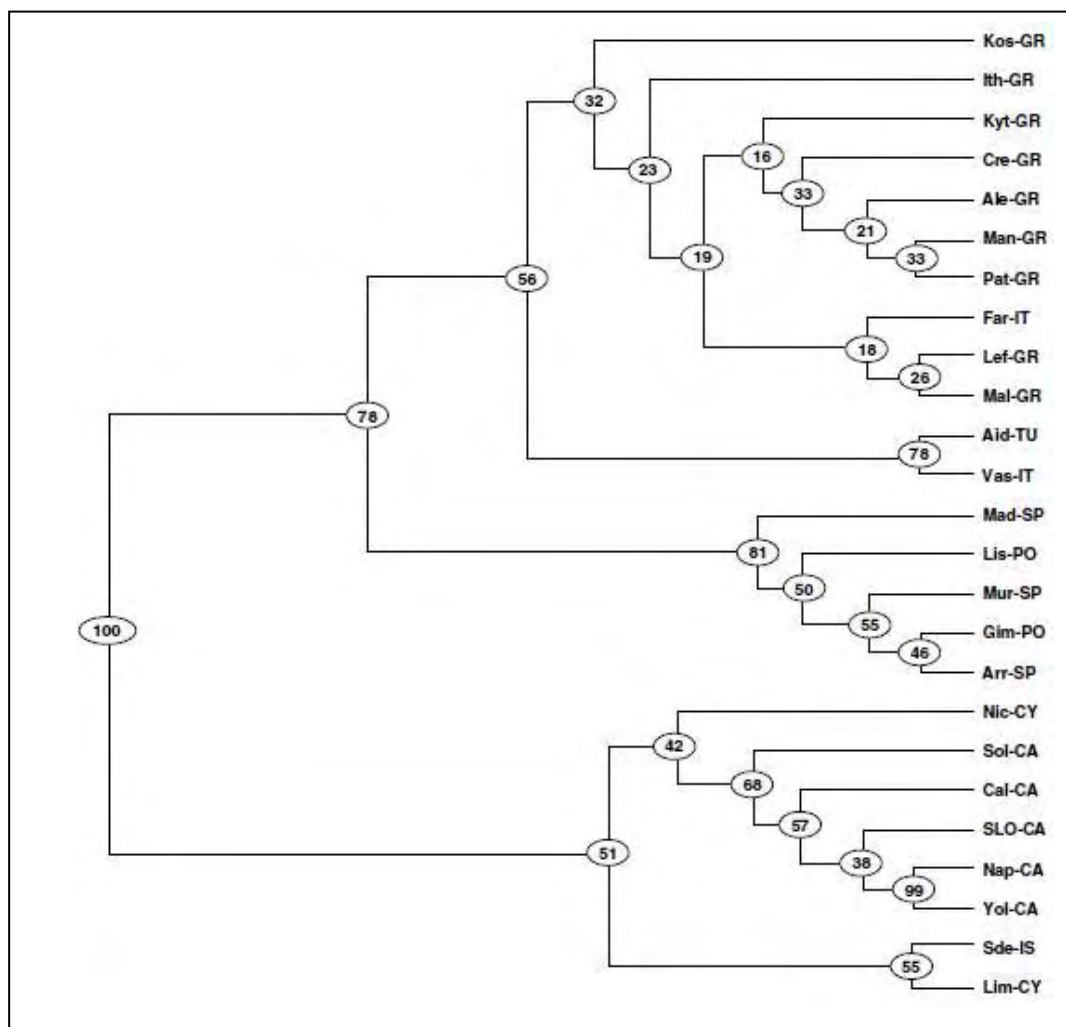
Εικόνα 9. Δενδρόγραμμα Neighbour-joining

Πίνακας 11. Πληροφοριακά σημεία ευθυγράμμισης

A/A	Θέση πολυμορφισμού	Είδος πολυμορφισμού	Δείγμα
1	41	Έλλειψη A	2_Israel_Jerusalim
			2_Pafos_Cyprus
			6_Fresno_California
			3_LA_California
			1_Pafos_Cyprus
			3_Israel_SdeBoker
			14_Cordoba_Spain
2	90	Έλλειψη A	3_Ourika_Morocco
			4_Nicosia_Cyprus
3	166	Ένθεση T	7_Fresno_California
			2_Nicosia_Cyprus
4	171	Έλλειψη T	1_Israel_Jerusalim
			1_Israel_SdeBoker
5	172	Έλλειψη T	1_Israel_Jerusalim
			1_Israel_SdeBoker
			2_Pafos_Cyprus
6	173	Ένθεση T	89_Drepano_Greece
			2_Nicosia_Cyprus
			5_LA_California
			14_Cordoba_Spain
7	253	Ένθεση A	3_Ourika_Morocco
			7_Cordoba_Spain
			5_Ourika_Morocco
			8_France
			1_Nicosia_Cyprus
			7_Pilio_Greece
8	427	Έλλειψη T	2_Israel_Jerusalim
			2_Israel_SdeBoker
			7_Fresno_California
			4_Nicosia_Cyprus
			1_Israel_Jerusalim
			1_Israel_SdeBoker
			4_Israel_Jerusalim
			2_Pafos_Cyprus
			6_Fresno_California
			3_LA_California
			1_Pafos_Cyprus
			2_Nicosia_Cyprus
			3_Israel_SdeBoker
			5_LA_California
14_Cordoba_Spain			
9	616	G αντί T	7_Pilio_Greece
			9_Pilio_Greece
10	625	Έλλειψη A	2_Israel_Jerusalim
			3_Israel_SdeBoker

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, ακολουθεί παράλληλη πορεία εξέλιξης και εξάπλωσης στην πάροδο των χρόνων με την καλλιέργεια του ελαιόδεντρου. Εκτεταμένη ανάλυση των πληθυσμών του δάκου στην Ευρωπαϊκή πλευρά της λεκάνης της Μεσογείου (Augustinos et al, 2005) αποκάλυψε μια στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε τρεις υποπληθυσμούς. Ο πρώτος αποτελούταν από τα δείγματα της Κύπρου, ο δεύτερος από τα δείγματα Ελλάδας, Τουρκίας και Ιταλίας και ο τρίτος από τα δείγματα της Ιβηρικής χερσονήσου. Περαιτέρω αναλύσεις μικροδορυφόρων (Zygouridis et al., 2009) που είχαν ως στόχο να εξακριβώσουν την προέλευση της πρώτης εισβολής του δάκου στην Καλιφόρνια, επιβεβαίωσαν τα παραπάνω αποτελέσματα και επιπλέον έδειξαν ότι η εισβολή του εντόμου προερχόταν από το ανατολικό κομμάτι της μεσογειακής λεκάνης (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Δενδρόγραμμα UPGMA (Zygouridis et al., 2009)

Η παρούσα εργασία, με στόχο την ανάπτυξη διαγνωστικών μοριακών δεικτών σε φυσικούς πληθυσμούς του δάκου της ελιάς, εστίασε στη μελέτη της περιοχής ITS1 του rDNA.

Με σκοπό τη σύγκριση των περιοχών ITS1 και την ανακάλυψη τυχόν πολυμορφισμών, πραγματοποιήθηκε ευθυγράμμιση των τμημάτων που προέκυψαν από τη διαδικασία της αλληλούχισης, μετά την αφαίρεση των περιοχών εκείνων των οποίων η εικόνα δεν ήταν καθαρή (βλέπε χρωματογράφημα, Εικόνα 7, σελ.39). Αξίζει να σημειωθεί ότι η αφαίρεση των τμημάτων αυτών δεν επηρέασε την αλληλούχιση της περιοχής ITS1 καθώς η κακή εικόνα του χρωματογραφήματος ήταν σε εκείνα τα τμήματα της αλληλουχίας που περιλάμβαναν τα 5,8S και 18S. Από τη σύγκριση λοιπόν των αλληλουχιών ITS1 των δειγμάτων των περιοχών που φαίνονται στον Πίνακα 1 (σελ.19), προέκυψε η ύπαρξη πολυμορφισμών σε ομόλογες θέσεις μεταξύ δυο ή και περισσότερων δειγμάτων, γεγονός που μέσα από την πληθυσμιακή ανάλυση με τις μεθόδους UPGMA και NJ, έδωσε τα δενδρογράμματα που φαίνονται στις Εικόνες 8 και 9 (σελ.40).

Η ανάλυση των δενδρογραμμάτων μας προβλημάτισε. Η σαφής ομαδοποίηση των πληθυσμών δεν είναι δυνατή καθώς αφενός διαφορετικά άτομα του ίδιου πληθυσμού φαίνονται απομακρυσμένα εξελικτικά/γενετικά και αφετέρου εμφανίζονται δείγματα της Ισπανίας και της Γαλλίας ανάμεσα στις ομάδες δειγμάτων της ανατολικής μεσογείου, γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα προηγούμενων μελετών όπως αυτά αναφέρθηκαν παραπάνω. Η εικόνα αυτή των δενδρογραμμάτων μπορεί να δικαιολογηθεί είτε από τη λάθος ευθυγράμμιση των αλληλουχιών που ως ένα βαθμό μπορεί να οφείλεται στην «επιβάρυνση των χασμάτων» (gap weight) των αλληλουχιών (Εικόνα παραρτήματος 1), είτε από λάθη της πολυμεράσης που αποτέλεσαν πληροφοριακά σημεία στα οποία βασίστηκε ο σχεδιασμός των δέντρων.

Η ευθυγράμμιση των αλληλουχιών στη φυλογενετική ανάλυση είναι μια διαδικασία ζωτικής σημασίας για την εύρεση των πραγματικών φυλογενετικών σχέσεων των υπό εξέταση ταξινομικών μονάδων. Αποσκοπεί στον προσδιορισμό των ομόλογων θέσεων των αλληλουχιών, αφού με βάση τις διαφορές σε αυτές τις θέσεις υπολογίζονται οι εξελικτικές σχέσεις των υπό μελέτη αλληλουχιών. Είναι σημαντικό λοιπόν, να αφαιρεθούν οι αμφισβητούμενες και κακώς στοιχισμένες αλληλουχίες σε σχέση με το σύνολο των αλληλουχιών και να επαναληφθεί η φυλογενετική ανάλυση.

Επιπλέον, δεδομένου ότι η πολυμεράση που χρησιμοποιήθηκε κατά την PCR δεν ήταν υψηλής πιστότητας καθώς και ότι πολλά από τα πληροφοριακά σημεία, ήταν σε περιοχές

που επαναλαμβάνονταν μια μοναδική βάση (A ή T), είναι πολύ πιθανόν οι εμφανιζόμενες μεταλλάξεις να μην είναι τίποτα άλλο από λάθη της πολυμεράσης.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, είναι αδύνατη η εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων με τα δεδομένα που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη ως προς την ύπαρξη διαγνωστικών μεταλλάξεων στην περιοχή ITS1 του ριβοσωμικού DNA. Περαιτέρω έρευνα, με περισσότερα δείγματα από διάφορες περιοχές, είναι δυνατόν να βοηθήσει στην αξιολόγηση των πολυμορφισμών, καθώς όσο πιο μεγάλος είναι ο αριθμός των δεδομένων τόσο πιο υπολογίσιμα στατιστικά είναι τα αποτελέσματα και επομένως τόσο πιο αξιόπιστο είναι το σχηματιζόμενο δέντρο. Οι εμφανιζόμενες μεταλλάξεις, θα πρέπει να επιβεβαιωθούν με PCR κατά την οποία θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί πολυμεράση υψηλής ακρίβειας. Τέλος, τα αποτελέσματα, θα πρέπει οπωσδήποτε και πάλι να συγκριθούν με τις υπάρχουσες φυλογενετικές μελέτες που βασίζονται στην μελέτη άλλων μοριακών δεικτών όπως μικροδορυφόροι και αλληλουχίες μιτοχόνδριου.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Δήμου ΙΕ. 2002. Οικολογική μελέτη του δάκου της ελιάς, *Bactrocera (Dacus) oleae* (Gmelin) στην περιοχή της Αχαΐας. Διδακτορική διατριβή.

Τζανακάκης Μ.Ε. 1995. Εντομολογία. Θεσσαλονίκη. Εκδόσεις University Studio Press.

Armstrong S. 1995. Rare plants protect Cape's water supplies. *New Scientist* (11Feb): 8.

Augustinos A.A, Mamuris Z., Stratikopoulos E.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* 125:231–241

Avise J.C. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York

Avise J.C. 2000. *Phylogeography. The history and formation of species*. Harvard University Press.

Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E.,Reeb C.A. & Saunders N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

Baldwin BG. 1993. Molecular phylogenetics of Calycadenia (Compositae) based on ITS sequences of nuclear ribosomal DNA: chromosomal and morphological evolution reexamined. *Amer J Bot* 80:222-238

Burt A, Carter DA, White TJ and Taylor JW. 1994. *Molecular Ecology*. 3: 523

CHEN Xiaoi, LI Song, LI Changben, ZHAO Shouyuan, AKSOY Serap. 1999. Phylogeny of genus *Glossina* (Diptera : Glossinidae) according to ITS2 sequences. *Science in China (Series C)*. 42 No3:249-258

Bonizzoni M, Katsoyannos BI, Marguerie R, Guglielmino CR, Gasperi G, Malacrida AR and Chapman T. 2002. Microsatellite analysis reveals remating by wild Mediterranean fruit fly females, *Ceratitis capitata*. *Molecular Ecology* 11: 1915-1921.

Delrio G. 1978. Fattori di reolazione delle popolazioni di *Dacus oleae* Gmelin nella Sardegna nord-occidentale. *Not. Mal. Piante*. 98-99:27-45

Douglas Leslie, Haymer David. 2001. Ribosomal ITS1 Polymorphisms in *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa* (Diptera:Tephritidae). *Annals of the Entomological Society of America* 94(5):726-731

- Dover, G.** 1982. Molecular drive – a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299:111-117
- Economopoulos , A.P., Haniotakis, G.E., Mathioudis, J., Missis, N., Kinigakis, P.** 1978. Long distance flight of wild and artificially-reared *Dacus oleae* (Gmelin) (Diptera, Tephritidae). *Z. angew.Ent.* 87:101-108
- 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.
- Gomulski L.M., Meiswinkel R., Delecolle J.-C., Goffredo M., Gasperi G.** 2006. Phylogeny of the subgenus *Culicoides* and related species in Italy, inferred from internal transcribed spacer 2 ribosomal DNA sequences. *Medical and Veterinary Entomology.* 20: 229–238
- Goulielmos GN, Cosmidis N, Theodorakopoulou ME, Loukas M and Zouros E.** 2003. Tracing the history of an enzyme polymorphism: The case of alcohol dehydrogenase –2 (Adh – 2) of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Mol. Biol. Evol.* 20 (3): 293–306.
- Hanahan D. and Meselson M.** 1983. In *Methods in enzymology* (ed. R. Wu, L. Grossman and K. Moldave). 100:33-42. Academic Press. New York
- Harding, R.M., A.J Boyce and J.B Clegg,** 1992. The evolution of tandemly repetitive DNA: recombination rules. *Genetics,* 132: 847–859.
- Hillis D.M., Dixon T.** 1991. Ribosomal DNA: Molecular evolution and phylogenetic inference. *The Quarterly Review of Biology.* Volume 66, No 4.
- Katsoyannos, P.** 1992. *Olive Pests and Their Control in the Near East.* FAO Plant Production and Protection Paper No115. FAO, Rome
- Kramer J.A.** 2001. OmigaTM: A PC-based sequence analysis tool. *Mol Biotech.* 19:97-106
- Levine M. Jonathan and D' Antonio Carla.** 2003. Forecasting Biological Invasions with Increasing International Trade. *Conservation Biology* 17(1): 322-326.
- Meixner MD, Mchepon BA, Silva JG Gasparich GE and Sheppard WS.** 2002. The Mediterranean fruit fly in California: evidence for multiple introductions and persistence populations based on microsatellite and mitochondrial DNA variability. *Molecular Ecology,* 11: 891 – 899.
- Mumford J.D.** 2002. Economic issues related to quarantine in international trade. *European Review of Agricultural Economics* 29 (3):329-348
- Neuenschwander P, Michelakis S.** 1978. The infestation of *Dacus oleae* (Gmel.) (Diptera, Tephritidae) at harvest time and its influence on yield and quality of olive oil in Crete. *Z. ang. Ent.* 86:420-433.

Neumann E, Schaefer-Ridder, Wang Y and Hofschneider PH. 1982. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.*, **1**: 841

Nugent R., Benwell G., Geering W., McLennan B., Mumford J., Otte J., Quinlan M., and Zelazny B. 2001. Economic impacts of transboundary plant pests and animal diseases. In the State of Food and Agriculture. Rome: FAO, 199-280.

Pimentel D. 2000. Environmental and economic costs of non-indigenous species in the US. *Bioscience* 50:53-65

Qiao Chun-Feng, Han Quan-Bin, Zhao Zhi-Li, Wang Zheng-Tao, Xu Luo-Shan, Xu Hong-Xi. 2009. Sequence Analysis Based on ITS1 Region of Nuclear Ribosomal DNA of *Amomum villosum* and Ten Species of *Alpinia*. *Journal of Food and Drug Analysis*. 17(2):142-145

Rice RE. 2000. Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. In: Olive Notes. Tulare County, University of California cooperative extension, 1-5.

Reeder, R.H. 1990. Ribosomal RNA synthesis in the nucleolus. *Trends Genet.* 6:390-395

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

Shen Yulong, Newbury John, Ford-Lloyd Brian. 1998. Identification of Taxa in the Genus *Beta* using ITS1 Sequence Information. *Plant Molecular Biology Reporter*. 16:147-155

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

Tautz D., Hancock J., Webb D., Tautz C., and Dover G. 1988. Complete Sequences of the rRNA Genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 5(4):366-376

Tautz D and Schlotterer C. 1994. Simple sequences. *Current Opinions in Genetics and Development*, 4: 832-837.

Thompson J.D., Gibson T.J., Plewniak F., Jeanmougin F., and Higgins D.G. 1997. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.

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.

Wilcove D.S., Rothstein D., Dubow J., Phillips A., and Loso E. 1998. Quantifying threats to imperilled species in the United States. *Bioscience*. 48: 607-615

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*. 2008; 9: 618

Zalom F.G., Burrack H.J., Bingham R., Price R., Ferguson L. 2008. Olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) introduction and establishment in California. *Acta Horticulturae*. 791: 619-627

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*. 102(4):402-12

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

2_Israel_Jerusalim	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAA	TAATTATATAAAAAACAAAA	59
2_Israel_SdeBoker	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
7_Fresno_California	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
3_Ourika_Morocco	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
4_Nicosia_Cyprus	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
7_Cordoba_Spain	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
5_Ourika_Morocco	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
8_France	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
1_Cordoba_Spain	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
1_Nicosia_Cyprus	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
7_Pilio_Greece	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
79_Drepano_Greece	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
6_France	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
9_Pilio_Greece	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
1_Israel_Jerusalim	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
1_Israel_SdeBoker	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
97_Drepano_Greece	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
95_Drepano_Greece	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
7_France	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
89_Drepano_Greece	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	GATATAAAAAACAAAA	60
4_Israel_Jerusalim	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTGTCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
2_Pafos_Cyprus	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAA	TAATTATATAAAAAACAAAA	59
6_Fresno_California	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAA	TAATTATATAAAAAACAAAA	59
3_LA_California	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAA	TAATTATATAAAAAACAAAA	59
1_Pafos_Cyprus	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAA	TAATTATATAAAAAACAAAA	59
2_Nicosia_Cyprus	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
3_Israel_SdeBoker	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAA	TAATTATATAAAAAACAAAA	59
5_LA_California	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAGAAAAAAAAAATA	TAATTATATAAAAAACAAAA	60
14_Cordoba_Spain	AAGGATCATTATTGTGTTCCCTATCCGAAAAGAAAAAAAAA	TAATTATATAAAAAACAAAA	59
2_Israel_Jerusalim	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		118
2_Israel_SdeBoker	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTCTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
7_Fresno_California	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
3_Ourika_Morocco	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAA - GTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		118
4_Nicosia_Cyprus	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAA - GTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		118
7_Cordoba_Spain	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
5_Ourika_Morocco	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
8_France	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
1_Cordoba_Spain	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
1_Nicosia_Cyprus	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
7_Pilio_Greece	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
79_Drepano_Greece	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
6_France	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
9_Pilio_Greece	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
1_Israel_Jerusalim	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
1_Israel_SdeBoker	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
97_Drepano_Greece	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
95_Drepano_Greece	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
7_France	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
89_Drepano_Greece	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
4_Israel_Jerusalim	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
2_Pafos_Cyprus	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		118
6_Fresno_California	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		118
3_LA_California	TAAAAAAAAAAGAAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
1_Pafos_Cyprus	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		118
2_Nicosia_Cyprus	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
3_Israel_SdeBoker	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		118
5_LA_California	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAATG		119
14_Cordoba_Spain	TAAAAAAAAA - GAATAAAAAAGAAAAAAAAAGTTTTCTTTTTGTTCTTTTCATTCAAGATG		118

2_Israel_Jerusalim TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 175
 2_Israel_SdeBoker TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 7_Fresno_California TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT **GT** TTTTTT - AACTCCT 178
 3_Ourika_Morocco TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 175
 4_Nicosia_Cyprus TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 174
 7_Cordoba_Spain TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 5_Ourika_Morocco TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 8_France TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 1_Cordoba_Spain TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTT **G**TTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 173
 1_Nicosia_Cyprus TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 175
 7_Pilio_Greece TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 175
 79_Drepano_Greece TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 175
 6_France TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 175
 9_Pilio_Greece TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 1_Israel_Jerusalim TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 174
 1_Israel_SdeBoker TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT **T** - AACTCCT 169
 97_Drepano_Greece TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 95_Drepano_Greece TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 7_France TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 89_Drepano_Greece TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT **T** - AACTCCT 177
 4_Israel_Jerusalim TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 2_Pafos_Cyprus TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 174
 6_Fresno_California TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 175
 3_LA_California TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 176
 1_Pafos_Cyprus TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 175
 2_Nicosia_Cyprus TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT **T**TTTTTTT **T**AACTCCT 178
 3_Israel_SdeBoker TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT - AACTCCT 175
 5_LA_California TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT **T**AACTCCT 177
 14_Cordoba_Spain TTTTGAATTATACAATGTTTTGAATGTTTTCTGTTTTTTTTTTT -- TTTTTT **T**AACTCCT 176

• ••

2_Israel_Jerusalim TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 234
 2_Israel_SdeBoker TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT **T**GAAC 236
 7_Fresno_California TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- **T**AAAC 237
 3_Ourika_Morocco TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 234
 4_Nicosia_Cyprus TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 233
 7_Cordoba_Spain TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235
 5_Ourika_Morocco TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235
 8_France TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235
 1_Cordoba_Spain TGTAAT **T**CATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 232
 1_Nicosia_Cyprus TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 234
 7_Pilio_Greece TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 234
 79_Drepano_Greece TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 234
 6_France TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 234
 9_Pilio_Greece TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235
 1_Israel_Jerusalim TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 233
 1_Israel_SdeBoker TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 228
 97_Drepano_Greece TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235
 95_Drepano_Greece TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235
 7_France TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235
 89_Drepano_Greece TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 236
 4_Israel_Jerusalim TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235
 2_Pafos_Cyprus TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 233
 6_Fresno_California TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 234
 3_LA_California TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235
 1_Pafos_Cyprus TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 234
 2_Nicosia_Cyprus TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 237
 3_Israel_SdeBoker TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 234
 5_LA_California TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 236
 14_Cordoba_Spain TGTAATGCATTATGACAATATATATTATATTGTGAACTTCGCATACATTGTATTT- GAAC 235

2_Israel_Jerusalim GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTTAATAGAAAATAATATT 293
2_Israel_SdeBoker GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 295
7_Fresno_California GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACGTATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 296
3_Ourika_Morocco GCAATAAAAAAAAA CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294
4_Nicosia_Cyprus GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 292
7_Cordoba_Spain GCAATAAAAAAAAA CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 295
5_Ourika_Morocco GCAATAAAAAAAAA CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 295
8_France GCAATAAAAAAAAA CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 295
1_Cordoba_Spain GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 291
1_Nicosia_Cyprus GCAATAAAAAAAAA CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294
7_Pilio_Greece GCAATAAAAAAAAA CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294
79_Drepano_Greece GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 293
6_France GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 293
9_Pilio_Greece GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294
1_Israel_Jerusalim GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 292
1_Israel_SdeBoker GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 287
97_Drepano_Greece GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294
95_Drepano_Greece GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294
7_France GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294
89_Drepano_Greece GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 295
4_Israel_Jerusalim GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294
2_Pafos_Cyprus GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 292
6_Fresno_California GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 293
3_LA_California GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294
1_Pafos_Cyprus GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 293
2_Nicosia_Cyprus GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 296
3_Israel_SdeBoker GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 293
5_LA_California GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 295
14_Cordoba_Spain GCAATAAAAAAAAA - CCTTTAAACATATAGCTGTACTTATTATTTATATAGAAAATAATATT 294

•

2_Israel_Jerusalim TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 353
2_Israel_SdeBoker TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 355
7_Fresno_California TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 356
3_Ourika_Morocco TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354
4_Nicosia_Cyprus TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 352
7_Cordoba_Spain TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 355
5_Ourika_Morocco TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 355
8_France TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 355
1_Cordoba_Spain TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 351
1_Nicosia_Cyprus TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354
7_Pilio_Greece TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354
79_Drepano_Greece TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 353
6_France TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 353
9_Pilio_Greece TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354
1_Israel_Jerusalim TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 352
1_Israel_SdeBoker TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 347
97_Drepano_Greece TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354
95_Drepano_Greece TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354
7_France TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354
89_Drepano_Greece TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 355
4_Israel_Jerusalim TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354
2_Pafos_Cyprus TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 352
6_Fresno_California TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 353
3_LA_California TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354
1_Pafos_Cyprus TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 353
2_Nicosia_Cyprus TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 356
3_Israel_SdeBoker TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 353
5_LA_California TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 355
14_Cordoba_Spain TAATTGTGATATTTATATAAAAATATTATAAATGATAAGTTAACTTGTTTCACATTAACGTG 354

2_Israel_Jerusalim TGTAATACCTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 413
2_Israel_SdeBoker TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 415
7_Fresno_California TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 416
3_Ourika_Morocco TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414
4_Nicosia_Cyprus TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 412
7_Cordoba_Spain TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 415
5_Ourika_Morocco TGTGATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 415
8_France TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 415
1_Cordoba_Spain TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 411
1_Nicosia_Cyprus TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414
7_Pilio_Greece TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414
79_Drepano_Greece TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 413
6_France TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 413
9_Pilio_Greece TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414
1_Israel_Jerusalim TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 412
1_Israel_SdeBoker TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 407
97_Drepano_Greece TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414
95_Drepano_Greece TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414
7_France TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414
89_Drepano_Greece TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 415
4_Israel_Jerusalim TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414
2_Pafos_Cyprus TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 412
6_Fresno_California TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 413
3_LA_California TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414
1_Pafos_Cyprus TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 413
2_Nicosia_Cyprus TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 416
3_Israel_SdeBoker TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 413
5_LA_California TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 415
14_Cordoba_Spain TGTAATACCTTTTTTTTTATGGTATTTTCTATTTGTGATTAAAAACATGTTGAAAAATTTA 414

2_Israel_Jerusalim AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 472
2_Israel_SdeBoker AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 474
7_Fresno_California AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 475
3_Ourika_Morocco AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 474
4_Nicosia_Cyprus AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 471
7_Cordoba_Spain AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 475
5_Ourika_Morocco AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 475
8_France AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 475
1_Cordoba_Spain AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 471
1_Nicosia_Cyprus AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 474
7_Pilio_Greece AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 474
79_Drepano_Greece AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 473
6_France AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 473
9_Pilio_Greece AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 474
1_Israel_Jerusalim AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 471
1_Israel_SdeBoker AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 466
97_Drepano_Greece AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 474
95_Drepano_Greece AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 474
7_France AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 474
89_Drepano_Greece AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 475
4_Israel_Jerusalim AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 473
2_Pafos_Cyprus AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 471
6_Fresno_California AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 472
3_LA_California AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 473
1_Pafos_Cyprus AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 472
2_Nicosia_Cyprus AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 475
3_Israel_SdeBoker AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 472
5_LA_California AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 474
14_Cordoba_Spain AAAAAA- GAAAACGCACAAATAGAGAAGAAAAATAATATATAAAAAGGTATTACTGTTTTTG 473

2_Israel_Jerusalim TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 532
2_Israel_SdeBoker TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 534
7_Fresno_California TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 535
3_Ourika_Morocco TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 534
4_Nicosia_Cyprus TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 531
7_Cordoba_Spain TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 535
5_Ourika_Morocco TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 535
8_France TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 535
1_Cordoba_Spain TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 531
1_Nicosia_Cyprus TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 534
7_Pilio_Greece TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 534
79_Drepano_Greece TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 533
6_France TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 533
9_Pilio_Greece TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 534
1_Israel_Jerusalim TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 531
1_Israel_SdeBoker TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 526
97_Drepano_Greece TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 534
95_Drepano_Greece TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 534
7_France TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 534
89_Drepano_Greece TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 535
4_Israel_Jerusalim TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 533
2_Pafos_Cyprus TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 531
6_Fresno_California TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 532
3_LA_California TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 533
1_Pafos_Cyprus TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 532
2_Nicosia_Cyprus TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 535
3_Israel_SdeBoker TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 532
5_LA_California TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 534
14_Cordoba_Spain TTGACCTAAGACATGCGCAGCTGCAAATGTTTGGGTTTAAAAATTACAATTTATTGAAAGA 533

2_Israel_Jerusalim TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 592
2_Israel_SdeBoker TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 594
7_Fresno_California TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 595
3_Ourika_Morocco TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 594
4_Nicosia_Cyprus TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 591
7_Cordoba_Spain TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 595
5_Ourika_Morocco TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 595
8_France TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 595
1_Cordoba_Spain TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 591
1_Nicosia_Cyprus TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 594
7_Pilio_Greece TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 594
79_Drepano_Greece TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 593
6_France TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 593
9_Pilio_Greece TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 594
1_Israel_Jerusalim TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 591
1_Israel_SdeBoker TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 586
97_Drepano_Greece TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 594
95_Drepano_Greece TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 594
7_France TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 594
89_Drepano_Greece TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 595
4_Israel_Jerusalim TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 593
2_Pafos_Cyprus TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 591
6_Fresno_California TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 592
3_LA_California TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 593
1_Pafos_Cyprus TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 592
2_Nicosia_Cyprus TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 595
3_Israel_SdeBoker TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 592
5_LA_California TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 594
14_Cordoba_Spain TGTTTTAAACTTATGTATTA AAAAATTTATTATTGATTAATTATTAATACTTTCAATAAAAT 593

2_Israel_Jerusalim	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTAA	AAAATAC	623
2_Israel_SdeBoker	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTAA	GAAAATAC	626
7_Fresno_California	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	627
3_Ourika_Morocco	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	626
4_Nicosia_Cyprus	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	623
7_Cordoba_Spain	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	627
5_Ourika_Morocco	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	627
8_France	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	627
1_Cordoba_Spain	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	623
1_Nicosia_Cyprus	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	626
7_Pilio_Greece	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	626
79_Drepano_Greece	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	625
6_France	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	625
9_Pilio_Greece	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	626
1_Israel_Jerusalim	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	623
1_Israel_SdeBoker	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	618
97_Drepano_Greece	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	626
95_Drepano_Greece	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	626
7_France	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	626
89_Drepano_Greece	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	627
4_Israel_Jerusalim	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	625
2_Pafos_Cyprus	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	623
6_Fresno_California	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	624
3_LA_California	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	625
1_Pafos_Cyprus	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	624
2_Nicosia_Cyprus	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	627
3_Israel_SdeBoker	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAATAC	623
5_LA_California	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	626
14_Cordoba_Spain	TAAAATTC	TTGACTTT	GAATTA	AAAAAATAC	625

Εικόνα παραρτήματος 1. CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment.

Με το σύμβολο « • », σημειώνονται τα πληροφοριακά σημεία.