



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Αριθμ. Πρωτοκ. 156
Ημερομηνία 5-3-2007

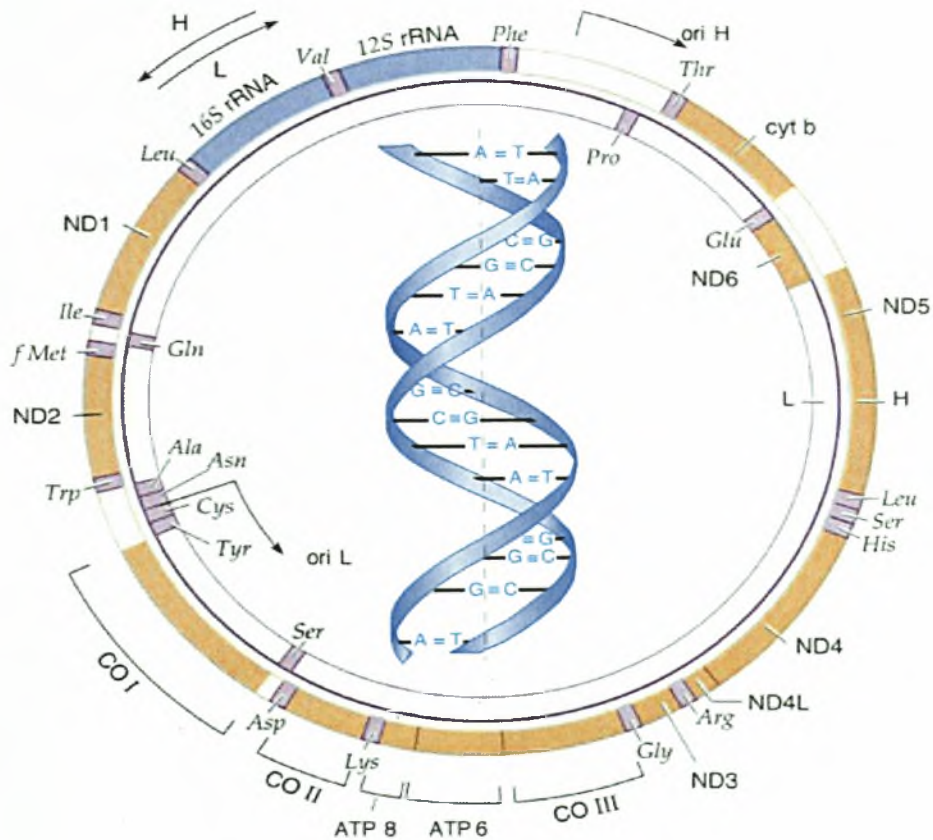
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ
ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ.

Πτυχιακή διατριβή

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της σεσάμιας του αραβοσίτου,
Sesamia nonagrioides (Lepidoptera: Noctuidae) με την μέθοδο
RFLPs.

Βασίλης Δ. Γκοτσόπουλος



ΝΕΑ ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ, 2006



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ & ΚΕΝΤΡΟ ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 5684/1
Ημερ. Εισ.: 21-08-2007
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΦΠΑΠ
2006
ΓΚΟ

**Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της σεσάμιας του αραβοσίτου,
Sesamia nonagrioides (Lepidoptera:Noctuidae) με την μέθοδο
RFLPs.**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

	ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ
Ι.Α. ΤΣΙΤΣΙΠΗΣ:	Καθηγητής Εντομολογίας Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής παραγωγής και Αγροτικού περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Ι. ΓΟΥΝΑΡΗΣ	Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής παραγωγής και Αγροτικού περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας
Ν. ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΣ	Επίκουρος Καθηγητής Εντομολογίας Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής παραγωγής και Αγροτικού περιβάλλοντος Πανεπιστημίου Θεσσαλίας

Πρόλογος

Στην παρούσα εργασία εξετάζουμε την παραλλακτικότητα των γονιδίων του 16s RNA μεταξύ πληθυσμών του *Sesamia nonagrioides* (*Lepidoptera:Noctuidae*) χρησιμοποιώντας την μέθοδο RFLP (Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA). Πιο συγκεκριμένα οι ιδιαίτεροι στόχοι μας είναι: i) για να ερευνηθούν τη φυλογενετική ιστορία των πληθυσμών της Μεσογείου, συμπεριλαμβανομένων εκείνων από το βόρειο όριο της περιοχής διανομής των ειδών, και για να λάβουμε τις πληροφορίες για ii) το παρόν επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των πληθυσμών, και iii) το επίπεδο ροής γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών.

Η πτυχιακή διατριβή αποτελείται από δύο μέρη. Το πρώτο είναι το γενικό μέρος στο οποίο περιγράφονται η μορφολογία, η γεωγραφική εξάπλωση, οι ξενιστές και ο βιολογικός κύκλος του εντόμου. Επίσης στο γενικό μέρος δίδονται οι αρχές της μεθόδου της λειτουργίας της PCR και αναλύεται πιο διεξοδικά η μέθοδος RFLP (Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA). Στη συνέχεια γίνεται μια αναφορά στις μεθόδους που χρησιμοποιούνται για μελέτη με μοριακούς δείκτες. Τέλος δίδονται οι ιδιότητες του μιτοχονδριακού DNA και η μέθοδος έρευνας της παραλλακτικότητας του με τη χρήση ενζύμων περιορισμού

Στο δεύτερο και ειδικό μέρος περιγράφονται οι πειραματικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τα αποτελέσματα αυτών των εργασιών καθώς και η συζήτηση των συμπερασμάτων που προέκυψαν.

Αποτελέσματα της διατριβής έχουν δημοσιευθεί στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό *Bulletin of Entomological Research*.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Εντομολογίας κ. Ι. Α. Τσιτσιπή, ο οποίος με τίμησε με την εμπιστοσύνη του αναθέτοντας μου την εργασία αυτή, καθώς και για την καθοδήγηση, επίβλεψη και βοήθεια που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησής της.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρα Ι.Τ. Μαργαριτόπουλο για τη μετάδοση πολύτιμων επιστημονικών γνώσεων, τις πολύ χρήσιμες συζητήσεις που είχαμε και το ασταμάτητο ενδιαφέρον που έδειξε σε όλα τα στάδια της διατριβής μου.

Την Επίκουρο καθηγήτρια του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών Α.Α. Φαντινού, η οποία ήταν υπεύθυνη για τη συλλογή του βιολογικού υλικού.

Τον επίκουρο καθηγητή εντομολογίας Ν. Παπαδόπουλο για τα μαθήματα που μου έκανε στην ειδική εντομολογία καθώς επίσης και τον καθηγητή Ι.Γούναρη για τα μαθήματα που μου έκανε στην βιοχημεία και στην μοριακή γενετική. Τους ανωτέρω ευχαριστώ για τις υποδείξεις στο κείμενο της διατριβής μου.

Θερμές ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω και στους υποψήφιους Διδάκτορες Π.Ι. Σκούρα και Κ.Χ. Βουδούρη για την προσφορά βιβλιογραφικού και φωτογραφικού υλικού, καθώς επίσης και για την πολύτιμη βοήθειά τους στη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της εργασίας, όπως και το προσωπικό του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη βοήθεια και την συμπαράσταση που μου προσέφεραν.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου για την αμέριστη ηθική και υλική συμπαράσταση καθώς και τον αδερφό μου για τη κατανόηση και τη συμπαράστασή του όλο αυτό το διάστημα.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Α! ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.....	7
2. Περιγραφή.....	8
3. Γεωγραφική εξάπλωση- Ξενιστές.....	10
4. Βιολογικός κύκλος.....	10
5. Εχθροί-Καταπολέμηση.....	13
6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR).....	15
6.1. Γενικά.....	15
6.2. Αρχή της μεθόδου.....	17
6.3. Χαρακτηριστικά της τεχνικής PCR.....	24
6.4. Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR.....	26
6.5. Μέθοδοι (Γενικά).....	27
6.5.1 Αλλοένζυμα.....	27
6.5.2. Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD).....	27
6.5.3. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Random Fragment Length Polymorphism, RFLP).....	29
6.5.4. Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP).....	30
6.5.5. Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (SSR) και απλές σε σειρά επαναλήψεις (Sort Tandem Repeats, STR).....	33
6.5.6. Κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως δείκτες (STS, EST, SSCP, SNP, ASOH, DASH).....	34
6.6. Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα μεθόδων.....	36
7. RFLP (Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA).....	36
7.1. Εισαγωγή.....	36
7.2. Χρήση μεθόδου RFLP.....	37
7.3. Χρήση PCR-RFLP.....	38
7.4. Η χρήση των RFLP μαρτύρων (restriction fragment length polymorphism – πολυμορφισμός του μεγέθους των θραυσμάτων περιορισμού) στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος.....	39
8. Μιτοχονδριακό DNA (mtDNA).....	41
8.1. Εισαγωγή.....	41
8.2. Έρευνες της ποικιλότητας του mtDNA.....	45
9. Σκοπός της εργασίας.....	47

Β! ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή.....	48
2. Υλικά και Μέθοδοι	51
2.1. Βιολογικό υλικό.....	51
2.2. Μιτοχονδριακό DNA.....	53
2.2.1. Πειραματική διαδικασία.....	53
2.3. Δείκτες ποικιλία και γενετικής δομής πληθυσμού.....	57
2.3.1. Σχέση μεταξύ απλοτύπων.....	58
2.3.2. Δημογραφική ιστορία πληθυσμών.....	58
3. Στατιστική ανάλυση αποτελεσμάτων.....	59
3.1. Συχνότητες απλοτύπου μέσα στην ποικιλία πληθυσμού.....	59
3.2. Δομή πληθυσμού.....	63
3.3. Δημογραφική ιστορία πληθυσμών.....	63
4. Συζήτηση.....	64
4.1. Γεωγραφική δόμηση και διανομή.....	65
4.2. Χαμηλότερη ποικιλομορφία mtDNA στο βορρά.....	67
5. Βιβλιογραφία.....	72
6. Παράρτημά.....	81

Α! ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Εισαγωγή

Το γένος *Sesamia* περιλαμβάνει δύο είδη: Το είδος *nonagrioides* και το είδος *cretica* (Lepidoptera: Noctuidae). Μέχρι το 1967 εθεωρείτο ότι στην Ελλάδα ο κύριος εχθρός του αραβόσιτου ήταν το δεύτερο είδος. Ο Σταυράκης (1967) βρήκε ότι το πρώτο είδος ήταν το κυρίαρχο με πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης του δευτέρου. Σήμερα φαίνεται ότι αποκλειστικός εχθρός του αραβόσιτου στην Ελλάδα είναι το πρώτο είδος. Η σεζάμια (*S. nonagrioides*) θεωρείται ως έντομο του αραβόσιτου και είναι ευρέως διαδομένο στη χώρα μας και μπορεί να προκαλέσει στην καλλιέργεια αυτή σημαντικές οικονομικές ζημιές. Επίσης θεωρείται ως πιο σοβαρός εχθρός του αραβόσιτου και στην Ν. Ιταλία, ΝΔ. Γαλλία, Ισπανία, Ισραήλ. Η προσβολή από το έντομο μπορεί να είναι πολύ μεγάλη, ιδίως στην επίσπορη καλλιέργεια, την οποία μπορεί να καταστρέψει ολοσχερώς, όπως συνέβη στην περιοχή της Λάρισας το 1982 (Γλιάτης 1983).



Συνεπώς το λεπιδόπτερο *S.nonagrioides* είναι έντομο οικονομικής σημασίας για τις χώρες της Μεσογείου. Στην Ελλάδα υπάρχει σχεδόν σε όλες τις περιοχές που καλλιεργείται ο αραβόσιτος και προσβάλλει με ιδιαίτερη ένταση την επίσπορη καλλιέργεια στην οποία μπορεί να προκαλέσει ολοσχερή καταστροφή. Το μέγεθος της προσβολής της καλλιέργειας βρίσκεται σε σχέση με το ύψος του πληθυσμού, την εποχιακή του εμφάνιση, των αριθμό γενεών και γενικά με τη βιολογία και την οικολογία του εντόμου, τα οποία επηρεάζονται από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Ιδιαίτερη σημασία έχουν η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία, που με την επίδρασή τους στα έντομα επηρεάζουν την ανάπτυξή τους, την επιβίωσή τους, τη δυναμική αύξησης του πληθυσμού τους κ.λ.π. Η προνύμφη μπορεί να προκαλέσει εκτενή καταστροφή στο μίσχο αλλά και στο σπάδικα του καλαμποκιού. Αυτό όμως εξαρτάται από την χρονιά και την στιγμή που φυτεύουμε την καλλιέργεια. Το έντομο διαχειμάζει όταν είναι σε διάπαυση και βρίσκεται στο τελευταίο στάδιο της προνύμφης. Τα πρώτα ενήλικα εμφανίζονται από τις αρχές του Μαρτίου μέχρι τις αρχές Μαΐου για ήπιες και κρύες περιοχές αντίστοιχα. Το έντομο μπορεί να συμπληρώσει τρεις και μερικές φορές τέσσερις γενεές το χρόνο. Η πυκνότητα πληθυσμού είναι πολύ χαμηλή στις δύο πρώτες γενεές. Η τρίτη γενεά όμως δίνει ένα απότομο μέγιστο στο δεύτερο μισό του Αυγούστου και στο πρώτο μισό του Σεπτεμβρίου, το οποίο όμως διαφέρει σε άλλες νότιες ευρωπαϊκές χώρες. Στην Γαλλία για παράδειγμα η πυκνότητα των ενηλίκων δίνουν ένα μέγιστο το Μάιο-Ιούνιο. Συνεπώς ήπιοι χειμώνες μπορούμε να υποθέσουμε ότι επιτρέπουν την επιβίωση των εντόμων και άρα υψηλούς πληθυσμούς αυτών αρχικά. Στη Ελλάδα όσο πιο αργά ξεκινήσουμε την καλλιέργεια μας τόσο πιο πιθανό είναι να έχουμε μια σοβαρή προσβολή.

2. Περιγραφή

Ενήλικο (adult): Οι πρόσθιες πτέρυγες έχουν χρώμα τεφροκάστανο ανοιχτό ή ωχρό με όχι έντονες κηλίδες που ποικίλουν σε έκταση και ένταση. Το πρώτο ζεύγος πτερύγων έχει χρώμα μπεζ με μια πιο σκούρα επιμήκη ζώνη κατά μήκος της πίσω πλευράς και μια σειρά από σκούρα καφέ στίγματα περιφερειακά στις νευρώσεις. Οι οπίσθιες πτέρυγες είναι λευκές ή υπόλευκες. Το τέλειο έχει άνοιγμα πτερύγων 30-40 mm. Ο θώρακας στα νώτα είναι αρκετά χνουδωτός. Το θηλυκό *S.nonagrioides* δεν διακρίνεται από το θηλυκό *Sesamia cretica* παρά μόνο με εξέταση του γεννητικού οπλισμού. Οι κεραίες του θηλυκού είναι νηματοειδείς ενώ του αρσενικού είναι αμφικτενοειδείς. Οι κεραίες του αρσενικού έχουν δύο σειρές σχετικά μακρών σαν χτένι δοντιών πράγμα που το ξεχωρίζει από το αρσενικό *Sesamia cretica*.

Αυγό (egg): Στην αρχή το χρώμα του είναι λευκό ωχρό και αργότερα ρόδινο. Έχει σχήμα ελλειψοειδές, με μήκος όχι πολύ μεγαλύτερο του πλάτους του.

Προνύμφη: Οι προνύμφες έχουν σχεδόν ομοιόμορφα ρόδινο κιτρινωπό χρώμα με πλευρικές κατά μήκος γραμμές υπότεφρες. Φέρουν μαύρα στίγματα τα οποία είναι ευδιάκριτα. Τελικό μήκος φτάνει τα 35mm και κατ' άλλους 40mm. Η κεφαλή και η προθωρακική πλάκα είναι σκοτεινοκάστανες λαμπερές.

Στάδια ανάπτυξης του *S.Nonagrioides*



Αυγά του *S.Nonagrioides*

(<http://images.google.gr/images?q=sesamia+nonagrioides&hl=el>)



Στάδιο προνύμφης του *S.Nonagrioides*.

(<http://images.google.gr/images?q=sesamia+nonagrioides&hl=el>)



Ενήλικο στάδιο του *S.Nonagrioides*

(<http://images.google.gr/images?q=sesamia+nonagrioides&hl=el>)

3. Γεωγραφική εξάπλωση-Ξενιστές

Απαντά στις χώρες της μεσογείου μέχρι του 45^{ου} παραλλήλου καθώς και στις χώρες τις Κεντρικής και Δυτικής Αφρικής. Στην Ελλάδα υπάρχει σε όλες τις περιοχές που καλλιεργείται αραβόσιτος, αλλά οι πληθυσμοί είναι

σχετικά μικρότεροι στην ΒΑ Ελλάδα. Στην περιοχή του Έβρου εμφανίζεται αργά σε πάρα πολύ μικρούς αριθμούς μη προκαλώντας ζημιές στον αραβόσιτο.

Το έντομο προσβάλλει κυρίως τον αραβόσιτο (*Zea mays*), σόργο (*Sorghum bicolor*). Έχουν αναφερθεί όμως προσβολές και στα μικρά σιτηρά, το ρύζι, τους γλαδιόλους, την μπανάνα. Μπορεί να προσβάλλει επίσης άγρια σιτηρά όπως είναι ο βέλιουρας, η σετάρια και η *Typha angustifolia* το κοινό καλάμι κ.τ.λ.

4. Βιολογικός κύκλος

Ο κύκλος ζωής του εντόμου *S.nonagrioides* συνήθως συμπληρώνεται μέσα σε 6-8 εβδομάδες κατά την διάρκεια των καλοκαιρινών μηνών αλλά μπορεί να διαρκέσει περισσότερο εάν κάποιο στάδιο του γίνει και τους χειμερινούς μήνες. Γενικώς δεν μπορούμε να ξεχωρίσουμε με ευκολία κάποια γενεά, αφού όλα τα στάδια του κύκλου ζωής του εντόμου, αυγό (egg), προνύμφη (larvae), νύμφη ή πλαγγών (pupae) και ενήλικο ή τέλειο (adult or imago) μπορούν να υπάρχουν στον πληθυσμό οποιαδήποτε χρονική στιγμή. Συνοπτικά ο κύκλος ζωής του εντόμου είναι ο εξής:

Ενήλικα: Τα ενήλικα άτομα προκύπτουν από τις χρυσαλίδες (pupae) και ζευγαρώνουν. Τα θηλυκά απελευθερώνουν μια φερομόνη φύλων που προσελκύει τα αρσενικά με την βοήθεια του πνέοντος άνεμου.

Αυγά: Το θηλυκό έντομο μόλις ζευγαρώσει, γεννά τα αυγά του τη νύχτα κάτω από τους κολεούς των φύλλων των φυτών. Κάθε γέννα μπορεί να έχει 30-80 ή περισσότερα αυγά. Τα αυγά εκκολάπτονται μετά από μια εβδομάδα ανάλογα με την θερμοκρασία.

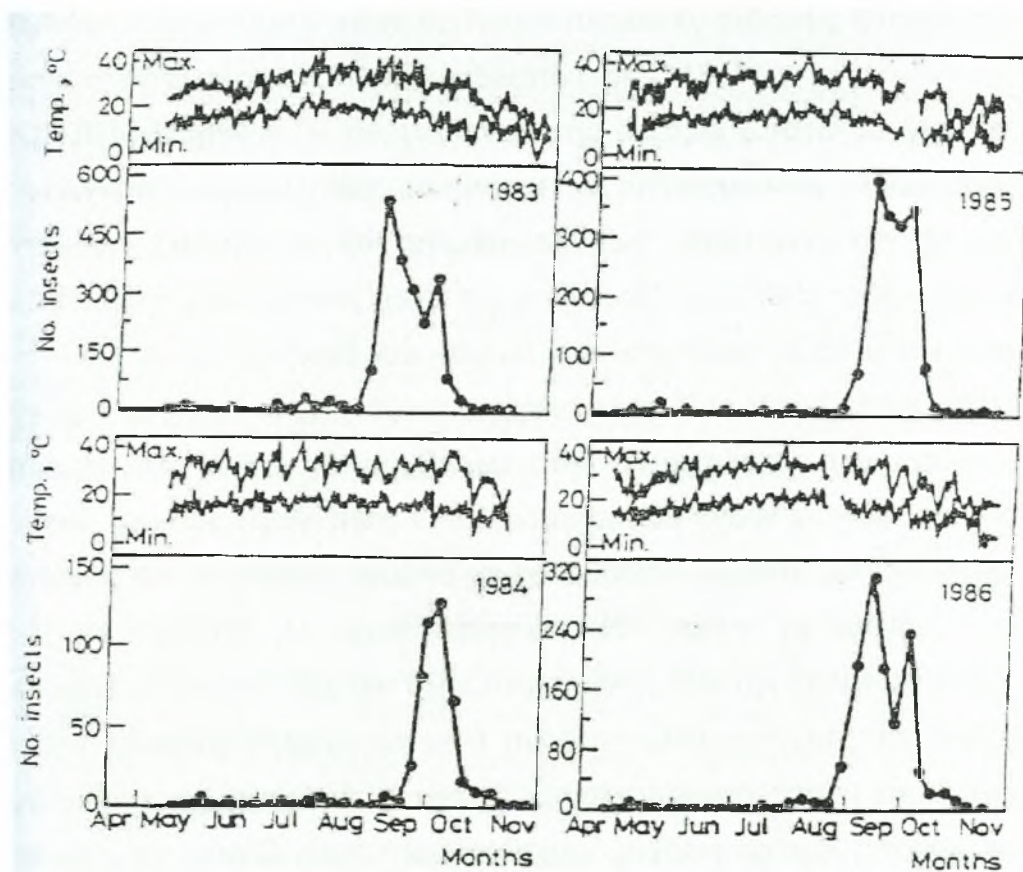
Προνύμφες: Σύντομα μετά από την εμφάνισή τους, οι προνύμφες ξεκινούν να τρέφονται στην περιοχή μεταξύ κολεού και στελέχους για μερικές ημέρες και μετά εισέρχονται στο στέλεχος δημιουργώντας στοές. Το στάδιο της προνύμφης διαρκεί 3-6 εβδομάδες το καλοκαίρι. Μέχρι να καταλήξουν στο στάδιο της νύμφης περνούν από 5 ηλικίες.

Νύμφη: Στο τελικό στάδιο οι προνύμφες δημιουργούν ένα θάλαμο γύρω τους, ο οποίος βρίσκεται μέσα σε μια κοιλότητα που υπάρχει στο στέλεχος του φυτού ή στην περίπτωση του σπάρδικα, στις στοές που έχουν κάνει και

τελικά μετατρέπονται σε χρυσαλίδες. Μετά από 2-3 εβδομάδες προκύπτουν τα ενήλικα.

Η ωοπαραγωγή είναι σε μεγάλο βαθμό σχετική με το βάρος του θηλυκού. Η διάρκεια επώασης είναι 6 ημέρες στους 25 °C. Οι νεαρές προνύμφες τρέφονται από το μερίστωμα του φύλλου επί 3-5 ημέρες και κατόπιν εισέρχονται στο στέλεχος όπου ανοίγουν στοές στις οποίες βρίσκονται περισσότερες από μια προνύμφες, ιδίως στα πρώτα υποστάδια τις ανάπτυξης τους. Η προνυμφική ανάπτυξη τους διαρκεί 25-30 ημέρες (25 °C). Με το τέλος της προνυμφιακής οι προνύμφες κατασκευάζουν νυμφικό θάλαμο μέσα στο στέλεχος, κοντά στην έξοδο, στην οποία αφήνουν ένα άνοιγμα καλυπτόμενο μόνο με την εφυμενίδα του στελέχους. Η νυμφική διάρκεια είναι περίπου 10 ημέρες (25 °C). Τα τέλεια που εξέρχονται δεν πετούν πολύ μακριά. Συζευγνύονται την ίδια ή την επόμενη ημέρα της εξόδου και αρχίζουν την ωτοκία σε γειτονικά συνήθως φυτά, δημιουργώντας εστίες προσβολών. Τα θηλυκά ζουν περίπου 1-2 εβδομάδες. Από το τέλος Ιουλίου, με την μείωση της διάρκειας της ημέρας, ένα μικρό μέρος των προνυμφών αρχίζει να μπαίνει σε διάπαυση. Το ποσοστό των διαπαουσών προνυμφών αυξάνεται με τον χρόνο και κατά το τέλος Αυγούστου όλες σχεδόν οι προνύμφες εισέρχονται σε διάπαυση (Θανόπουλος και Τσιτσιπής 1989β, Φαντινού, αδημοσίευτα στοιχεία). Κατά το διάστημα της ανάπτυξης συμπληρώνονται 3-4 γενεές. Το είδος της διάπαυσης είναι ολιγόπαυση όπου η "ωρίμανση" της διάπαυσης συμπληρώνεται σχετικά γρήγορα (Δεκέμβριο-Ιανουάριο). Η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης είναι περίπου 10 °C. Η εξίσωση θερμοκρασίας που εκφράζει την ανάπτυξη της σεζάμιας είναι: $Y(X-10.6)=K$, Y είναι η διάρκεια ανάπτυξης σε ημέρες, X είναι η θερμοκρασία, 10,6 είναι η ελάχιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και $K= 775.8$ ημεροβαθμοί (Θανόπουλος και Τσιτσιπής 1989α). Η σχέση αυτή κάνει δυνατή την πρόβλεψη εμφάνισης εντόμων λαμβάνοντας υπόψη τη θερμοκρασία και τις συνθήκες διάπαυσης του εντόμου. Η μορφή της καμπύλης πτήσης του εντόμου είναι πολύ χαρακτηριστική και επαναλαμβάνεται σχεδόν πανομοιότυπα από χρόνο σε χρόνο με ελάχιστες διαφορές. Αυτό διευκολύνει στην ανάπτυξη στρατηγικής καταπολέμησης του εντόμου. Στην αρχή της εμφάνισης του εντόμου, κατά την άνοιξη οι πληθυσμοί είναι πολύ μικροί. Το ίδιο ισχύει και για τους απογόνους της πρώτης γενεάς, που εμφανίζονται κατά τον Ιούνιο-Ιούλιο. Από τα μέσα

Αυγούστου, που αρχίζει η επόμενη γενεά, ο πληθυσμός αυξάνει πολύ απότομα επιτυγχάνοντας εξαιρετικά υψηλές τιμές μέσα στον Σεπτέμβριο. Από το τέλος Σεπτεμβρίου αρχές Οκτωβρίου, ο πληθυσμός αρχίζει να πέφτει πάλι απότομα φθάνοντας σε μικρούς αριθμούς προς το τέλος του Οκτωβρίου. Μερικές φορές είναι εμφανές ένα δεύτερο μέγιστο εντός του Οκτωβρίου υποδηλώνοντας επικάλυψη γεννεών (Σχήμα 1) (Tsitsipis *et al* 1984. Τσιτσιπής και συνεργάτες 1984, αδημοσίευτα στοιχεία). Οι μεγάλοι διαχειμάζοντες πληθυσμοί οφείλονται κυρίως στις ευνοϊκές συνθήκες του χειμώνα (όχι πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και όχι πολλές βροχές). Θερμοκρασίες χαμηλότερες των 8 °C έχουν ως αποτέλεσμα την καταστροφή πολύ μεγάλου αριθμού προνυμφών.



ΣΧΗΜΑ 1: Συλλήψεις αρσενικών του εντόμου *Sesamia nonagrioides* με παγίδες φερομόνης σε διάφορες περιοχές της Ελλάδας κατά τα έτη 1983-1986. (Τσιτσιπής, Ι.Α. 1999) Εφαρμοσμένη εντομολογία Έντομα αραβόσιτου. Έκδοση: Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, σελ:71.

5. ΕΧΘΡΟΙ-ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ

ΕΧΘΡΟΙ: Η σεζάμια έχει αρκετούς βιολογικούς εχθρούς, κυρίως παράσιτα. Από τα αρκετά που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία τα σπουδαιότερα στον ελληνικό χώρο είναι το ωοπαράσιτο *Platytenomus busseolae* (Hymenoptera:Scelionidae), που βρέθηκε στην περιοχή της Ιστιαίας να παρασιτεί σε υψηλό ποσοστό στη σεζάμια (Alexandri and Tsitsipis 1990). Επίσης το *Lydella thompsoni* (Diptera:Tachinidae) που είναι παράσιτο της προνύμφης της σεζάμια, που έχει αναφερθεί από τον Σταυράκη, βρέθηκε σχεδόν σε όλες τις περιοχές που καλλιεργείται αραβόσιτος εκτός της Λήμνου με πολύ καλή δραστηριότητα στην περιοχή του Δέλτα του Έβρου (Τσιτσιπής και Αλεξανδρή αδημοσίευτα στοιχεία. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Θεσσαλίας, Εφαρμοσμένη εντομολογία, έντομα αραβόσιτου, σελ:71).

ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ: Η αντιμετώπιση της σεζάμια μπορεί να γίνει με μερικές καλλιεργητικές φροντίδες που μπορεί να μειώσουν τους πληθυσμούς του εντόμου. Συστήνεται το παράχωμα των στελεχών και άλλων υπολειμμάτων της καλλιέργειας, μετά την συγκομιδή, με βαθιές αρόσεις κατά το φθινόπωρο ή το ξερίζωμα και κάψιμο των στελεχών μέσα στα οποία βρίσκουν καταφύγιο και διαχειμάζουν οι προνύμφες. Ένα τέτοιο μέτρο για να είναι αποτελεσματικό και να συμβάλλει στην αντιμετώπιση του εντόμου, παρόλο που αρκετές προνύμφες επιβιώνουν επειδή έχουν εισχωρήσει στο υπόγειο μέρος του στελέχους, πρέπει να εφαρμόζεται ομαδικά και συλλογικά από τους καλλιεργητές. Σε καμιά περίπτωση δεν πρέπει να αφήνονται τα φυτά του αραβοσίτου στο χωράφι όλον το χειμώνα μέχρι την επόμενη άνοιξη. Όργωμα του εδάφους το χειμώνα, μετά την συγκομιδή και νωρίς την άνοιξη εκθέτει τα έντομα σε δυσμενείς συνθήκες. Επίσης πρώιμη σπορά επιταχύνει την ανάπτυξη του φυτού, ώστε όταν υπάρχουν μεγάλοι αριθμοί εντόμων να έχει γίνει το πήξιμο του σπόρου και να μην προσβάλλεται από την σεζάμια. Χρησιμοποίηση παρασίτων είναι πιθανόν να συμβάλλει σημαντικά στην διαχείριση του πληθυσμού της σεζάμια. Τέλος έχει παρατηρηθεί ότι σε καλά αρδεύομενους αγρούς ή μετά από βροχές δημιουργούνται δυσμενείς συνθήκες για τις κάμπιες, οι οποίες φαίνεται ότι αποβάλλονται από τα φυτά

χάρης σε μια χημειοτροπικά αρνητική γλοιώδη ουσία που εκκρίνουν τα φυτά. Σε αυτές τις περιπτώσεις οι ζημιές είναι μικρότερες.

Όσον αφορά τα χημικά μέσα, η χημική καταπολέμηση αποτελεί μέθοδο άμεσης αποτελεσματικότητας, όταν χρησιμοποιείται σωστά. Η παρακολούθηση του πληθυσμού των τέλειων με παγίδες φερομόνης καθορίζει τον χρόνο επέμβασης με εντομοκτόνα. Η έγκαιρη επέμβαση έχει μεγάλη σημασία γιατί θα πρέπει να γίνει πριν εισέλθουν οι προνύμφες στο στέλεχος του φυτού. Η επίσπορη καλλιέργεια του αραβόσιτου χρειάζεται οπωσδήποτε προστασία με εντομοκτόνα. Ένα πρόγραμμα ψεκασμών με συνθετικές πυρεθρίνες περιλαμβάνει 2-3 ψεκασμούς. Ο πρώτος ψεκασμός πρέπει να γίνει 10 ημέρες μετά την έναρξη αύξησης του πληθυσμού του εντόμου όπως καταγράφεται σε παγίδες φερομόνης (είναι συνήθως στα μέσα Αυγούστου, αλλά πρέπει να επιβεβαιωθεί για την συγκεκριμένη χρονιά). Οι υπόλοιποι δυο θα γίνονται ανά διάστημα είκοσι ημερών. Δυο ψεκασμοί έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα με τρεις στην Κωπαΐδα το 1987 (Tsitsipis 1987). Συνιστάται, όταν γίνεται πότισμα με καταιονισμό, αυτό να προηγείται της εφαρμογής των ψεκασμών κατά 1-2 ημέρες. Απαιτείται προσοχή για την καλή διαβροχή του στελέχους με το ψεκαστικό υγρό. Τα χλωριωμένα εντομοκτόνα, Aldrin, Dieldrin, BCH και άλλα συγγενή που εφαρμόστηκαν σε ψεκασμούς (προ της απαγορεύσεως τους), έχουν δώσει αρκετά καλά αποτελέσματα στο παρελθόν. Συστήνονται 2-3 ψεκασμοί. Ο πρώτος ενεργείται μόλις διαπιστωθούν οι πρώτες προσβολές. Οι ψεκασμοί επαναλαμβάνονται ανάλογα με την πορεία της προσβολής.

6. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ

6.1. Γενικά

Η γενετική παραλλακτικότητα και η ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι δυο μεγάλα θέματα που απασχόλησαν και απασχολούν τους επιστήμονες. Η περισσότερη έρευνα που γίνεται σε αυτούς τους τομείς επικεντρώνεται στην εξέταση των εκάστοτε οργανισμών σε μοριακό επίπεδο (DNA), ώστε να γίνει λεπτομερέστερη ανάλυση και σαφώς πιο ακριβής εξαγωγή συμπερασμάτων. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε τέτοιου είδους μελέτες.

Συγκεκριμένα, υπάρχει μεγάλο εύρος μεθόδων και προσεγγίσεων για τον καθορισμό και την αποκρυπτογράφηση των αλληλουχιών του DNA. Ο βαθμός επιτυχίας της κάθε μεθόδου βασίζεται στο επίπεδο της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων και σε αυτό ακριβώς βασίζεται η αξιοπιστία της από τον ερευνητή που τη χρησιμοποιεί.

Όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται βασίζονται στην εύρεση και αναγνώριση **πολυμορφικών τόπων**. Οι πολυμορφικοί τόποι είναι περιοχές ή σημεία στη γενετική δομή που μπορεί να διαφέρουν από άτομο σε άτομο. Αυτή η παραλλακτικότητα οφείλεται κυρίως σε διαφορές που υπάρχουν στον αριθμό των επαναλήψεων των νουκλεοτιδίων, μέσα στην ίδια τοποθεσία. Ωστόσο, ενώ ο πολυμορφισμός μπορεί να σχετίζεται με αυτό, ο τόπος ή το γονίδιο μπορεί να μεταβάλλονται μεταξύ φυλών ή μεταξύ ατόμων (π.χ ετεροζύγωτα και ομοζύγωτα). Για την αναγνώριση τέτοιων τόπων χρησιμοποιούνται κυρίως μέθοδοι που περιλαμβάνουν τη χρήση μοριακών δεικτών. Οι μοριακοί δείκτες, όπως όλοι οι γενετικοί δείκτες, στην ουσία αποτελούν μέρος της διακριτικής ικανότητας, σε επίπεδο DNA, του γενετικού υλικού δυο ή περισσότερων ατόμων του ίδιου πληθυσμού. Άλλοι γενετικοί δείκτες είναι οι φαινοτυπικοί ή βιοχημικοί. Οι πρώτοι αναφέρονται στα μορφολογικά χαρακτηριστικά και μπορούν να εκτιμηθούν οπτικά, αλλά όμως επηρεάζονται από το περιβάλλον. Οι βιοχημικοί δείκτες βασίζονται στους πολυμορφισμούς των ισοενζύμων (Χατζόπουλος 2001).

Οι μοριακοί δείκτες που είναι γενετικά χαρτογραφημένοι είναι χρήσιμοι για τη μελέτη της κληρονομικότητας γενετικών χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών και ως σύγχρονα εργαλεία χρησιμοποιούνται και στο χρωμοσωμικό βάδισμα για απομόνωση γονιδίων. Οι γενετικοί χάρτες είναι μια συλλογή στατιστικών εκτιμήσεων πολλών δεδομένων από την κατανομή των δεικτών σε πολλούς γονιδιακούς τόπους. Οι γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι λειτουργικά γονίδια, τα οποία επηρεάζουν το φαινότυπο ενώ οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNA χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο και δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον μια και αξιοποιούν τον πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA, χωρίς αναγκαία επίπτωση στα προϊόντα που τυχόν κωδικοποιούν. Επιπλέον, δεν εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού και δύνανται να καλύψουν

ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις (Χατζόπουλος 2001).

Αν θεωρηθεί ότι κάθε ένας μοριακός δείκτης αντιπροσωπεύει ένα σημείο από το γενετικό υπόβαθρο κάθε ατόμου, τότε η εκτίμηση όλων των αποτελεσμάτων που προέρχονται από την ανάλυση 2 σημείων, 3 σημείων ή η σημείων διαμορφώνει μια σύνδεση των σημείων. Αλληλόμορφα των μοριακών δεικτών του ίδιου χρωμοσώματος τείνουν να κληρονομούνται μαζί επιτρέποντας την ομαδοποίησή τους σε ομάδες σύνδεσης. Η σειρά των μοριακών δεικτών πάνω στο χρωμόσωμα και η γενετική απόστασή τους, που βασίζεται στο ποσοστό ανασυνδυασμού μεταξύ τους, εξαρτάται από το μέγεθος και τον τύπο του πληθυσμού που χρησιμοποιείται καθώς και από το γενετικό υπόβαθρο του οργανισμού. Η προσθήκη νέων δεικτών μπορεί να αλλάξει κάποιο προϋπάρχοντα γενετικό χάρτη. Οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται επίσης για τη δημιουργία δένδρων συγγένειας ή εξέλιξης διαφόρων ποικιλιών ή οικοτύπων (Χατζόπουλος 2001).

Οι μοριακοί δείκτες πρέπει να συγκεντρώνουν τα περισσότερα από τα παρακάτω γνωρίσματα ώστε να παρουσιάζουν τη μέγιστη χρησιμότητα:

- (1) Παρουσία πολυμορφισμού.
- (2) Απλή κληρονομικότητα, που στην ιδανική περίπτωση ελέγχεται από ένα γενετικό τόπο με συγκυρίαρχους αλληλομόρφους.
- (3) Υψηλό συντελεστή κληρονομικότητας. Σταθερός φαινότυπος κάτω από ποικίλες περιβαλλοντικές συνθήκες καθώς αξιοποιείται ο πολυμορφισμός που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA και όχι στην παραλλακτικότητα της έκφρασης των γονιδίων.
- (4) Διασπορά και στην ιδανική περίπτωση ισοκατανομή σε ολόκληρο το γονιδίωμα.
- (5) Ανεξαρτησία της βιωσιμότητας και του φαινοτύπου των οργανισμών.
- (6) Η μεθοδολογία αναγνώρισης να μην κοστίζει πολύ, να μην έχει αρνητικές συνέπειες στον οργανισμό και να είναι εύκολη και δυνατή κατά τα νεαρά στάδια της ανάπτυξης των οργανισμών και συγκεκριμένα όταν αυτοί αναπτυχθούν τόσο, ώστε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA.

Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίησή τους. Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται εξελίσσονται συνεχώς και η χρήση της μιας ή της άλλης

εξαρτάται από το ποσοστό επιθυμίας σάρωσης των χρωμοσωμάτων με τους μοριακούς δείκτες, από το χρόνο, από το κόστος, αλλά επίσης και από το βαθμό ετεροζυγωτίας. Παρακάτω αναφέρονται οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες μέχρι σήμερα που δίνουν ένα καλό βαθμό επαναληψιμότητας.

Οι περισσότερες από τις μεθοδολογίες που αναφέρονται παρακάτω βασίζονται εν μέρει στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR) ώστε να επιτυγχάνεται και να ενισχύεται ο πολυμορφισμός. Για αυτό το λόγο πριν αναλυθεί η κάθε μέθοδος χωριστά, είναι απαραίτητο να εξηγηθεί τι ακριβώς είναι η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης.

6.2. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction) στηρίζεται στην κινητική επανασύνδεση θερμικά αποδιαταγμένου δίκλωνου DNA, ιδιαίτερα δε στην αρχή, που ο χρόνος επανασύνδεσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση και την πολυπλοκότητα των συμβαλλομένων συμπληρωματικών αλυσίδων. Με την μέθοδο PCR επιτυγχάνεται ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός *in vitro* τμήματος DNA που ονομάζεται και DNA στόχος, από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος εντός ολίγων ωρών. Η μέθοδος πραγματοποιείται σε κύκλους, όπου ο κάθε κύκλος αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Με τον τρόπο αυτό από αρχική ποσότητα δείγματος DNA μη ανιχνεύσιμου με κλασσικές τεχνικές υβριδισμού (Southern and Northern blotting), ο DNA στόχος ενισχύεται με την PCR σε σημείο που γίνεται ευρέως ανιχνεύσιμος (Williams *et al.*, 1991).

Συνεπώς η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση (δημιουργία πολλών αντιγράφων) ενός τμήματος DNA. Η PCR επιτρέπει σε μια μικρή ποσότητα DNA να αντιγραφεί πολλές φορές ώστε να είναι αρκετή και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση. Η τεχνική αυτή είναι πολύ διαδεδομένη στις βιολογικές επιστήμες και χρησιμοποιείται σε πολλές και διαφορετικές περιπτώσεις όπως: ανίχνευση κληρονομήσιμων ασθενειών, διάγνωση μολυσματικών ασθενειών, κλωνοποίηση γονιδίων, test πατρότητας

κ.α. (Sambrook & Russell 2001, McPherson & Moller 2000, Higuchi et al. 1992, Higuchi et al. 1993, Wong 2005)

Η PCR ανακαλύφθηκε το Δεκέμβριο του 1983 από τον Δρ. **Kary Mullis** (Mullis 1983). Για αυτό το επίτευγμα βραβεύθηκε το 1993, μόλις 7 χρόνια αφού δημοσίευσε τις ιδέες του, με το βραβείο Nobel Χημείας. Αυτό το οποίο σκέφτηκε να κάνει ο Mullis ήταν να δημιουργήσει μια τεχνική με την οποία το DNA θα μπορούσε να πολλαπλασιάζεται μέσω επαναλαμβανόμενων κύκλων διπλασιασμού, στους οποίους κύριο ρόλο θα είχε ένα ένζυμο και συγκεκριμένα η DNA πολυμεράση (Sambrook & Russell 2001, McPherson & Moller 2000, Higuchi et al. 1992, Higuchi et al. 1993, Wong 2005).

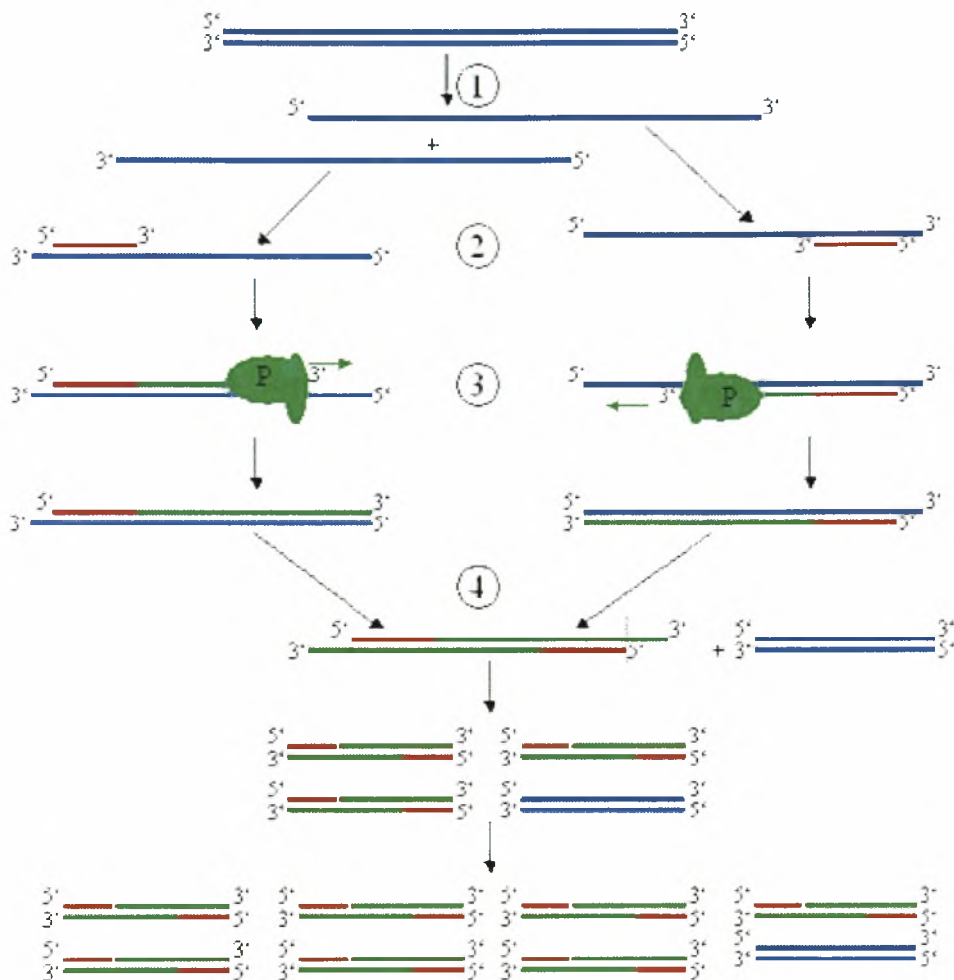
Η αρχή της λειτουργίας της μεθόδου (Mullis *et al.*, 1987) στηρίζεται στη χρήση:

- Ειδικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA Polymerase) που έχει απομονωθεί από το θερμόφιλο βακτήριο, *Thermus aquaticus* (Taq), και είναι θερμοσταθερή, διατηρώντας τη δραστηριότητά της σε θερμοκρασίες 95° C για 40 τουλάχιστον λεπτά.
- Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων (συνήθως 15-30 βάσεων) τα οποία ονομάζονται εκκινητικά μόρια ή primers. Οι εκκινητές υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA.
- Κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs).
- Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂.
- Κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος απαραίτητου για τη δράση της Taq πολυμεράσης.
- Μικρή ποσότητα DNA, που παίζει το ρόλο μορίου μήτρας.

Η DNA πολυμεράση βρίσκεται στη φύση σε ζωντανούς οργανισμούς και η λειτουργία της είναι ο διπλασιασμός του DNA στη φάση του διαχωρισμού των κυττάρων κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της μείωσης. Στο εργαστήριο, με την τεχνική PCR το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που επιδιώκεται να αντιγραφεί από βραχέα ολιγονουκλεοτίδια που δρουν ως εκκινητές (primers), τα οποία υβριδίζονται με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να

υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές παρασκευάζονται με χημική σύνθεση και για αυτό η τεχνική PCR χρησιμοποιείται μόνο για την κλωνοποίηση κλασμάτων DNA με γνωστή αλληλουχία των δυο άκρων τους. Υπό την καθοδήγηση των εκκινητών η DNA πολυμεράση παράγει πολλά αντίγραφα της επιλεγμένης αλληλουχίας. Η τεχνική PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη: μπορεί να ανιχνεύσει, έστω και ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, επαυξάνοντάς το τόσο πολύ, ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί με κατάλληλη χρώση μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (Alberts et al. *et al.* 1998).

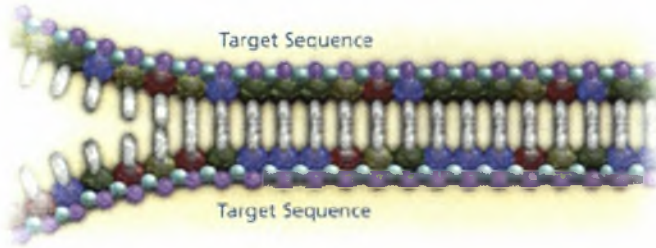
Γενικά κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από τρία στάδια. Το πρώτο στάδιο της PCR είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA στόχου, κατά την οποία το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Ακολουθεί θερμική επαναδιάταξη του DNA, κατά την οποία τα δύο συνθετικά νουκλεοτίδια (primers), συνδέονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου, δηλαδή τις απλές αλυσίδες DNA (2^ο στάδιο). Κατά το τρίτο στάδιο λαμβάνει χώρα η σύνθεση DNA (πολυμερισμός), με το διπλασιασμό του DNA-στόχου, παρουσία της θερμοσταθερής DNA πολυμεράσης και τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, οπότε οι συμπληρωματικές βάσεις προστίθενται στα 3' άκρα των εκκινητικών μορίων και οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται. Η σύνθεση DNA γίνεται πάντα προς την κατεύθυνση 5'→3'. Το σύνολο των τριών φάσεων α)μετουσίωσης-αποδιάταξης (denaturation), β)υβριδισμού-πρόσδεσής των εκκινητών επί των συμπληρωματικών τους αλληλουχιών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA-στόχου (annealing) και γ) επέκτασης-πολυμερισμού των προσδεδεμένων εκκινητών (extension), αποτελεί ένα κύκλο της αντίδρασης PCR (Σχήμα 2).



Σχήμα 2. Τα στάδια της PCR: (1) Αποδιάταξη, (2) Συγκόλληση, (3) Επέκταση, P = πολυμεράση, (4) Τέλος πρώτου κύκλου
(<http://www.ja.wikipedia.org>).

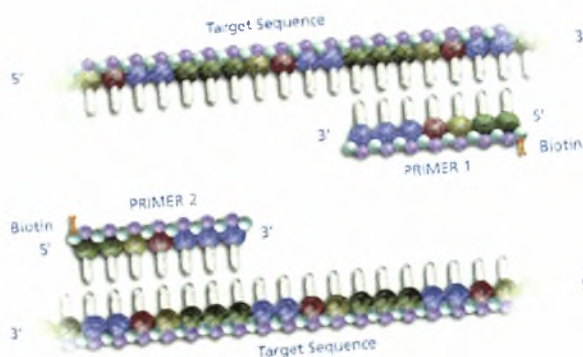
Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία της PCR αποτελείται από είκοσι μέχρι τριάντα κύκλους και κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία στάδια που το καθένα αναλυτικά είναι:

(1) Το δίκλωνο μόριο του DNA πρέπει να θερμανθεί στους 94-96°C έτσι ώστε να χωριστεί σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες. Η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δυο αλυσίδες μεταξύ τους και έτσι διαχωρίζονται. Αυτό το στάδιο ονομάζεται **αποδιάταξη** και ο χρόνος που συνήθως διαρκεί είναι 1-2 λεπτά



ΣΤΑΔΙΟ 1^ο: Αποδιάταξη, διαχωρισμός της δίκλωνης αλυσίδας DNA.
 1minute 94°C. (<http://www.ja.wikipedia.org>).

(2) Αφού γίνει ο διαχωρισμός των δυο αλυσίδων του DNA, η θερμοκρασία χαμηλώνει ώστε οι εκκινητές να μπορούν να προσκολληθούν σε κάθε μια από τις μονές αλυσίδες. Αυτό το στάδιο ονομάζεται **συγκόλληση**. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου εξαρτάται από τους εκκινητές και είναι συνήθως 5°C χαμηλότερα από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m). Συνήθως η θερμοκρασία αυτή κυμαίνεται από 45 μέχρι 60°C και έχει μεγάλη σημασία γιατί αν δεν είναι η ιδανική για τον εκάστοτε εκκινητή που χρησιμοποιείται, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μη συγκόλληση του εκκινητή στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA ή την συγκόλλησή του σε τυχαία θέση. Η διάρκεια του σταδίου της συγκόλλησης κυμαίνεται από 1 έως 2 λεπτά.

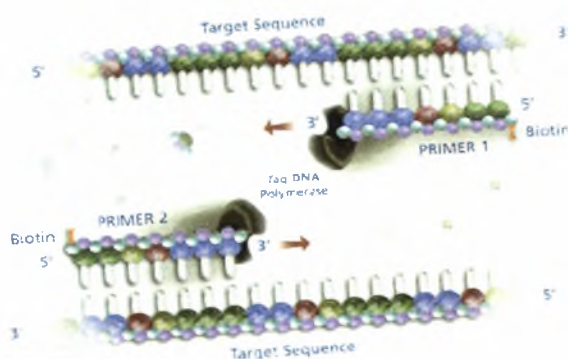


ΣΤΑΔΙΟ 2^ο: Υβριδισμός συγκόλληση των εκκινητών σε κάθε μια από τις μονές αλυσίδες DNA. 45 seconds 54°C. (<http://www.ja.wikipedia.org>).

(3) Τέλος, η DNA-πολυμεράση πρέπει να συμπληρώσει τις αντίστοιχες αλληλουχίες στη κάθε αλυσίδα που συγκολλήθηκαν οι εκκινητές. Ξεκινάει από τον εκκινητή και συνεχίζει κατά μήκος της αλυσίδας. Αυτό το στάδιο

ονομάζεται **επέκταση** και η θερμοκρασία εξαρτάται από τη DNA-πολυμεράση.

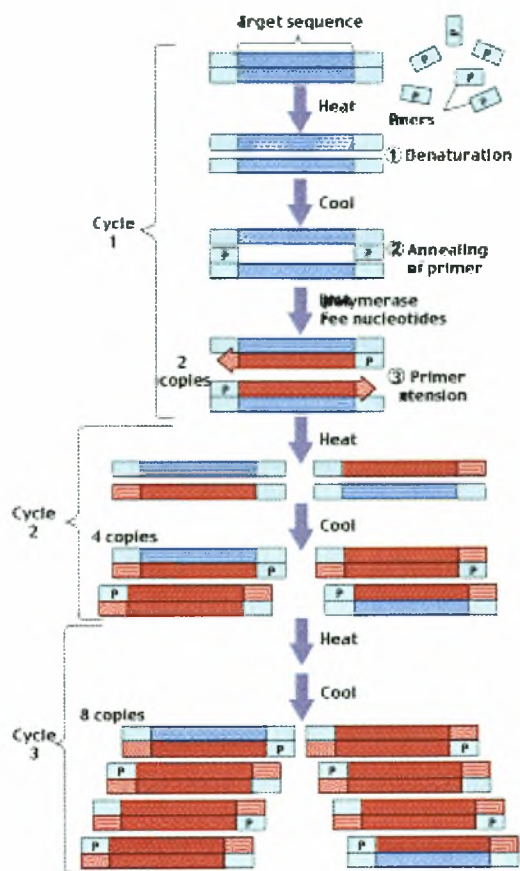
Ο χρόνος που διαρκεί το τελευταίο στάδιο της PCR εξαρτάται τόσο από την DNA-πολυμεράση όσο και από το μήκος του τμήματος του DNA που πρέπει να ενισχυθεί. Κάτι που ισχύει και πρέπει να λαμβάνεται υπόψη στο τελευταίο στάδιο της συγκόλλησης είναι ότι το ένζυμο DNA-πολυμεράση προσθέτει στη θυγατρική αλυσίδα DNA περίπου 150 νουκλεοτίδια το δευτερόλεπτο.



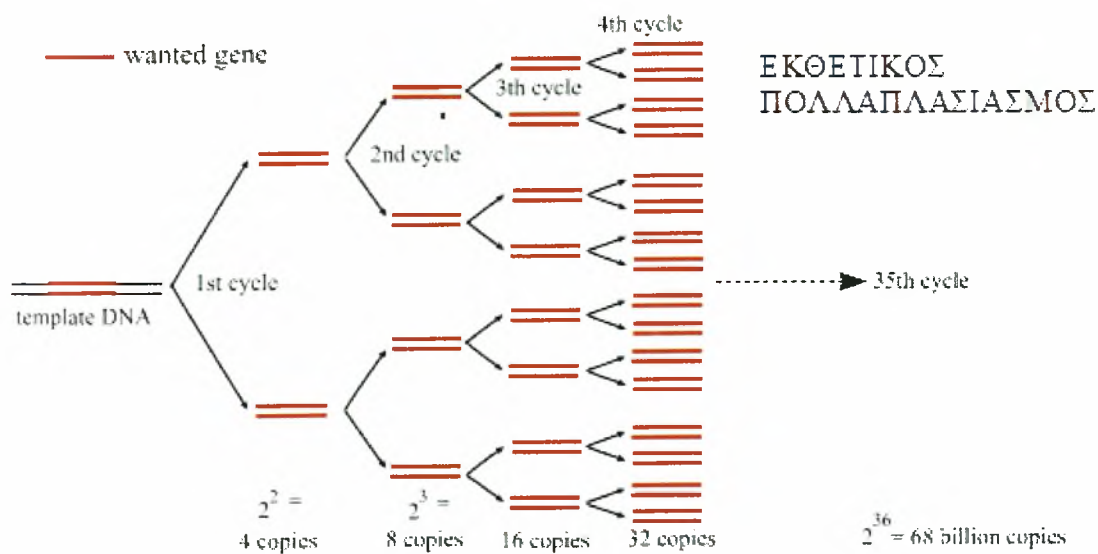
ΣΤΑΔΙΟ 3^ο: Συγκόλληση των εκκινητών και δημιουργία δυο δίκλωνων μορίων DNA.

2minutes 72°C. DNTP's. (<http://www.ja.wikipedia.org>).

Στο τέλος της διαδικασίας, από μια δίκλινη γονική έλικα DNA δημιουργούνται δύο θυγατρικές δίκλωνες έλικες DNA, στον αμέσως επόμενο κύκλο οι δίκλωνες έλικες DNA γίνονται 4 (δυο του αρχικού υποστρώματος και δυο αντίγραφα) που αποτελούν πρότυπα-καλούπια για την σύνθεση νέων κλώνων DNA-στόχου στον επόμενο κύκλο (Εικόνα 1). Σε κάθε νέο κύκλο οι κλώνοι θα αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά 2^n όπου n ο αριθμός των κύκλων αντίδρασης. Ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται για 25-40 κύκλους. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός του τμήματος DNA-στόχου εκατομμύρια φορές μέσα σε λίγες ώρες. Μάλιστα, αν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε μετά από 25 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{25} (33.554.432) αντιγράφων, ενώ μετά από 40 κύκλους έχουμε την παραγωγή 2^{40} (1.099.511.627.776) μονόκλωνων συμπληρωματικών αντιγράφων DNA-στόχου (Εικόνα 2).



ΕΙΚΟΝΑ 1: Οι τρεις πρώτοι κύκλοι της PCR.



ΕΙΚΟΝΑ 2: Εκθετικός πολλαπλασιασμός του DNA-στόχου.

6.3. Χαρακτηριστικά της τεχνικής της PCR

Η επιτυχία της PCR εξαρτάται κυρίως από την θερμοκρασία υβριδισμού T_a , η οποία εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων με τον DNA-στόχο. Όσο πλησιέστερη είναι η T_a προς την T_m που είναι η θερμοκρασία τήξεως (melting temperature) τόσο μεγαλύτερη είναι η ειδικότητα της αντίδρασης. Η ειδικότητα εξαρτάται επίσης από την συγκέντρωση ιόντων Mg^{++} , τον αριθμό των κύκλων, τη συγκέντρωση του ενζύμου Taq DNA πολυμεράσης καθώς και από τη συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων και του DNA-στόχου. Η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης πιστοποιείται με την παρουσία ομοιογενούς προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου EtBr (1mg/ml). Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών βάσεων της διπλής έλικας και διευκολύνει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR σε περιβάλλον υπεριώδους φωτισμού.

Η ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR γίνεται με υβριδισμό με γνωστό ανιχνευτή (probe) σημασμένο με ^{32}P , ή βιοτίνη, ή φλουορεσκίνη, ή αλκαλική φωσφάτη, ή υπεροξειδάση ή κάποια άλλη εύκολα ανιχνεύσιμη ουσία. Εναλλακτικά, η ταυτότητα του προϊόντος της γονιδιακής επέκτασης, μπορεί να εξακριβωθεί με ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων διάσπασης από κατάλληλα περιοριστικά ένζυμα.

Το κύριο χαρακτηριστικό της PCR είναι η πολύ μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου. Με ραδιενεργό σήμανση του μορίου ανιχνευτή (probe), είναι δυνατή η ανίχνευση έως 1 pg DNA. Η ευαισθησία μπορεί να αυξηθεί στο 1 fg με την τεχνική της εντοπισμένης PCR (nested PCR). Στην τεχνική αυτή 1-2 μl του προϊόντος της PCR υποβάλλονται σε δεύτερη PCR με νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων, εσωτερικό (inner primers) των αρχικών (outer primers), με αποτέλεσμα όταν η πρώτη PCR γίνει για 25 κύκλους και το προϊόν της υποβληθεί σε επανεντοπισμένη PCR για 25 ακόμη κύκλους, να παράγονται 1.1×10^{15} αντίγραφα του DNA-στόχου. Θεωρητικά η επανεντοπισμένη PCR έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει 1 αντίγραφο προϊόντος HIV (Human Immunodeficiency Virus) σε 1×10^6 κύτταρα (Innis *et al.*, 1990).

Η τεχνική της PCR είναι πολύ ευαίσθητη στις μολύνσεις και έτσι είναι πιθανόν να οδηγήσει σε θετικά τα οποία όμως δεν είναι πραγματικά. Η επιμόλυνση είναι δυνατόν να προκληθεί και από αιωρούμενο (aerosol) DNA ή πλασμίδιο στο χώρο εργασίας. Προς αποφυγή των επιμολύνσεων, η προετοιμασία των χώρων εκτέλεσης της τεχνικής πρέπει να είναι σχολαστική. Για τον περιορισμό των πιθανοτήτων επιμολύνσεων συνιστάται: α) χρήση διαφορετικών χώρων επεξεργασίας των δειγμάτων και διεξαγωγής των αντιδράσεων, κυρίως σε περιπτώσεις διαδοχικών PCR, β) χρησιμοποίηση διαφορετικών συσκευών καθέτου νηματικής ροής (laminar flow hood) για την απομόνωση του DNA και την προετοιμασία των αντιδραστηρίων και γ) αποστείρωση αντιδραστηρίων και σωληναρίων, προσεκτικός καθαρισμός πιπετών με αιθανόλη και έκθεση του χώρου ή των χώρων εργασίας σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μετά το τέλος της εργασίας για 12 τουλάχιστον ώρες. Οι διαγνωστικές εφαρμογές της PCR, και των επανεντοπισμένων παραλλαγών της πρέπει να εκτελούνται με ιδιαίτερη προσοχή. Σε κάθε αντίδραση PCR, πρέπει να περιλαμβάνονται πολλοί μάρτυρες και να μην αξιολογείται κάποιο δείγμα σαν θετικό αν δεν επαναληφθεί και επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα δυο τουλάχιστον φορές ιδανικά με δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών.

Η επιλογή του προς επέκταση στόχου καθώς και ο σχεδιασμός των κατάλληλων οδηγών και ανιχνευτών έχει μεγάλη σημασία, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ανίχνευσης ποικίλων ιών όπως ο HIV και γονιδιακών περιοχών εντόμων ανακατανομών και μεταλλαξιμότητας, όπως για παράδειγμα διάφορων εύθραυστων αυτοσωμικών περιοχών ή των ψευδοαυτοσωματικών περιοχών του Υ χρωμοσώματος. Επί θετικών δειγμάτων, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα από τέσσερα διαφορετικά ζεύγη εκκινητικών μορίων, όπως συνηθίζεται για την επέκταση διαφορετικών γονιδιακών περιοχών, τότε η ευαισθησία και η ειδικότητα της μεθόδου είναι δυνατό να υπερβεί το 97%.

6.4. Πλεονεκτήματα και σημασία της τεχνικής PCR

Η τεχνική της PCR είναι γρήγορη και απλή μέθοδος, σχετικά φθηνή, δεν απαιτεί τη χρήση ραδιενέργειας ούτε πληροφορία για την ακολουθία του DNA και μπορεί να εκτελεστεί χρησιμοποιώντας ελάχιστες ποσότητες ιστού χωρίς τη θανάτωση του δείγματος. Επιπλέον μπορεί να εφαρμοστεί σε DNA το οποίο προέρχεται από απολιθώματα καθιστώντας έτσι τον προσδιορισμό γενετικών δομών από πληθυσμούς του παρελθόντος.

Η PCR εντάσσεται μαζί με την τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και τη διαγονιδιακή τεχνολογία, στις βιοτεχνολογικές μεθόδους συνθετικής προσέγγισης του φαινομένου της ζωής. Η σύγχρονη συνθετική μεθοδολογία στηρίζεται στην κατανόηση και αξιοποίηση των γνώσεων της αναλυτικής μεθοδολογίας, από την οποία προέρχεται και της οποίας αποτελεί λογική συνέχεια και ολοκλήρωση. Την τεράστια σημασία της PCR υποδηλώνει το ευρύ φάσμα εφαρμογών (Βιοτεχνολογία, Βιοϊατρική, Βιολογικός έλεγχος περιβάλλοντος κ.α.), καθώς και οι απεριόριστες δυνατότητες εξελικτικών προσαρμογών της μεθόδου. Η ταχύτατη διεθνοποίηση του όρου PCR σε σχεδόν ισότιμο των όρων DNA και RNA είναι επίσης ενδεικτικής σημασίας της μεθόδου.

6.5. Μέθοδοι

6.5.1. Αλλοένζυμα

Ανακαλύφθηκε στις αρχές του 1970 και πρόκειται για την παλαιότερη μορφή μοριακών δεικτών. Πρόκειται για πρωτεΐνες που παράγονται από το DNA και μπορεί να ποικίλουν εξαιτίας του πολυμορφισμού που παρουσιάζεται στο θεμελιώδες DNA. Η μέθοδος αυτή έχει δυο βασικές δυσκολίες: (α) τη χρήση ενζύμων, τα οποία μπορούν να αναγνωριστούν μόνο από την κινητικότητά τους στο τελικό χημικό προϊόν, και (β) την εύρεση αρκετά πολυμορφικών αλλοενζύμων, ώστε να παρέχουν την απαιτούμενη ανάλυση. Τα αλλοένζυμα δεν βασίζονται στη χρήση PCR.

6.5.2 Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)

Η μέθοδος του τυχαίου ενισχυμένου πολυμορφικού DNA (RAPD) βασίζεται στην ανάπτυξη μοριακών δεικτών με τη χρήση τυχαίων εκκινητών, συνήθως δεκαμερών, σε αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με τη θερμοανθεκτική πολυμεράση Taq και ένα μόνο εκκινητή ανά αντίδραση. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA (ή τα αντιγραφόμενα τμήματα) δημιουργούνται μόνο στις περιοχές του γονιδιώματος που υβριδίζει ο εκκινητής με κατάλληλο προσανατολισμό σε μια απόσταση 300 έως 3000 βάσεις. Εν συντομία, τα μονόκλωνα μόρια του γονιδιωματικού DNA, μετά από αποδιάταξη, υβριδίζουν κατά προτίμηση με τον εκκινητή λόγω της αυξημένης συγκέντρωσής τους στο διάλυμα. Ακολούθως η θερμοανθεκτική πολυμεράση, πολυμερίζει με κατεύθυνση 5' → 3' όταν υπάρχει εκκινητής με ελεύθερο 3'-OH και μήτρα (μονόκλωνο DNA) (Allen & Bodowle 1994)

Ένας εκκινητής έχει μια καθορισμένη αλληλουχία αλλά η αλληλουχία αυτή είναι τυχαία. Έτσι, υπάρχει δυνητικά ένας απεριόριστος αριθμός εκκινητών RAPD με συγκεκριμένες αλληλουχίες. Το μικρό μέγεθος του εκκινητή (~10 bp) του δίνει τη δυνατότητα να υβριδίζει σε εκατοντάδες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα, όμως μόνο εκείνοι που υβριδίζουν σε δυο θέσεις στις αντίθετες αλυσίδες του DNA μέσα σε 300-3000 βάσεις έχουν ως αποτέλεσμα την παραγωγή και εμφάνιση ζωνών μετά από PCR (Wicker 1974). Ο κύκλος υβριδισμού, αποδιάταξης και πολυμερισμού επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση της συγκέντρωσης του μέρους αυτού του γονιδιώματος.

Τα προϊόντα ενίσχυσης πολυμερισμού διαχωρίζονται σε ηλεκτροφόρηση αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης και γίνονται ορατά με χρώση συνήθως βρωμιούχου αιθιδίου.

Ο πολυμορφισμός μεταξύ ατόμων, εκδηλώνεται με τις διαφορές του προτύπου των ζωνών και μπορεί να οφείλεται σε:

(1) αλλαγές βάσεων της θέσης υβριδισμού καθιστώντας τη μη αναγνωρίσιμη από τον εκκινητή,

(2) απάλειψη της θέσης υβριδισμού,

(3) προσθήκες ή ελλείψεις τμημάτων DNA που διαφοροποιούν το μέγεθος της αλληλουχίας που ενισχύεται με αποτέλεσμα να εμφανίζονται διαφορετικές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση.

Είναι δεδομένο ότι η μεθοδολογία απομόνωσης του DNA και οι συνθήκες κατά την αντίδραση της PCR παραμένουν σταθερές. Τα διαφορετικά αλληλόμορφα διαχωρίζονται από την παρουσία ή απουσία ενός προϊόντος (μιας ζώνης) ενός συγκεκριμένου μεγέθους με αποτέλεσμα να μπορούν να καταμετρηθούν πολλαπλές γενετικές θέσεις σε μια μόνο αντίδραση με την προϋπόθεση ότι τα προϊόντα του πολυμερισμού διαχωρίζονται σχετικά εύκολα, ως προς το μέγεθος, στην ηλεκτροφόρηση (Wicker 1974, Allen & Budowle 1994).

Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR είναι τέτοιες ώστε να μπορούν να εμφανιστούν μέχρι και 20 ζώνες. Η ικανότητα αυτή των RAPD να παράγουν πολλαπλές ζώνες χρησιμοποιώντας έναν εκκινητή έχει ως αποτέλεσμα την άμεση και ταχεία εξέταση και εκτίμηση πολλαπλών γενετικών τόπων με τη χρήση μόνο μερικών εκκινητών σε ανεξάρτητες αντιδράσεις PCR. Επιπρόσθετα, η μεθοδολογία RAPD είναι πολύ αποτελεσματική όχι μόνο ως προς τη σάρωση πληθυσμών και στην εύρεση ποικιλομορφίας της αλληλουχίας, αλλά επίσης και όταν αυτή χρησιμοποιείται για την εύρεση μοριακών δεικτών σε εξειδικευμένες περιοχές του γονιδιώματος χωρίς την ανάγκη λεπτομερούς χάρτη (Beebe & Rowe 2004). Η μεθοδολογία είναι απλή, δεν απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό, το κόστος δεν είναι ιδιαίτερα υψηλό και δεν είναι χρονοβόρα. Το τρωτό της σημείο είναι η μερική επαναληψιμότητα λόγω: α) της διαφορετικής μεθοδολογίας που χρησιμοποιείται κατά την απομόνωση του DNA, β) των διαφορετικών θερμοανθεκτικών DNA πολυμερασών που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR, και γ) λόγω των διαφορετικών συσκευών που χρησιμοποιούνται στις αντιδράσεις PCR.

Λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν τα RAPD ως μέθοδος μοριακής ανάλυσης, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε μελέτες γενετικής πληθυσμών αλλά και διαχωρισμού μεταξύ ειδών. Χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία 5 εκκινητές RAPD, για να διαχωρίσουν το είδος αφίδας *Sitobion avenae* (Fabricius) από το *Sitobion fragariae* (Walker) (Hemiptera: Aphididae)

καθώς και για μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας των ειδών αυτών (Figuera et al. 1999). Σε μια διαφορετική μελέτη που έγινε το 2000, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RAPD σε αφίδες προκειμένου να διαχωριστούν άτομα που ανήκουν στο σύμπλοκο *M. persicae* (*M. persicae nicotianae* και *M. persicae* s.str.) από τρία διαφορετικά είδη του γένους *Myzus* (*M. cerasi* (F.), *M. hemerocallis* Takahashi, και *M. varians* Davinson) (Clements et al. 2000). Ένα χρόνο αργότερα, από μια διαφορετική επιστημονική ομάδα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RAPD με σκοπό να εκτιμηθεί η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ πληθυσμών της αφίδας *M. persicae* (Zitoudi et al. 2001).

6.5.3. Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)

Η μεθοδολογία του πολυμορφισμού μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (RFLP) βασίζεται σε δυο τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρύτατα στη μοριακή βιολογία, στην πέψη του DNA από ένζυμα περιορισμού και στη μεταφορά του DNA σε φίλτρα τα οποία υβριδίζουν σε ένα σημασμένο τμήμα DNA κατά Southern (Wicker 1974, Χατζόπουλος 2001).

Πολυμορφισμός σημαίνει η ύπαρξη πολλών διαφορετικών μορφών στις οποίες μια περιοχή του DNA μπορεί να έχει διαφορετικά μήκη σε διαφορετικά ομόλογα ή άτομα. Όταν ένας συγκεκριμένος κλωνοποιημένος έλεγχος DNA χρησιμοποιείται για να αναλύσει ένα σημάδι του ανθρώπινου (ή άλλου) DNA, ένας περιορισμένος αριθμός τεμαχίων περιορισμού συγκεκριμένου και χαρακτηριστικού μήκους θα προσδιοριστεί. Επειδή οι μεταλλαγές βάσεων μπορούν είτε να δημιουργήσουν πρόσθετες περιοχές περιορισμού είτε να καταστρέψουν τις προϋπάρχουσες περιοχές, οι προετοιμασίες DNA από τα διαφορετικά άτομα εκθέτουν συχνά τα διαφορετικά πρότυπα της διανομής μεγέθους των τεμαχίων περιορισμού που υβριδίζονται με έναν ιδιαίτερο έλεγχο. Αυτές οι διαφορές καλούνται πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP`s).

6.5.4. Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)

Η τεχνολογία πολυμορφισμού μήκους ενισχυμένων τμημάτων AFLP παρέχει ένα νέο και αποτελεσματικό εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον εντοπισμό γενετικής ποικιλομορφίας και βιοποικιλομορφίας. Η μεθοδολογία AFLP βασίζεται στην επιλεκτική ενίσχυση μιας υποομάδας τμημάτων που έχουν παραχθεί μετά τη πέψη του γονιδιωματικού DNA με ένζυμα περιορισμού από ένα πολυσύνθετο σύνολο τμημάτων DNA του γονιδιώματος. Έτσι, οι πολυμορφισμοί ταυτοποιούνται με μεγάλη αποτελεσματικότητα λόγω των διαφορών που προκύπτουν στο μέγεθος των ενισχυμένων τμημάτων με ηλεκτροφόρηση σε πηχτή πολυακρυλαμίδης.

Η μεθοδολογία AFLP επιτρέπει την ταυτόχρονη ενίσχυση πολλών περιορισμένων τμημάτων DNA σε μια μόνο αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης. Συνοπτικά, το γονιδιωματικό DNA υφίσταται ταυτόχρονη διπλή πέψη με δυο ένζυμα περιορισμού εκ των οποίων το ένα αναγνωρίζει θέσεις 4 βάσεων (π.χ. MseI) και το άλλο θέσεις αναγνώρισης 6 βάσεων (π.χ. EcoRI). Τα άκρα των περιορισμένων τμημάτων συνδέονται με ειδικά σχεδιασμένους προσαρμοστές έτσι ώστε να είναι συμβατοί και να συνδέονται στις θέσεις αναγνώρισης των συγκεκριμένων ενζύμων περιορισμού. Καθώς οι θέσεις αναγνώρισης 4 βάσεων από τα περιοριστικά ένζυμα είναι πιο συχνές από αυτές των 6 βάσεων, η πλειονότητα των τμημάτων που θα παραχθούν θα προέρχεται μόνο μετά από την πέψη του ενζύμου που αναγνωρίζει 4 βάσεις. Μόνο ένας περιορισμένος αλλά ικανοποιητικός αριθμός τμημάτων θα έχουν στα άκρα τους και τις δυο διαφορετικές θέσεις. Αν και η ενίσχυση της μήτρας του DNA με εκκινητές ομόλογους με τους προσαρμοστές και αντίδραση PCR θα δημιουργήσει ένα διακριτό πρότυπο για μικρά γονιδιώματα (π.χ βακτήρια), για μεγαλύτερα γονιδιώματα το πρότυπο των ζωνών είναι αρκετά πολύπλοκο (ο αριθμός των ζωνών που θα παραχθούν θα είναι ιδιαίτερα μεγάλος) που δεν επιτρέπει το διαχωρισμό τους σε μια πηχτή πολυακρυλαμίδης (Ansoerge et al. 1997, Χατζόπουλος 2001, Beebee & Rowe 2004).

Για το λόγο αυτό, μια επιπρόσθετη επιλογή ενίσχυσης μιας υποομάδας τμημάτων DNA επιτρέπει την ελάττωση της πολυπλοκότητας του προτύπου

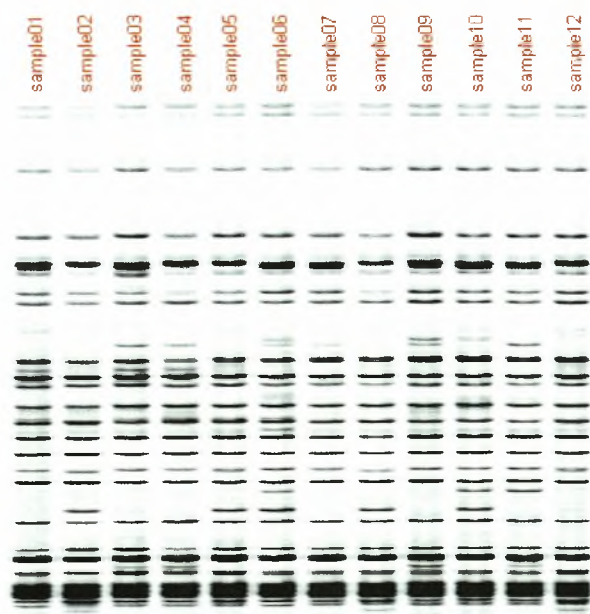
των ζωνών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών PCR που έχουν μια αλληλουχία ομόλογη με τον προσαρμοστή και επιπλέον «επιλεκτικά νουκλεοτίδια» που προστίθενται στο 3' άκρο των εκκινητών. Τα «επιλεκτικά νουκλεοτίδια» στο 3' άκρο επιτρέπουν στους εκκινητές να «εκκινήσουν» το πολυμερισμό μόνο στα τμήματα του DNA που υπάρχει τέλεια ομολογία. Οι ζώνες που ενισχύονται μπορούν να παρατηρηθούν με ραδιενεργά νουκλεοτίδια κατά τον πολυμερισμό (dATP- $\alpha^{32}\text{P}$) ή με ειδικά χρωμοφόρα φθορισμού στις βάσεις ή στους εκκινητές και ανάλυση με ακτίνες laser (Wicker 1974, Χατζόπουλος 2001). Ο αριθμός των «επιλεκτικών νουκλεοτιδίων» που χρησιμοποιούνται στο 3' άκρο των εκκινητών στην ουσία μπορεί να ελέγχει και να περιορίσει τον αριθμό των τμημάτων του DNA που ενισχύονται έτσι ώστε να παρέχεται ένα πρότυπο ζωνών που να δύναται να αναλυθεί.

Ο πολυμορφισμός των μοριακών δεικτών με τη μέθοδο AFLP εντοπίζεται από την παρουσία ή απουσία κάποιας ζώνης που οφείλεται: (α) στις διαφορές των θέσεων αναγνώρισης από τα ένζυμα περιορισμού (όπως στις περιπτώσεις RFLP), (β) στις αλλαγές των βάσεων μέσω μεταλλάξεων κοντά στις θέσεις αναγνώρισης (υβριδισμού εκκινητών) και διάκρισης λόγω των «επιλεκτικών νουκλεοτιδίων» και (γ) στις ενθέσεις ή ελλείψεις μέσα στα τμήματα που ενισχύονται. Γενικά οι μοριακοί δείκτες που παράγονται με AFLP είναι πολύ περισσότεροι από αυτούς που δημιουργούνται σε μια αντίδραση RAPD-PCR (Sunnucks 2000). Σε γενικές γραμμές το επίπεδο πολυμορφισμού που ανιχνεύεται με τη μέθοδο AFLP είναι χαμηλότερο από άλλες τεχνικές χαρτογράφησης όπως RFLP και μικροδορυφορικό DNA. Όμως, η ικανότητα ανάλυσης ταυτόχρονα μεγάλου αριθμού πολυμορφικών τόπων, «η αποδοτική πολλαπλή αναλογία», δηλαδή ο αριθμός των πολυμορφικών τόπων που αναλύονται ανά πείραμα με ένα μόνο συνδυασμό εκκινητών σε μια ηλεκτροφόρηση, επιβεβαιώνει την υψηλή και διαφωτιστική αξία της τεχνικής όταν συγκρίνεται με άλλες μεθόδους χαρτογράφησης. Οι μοριακοί δείκτες AFLP είναι κυρίαρχοι. Παρόλα αυτά η διάκριση των ετεροζυγωτών ατόμων όπως και στη περίπτωση RAPD είναι δυνατή με τη σύγκριση της έντασης της ζώνης (Χατζόπουλος 2001, Beebe & Rowe 2004).

Τα αποτελέσματα της μεθόδου είναι επαναλήψιμα, όμως ολόκληρη η διαδικασία είναι σχετικά δύσκολη, τουλάχιστον στην αρχή και γενικά το κόστος

υψηλό. Μια άλλη πρακτική εφαρμογή της μεθόδου AFLP, όπως και στις προηγούμενες μεθοδολογίες είναι η γενετική χαρτογράφηση. Το πρότυπο ζωνών που προκύπτει με τη μέθοδο AFLP είναι παραπλήσιο με αυτό που προκύπτει με τη μεθοδολογία RAPD. Η διαφορά έγκειται στον αριθμό των πολυμορφικών ζωνών που ανιχνεύονται ανά άτομο λόγω της μεθοδολογίας και της πολύ καλής διακριτικής ικανότητας της πηκτής της πολυακρυλαμίδης (Allen & Budowle 1994, Ansorge et al. 1997).

Τα ενισχυμένα προϊόντα όλων των παραπάνω μεθοδολογιών, διαβάζονται όπως ήδη είπαμε ως ζώνες διαφορετικού μεγέθους, σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (Εικόνα 3). Πρόκειται για ζώνες που προέκυψαν μετά από επεξεργασία με τη μέθοδο AFLP αλλά και οι υπόλοιπες μεθοδολογίες παρουσιάζουν παρόμοια μοτίβα.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Εμφάνιση ενισχυμένων τμημάτων με τη μέθοδο AFLP, σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

(<http://images.google.gr/images?q=AFLP&hl=el&btnG>)

6.5.5 Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (Simple Sequence Repeats SSR) και απλές σε σειρά επαναλήψεις (Short Tandem Repeats, STR)

Όλες αυτές οι μεθοδολογίες αναφέρονται σε μικρές συνεχείς επαναλήψεις απλών αλληλουχιών 2, 3, ή 4 νουκλεοτιδίων. Τέτοιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό σε πολλά γονιδιώματα και συχνά έχουν αρκετά ευδιάκριτη αλληλομορφία ανά τόπο και επίσης υψηλή συχνότητα ετεροζυγωτίας στους διάφορους πληθυσμούς. Έτσι, μοριακοί δείκτες που προέρχονται από αυτές τις μεθοδολογίες είναι αρκετά χρήσιμοι. Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται με την ενίσχυση γνωστών γενετικών τόπων με συγκεκριμένους εκκινητές συμπληρωματικούς των αλληλουχιών εκατέρωθεν των άκρων τους. Εμφανίζονται σαν ζώνες ηλεκτροφόρησης με διαφορετικό μέγεθος που οφείλεται στις διαφορές των επαναλαμβανόμενων απλών αλληλουχιών και χαρακτηρίζονται από συγκυριαρχία. Το πλεονέκτημα αυτό επιτρέπει την εύκολη διάκριση των ετεροζύγωτων ατόμων. Η ταυτοποίηση κατάλληλων γενετικών τόπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες με τις μεθοδολογίες αυτές, απαιτεί εξειδικευμένες διαδικασίες κλωνοποίησης συγκεκριμένων τμημάτων DNA και προσδιορισμό της αλληλουχίας εκατέρωθεν των άκρων ώστε να σχεδιαστούν κατάλληλοι εκκινητές. Αυτό είναι ένα σοβαρό μειονέκτημα γιατί: (α) έχει αυξημένο κόστος, (β) απαιτεί σχετικά σημαντικό χρόνο και (γ) απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό (Wicker 1974, Ansorge et al. 1997, Χατζόπουλος 2001, Beebee & Rowe 2004).

6.5.6 Κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως δείκτες (STS, EST, SSCP, SNP, ASOH, DASH)

Άλλα συστήματα μοριακών δεικτών που βασίζονται σε κλωνοποιημένους γενετικούς τόπους είναι οι **θέσεις επισήμανσης αλληλουχίας (STS)**. Είναι

ένας γενικός όρος για γενετικούς τόπους που ταυτοποιούνται βάσει της αλληλουχίας τους και ο πολυμορφισμός ανιχνεύεται με PCR. Μια άλλη προσέγγιση είναι η **επισήμανση εκφραζόμενων αλληλουχιών (EST)**. Οι δεύτεροι είναι ένα υποσύνολο των πρώτων και προέρχονται από κλώνους cDNA. Οι μοριακοί αυτοί δείκτες χρησιμοποιούνται στο πρόγραμμα του ανθρώπινου γονιδιώματος με ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη φυσική του χαρτογράφηση. Η αντίδραση PCR εκτελείται με δυο μοναδικούς εκκινητές συμπληρωματικούς εκατέρωθεν των κλωνοποιημένων άκρων. Ανάλογη προσέγγιση γίνεται και στη χαρτογράφηση γενετικών τόπων αντίστοιχων στα cDNA των οποίων έχει προσδιοριστεί η αλληλουχία των άκρων (5' και 3') (Wicker 1974, Sunnucks 2000, Χατζόπουλος 2001).

Οι μοριακοί δείκτες που προκύπτουν είναι συγκυρίαρχοι. Αύξηση πολυμορφισμού επιτυγχάνεται με τη χρήση ενζύμων περιορισμού. Το πρόβλημα της χρήσης κάποιου ενζύμου περιορισμού στην αναζήτηση πολυμορφισμού οφείλεται στη δειγματοληψία ενός μικρού μέρους της δυνητικά ποικιλόμορφης αλληλουχίας, επειδή η πέψη βασίζεται μόνο στη παρουσία ή απουσία μιας τετρα- έως οκτα- νουκλεοτιδικής αλληλουχίας που αναγνωρίζεται από το συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού. Μια εναλλακτική προσέγγιση του εντοπισμού ποικιλομορφίας της αλληλουχίας των ενισχυμένων τμημάτων DNA, πέρα από την αλληλούχιση, είναι ο **πολυμορφισμός μονόκλωνης διαμόρφωσης (SSCP)**. Η μεθοδολογία αυτή εκμεταλλεύεται την τάση του μονόκλωνου DNA να σχηματίζει ενδομοριακά ζεύγη βάσεων και προκύπτει μια συγκεκριμένη διαμόρφωση που εξαρτάται από την αλληλουχία. Αλλαγές της αλληλουχίας των βάσεων του DNA μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στη διαμόρφωση των μονόκλωνων μορίων DNA με αποτέλεσμα να υπάρχουν αλλαγές στη μετακίνηση των μορίων κατά την ηλεκτροφόρηση και έτσι να εντοπιστεί ο πολυμορφισμός (Wicker 1974, Alen & Budowle 1994, Sunnucks 2000).

Ο **πολυμορφισμός ενός νουκλεοτιδίου (SNP)** μπορεί να ταυτοποιηθεί με την αλληλούχιση γονιδίου από διαφορετικά άτομα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοριακός δείκτης. Όμως η αλληλούχιση γονιδίου από διαφορετικά άτομα είναι μια πολύ δαπανηρή διαδικασία. Σύγχρονες τεχνικές, όπως ο **υβριδισμός ολιγονουκλεοτιδίου εξειδικευμένου αλληλομόρφου (ASOH)** είναι περιορισμένες λόγω της αναποτελεσματικότητας των συνθηκών

διάκρισης. Όμως η τεχνική ASOH σε συνδυασμό με άλλες μεθοδολογίες μπορεί να διακρίνει σχετικά εύκολα πολυμορφισμούς ενός νουκλεοτιδίου παρόλο που είναι χρονοβόρα και δαπανηρή. Μια άλλη τεχνική που μπορεί να διακρίνει και να καταγράψει SNP είναι η μέθοδος του δυναμικού υβριδισμού εξειδικευμένου αλληλομόρφου (DASH). Κατά τη μεθοδολογία αυτή η αλληλουχία στόχος ενισχύεται με PCR και η μια από τις δυο αλυσίδες ακινητοποιείται πάνω σε στρεπταβιδίνη. Ένα ολιγονουκλεοτίδιο χρησιμοποιείται σαν ανιχνευτής ειδικός για τον ένα αλληλόμορφο και υβριδίζει σε χαμηλή θερμοκρασία. Η δίκλωνη περιοχή του DNA αντιδρά με ένα παρεμβαλλόμενο δείκτη χρώματος ειδικού για δίκλωνη αλυσίδα. Μετά από διέγερση ο δείκτης εκπέμπει φθορισμό ανάλογο της δίκλωνης έλικας (ανιχνευτής-στόχος) του DNA. Η απότομη ελάττωση του φθορισμού λόγω της αύξησης θερμοκρασίας (μετουσίωση της δίκλωνης περιοχής ανιχνευτή-στόχου) μπορεί να εκτιμάται συνεχώς έτσι ώστε ακόμη και όταν υπάρχει μη τέλεια συμπληρωματικότητα σε μια βάση να εκτιμηθεί ανάμεσα σε ανιχνευτή και στόχο (Beridze 1986, Χατζόπουλος 2001, Beebeee & Rowe 2004).

6.6 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα μεθόδων

Όλες οι μεθοδολογίες που βασίζονται σε PCR απαιτούν μικρή ποσότητα DNA. Από όλες τις μεθοδολογίες η RAPD είναι η πιο απλή, διότι δεν απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό, το κόστος είναι χαμηλό, έχει μια καλή «αποδοτική πολλαπλή αναλογία», δεν απαιτεί πολύ χρόνο και εργασία, αλλά έχει όμως μερική επαναληψιμότητα. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να ξεπεραστεί με τη χρήση μεγαλύτερου αριθμού εκκινήτων. Οι άλλες μεθοδολογίες (RFLP, AFLP, κ.α) είναι χρονοβόρες, απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό και πολύ εργασία αλλά έχουν υψηλή επαναληψιμότητα. Κάθε μεθοδολογία, έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η αξιολόγηση της πιθανής χρησιμότητας της κάθε μιας (Beridze 1986, Χατζόπουλος 2001, Beebeee & Rowe 2004).

7. RFLP (Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών τμημάτων DNA).

7.1. Εισαγωγή

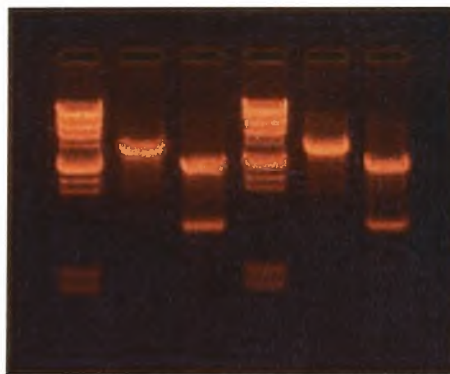
Τα τελευταία χρόνια οι μοριακές προσεγγίσεις έχουν γίνει απαραίτητες σε μελέτες της βιολογίας των ζωικών και φυτικών πληθυσμών. Οι μοριακοί γενετικοί δείκτες έχουν αποδειχθεί πολύτιμα εργαλεία στη μελέτη γενετικών σχέσεων και γενετικής ποικιλομορφίας καθώς και στη διαλεύκανση δύσκολων ταξινομικών προβλημάτων.

Μια μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως για τις ανάγκες της πληθυσμιακής γενετικής, βασίζεται στη χρήση δεικτών RFLP (Random Fragment Length Polymorphism- Πολυμορφισμός Μεγέθους Περιοριστικών Τμημάτων). Η μέθοδος αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη δημιουργία των γενετικών χαρτών των χρωμοσωμάτων και στηρίζεται στην υβριδοποίηση ενός ομολόγου τμήματος DNA μέσα σε ένα γονιδίωμα. Πολυμορφισμός σημαίνει η ύπαρξη πολλών διαφορετικών μορφών στις οποίες μια περιοχή του DNA μπορεί να έχει διαφορετικά μήκη σε διαφορετικά ομόλογα ή άτομα. Όταν ένας συγκεκριμένος κλωνοποιημένος έλεγχος DNA χρησιμοποιείται για να αναλύσει ένα σημάδι του ανθρώπινου (ή άλλου) DNA, ένας περιορισμένος αριθμός τεμαχίων περιορισμού συγκεκριμένου και χαρακτηριστικού μήκους θα προσδιοριστεί. Επειδή οι μεταλλαγές βάσεων μπορούν είτε να δημιουργήσουν πρόσθετες περιοχές περιορισμού είτε να καταστρέψουν τις προϋπάρχουσες περιοχές, οι προετοιμασίες DNA από τα διαφορετικά άτομα εκθέτουν συχνά τα διαφορετικά πρότυπα της διανομής μεγέθους των τεμαχίων περιορισμού που υβριδίζονται με έναν ιδιαίτερο έλεγχο. Αυτές οι διαφορές καλούνται πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων (RFLP's).

7.2. Χρήση μεθόδου RFLP

Πολυμορφισμός παρατηρείται σε ένα πρότυπο περιορισμένων τμημάτων DNA όταν συμβεί κάποια μετάλλαξη, έλλειψη ή προσθήκη βάσης

στη συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού. Επίσης πολυμορφισμός μπορεί να συμβεί και από τη δημιουργία ή εξάλειψη μιας νέας θέσης αναγνώρισης από ένθεση ή απαλοιφή περιοχών DNA. Όλες αυτές οι περιπτώσεις οδηγούν σε αλλαγές του μεγέθους του τμήματος του DNA μετά από τη δράση του ενζύμου περιορισμού. Όταν γονιδιωματικό DNA κόβεται με ένα ένζυμο περιορισμού το πρότυπο τμημάτων στην πηκτική αгарόζης δεν είναι διακριτό αλλά διάχυτο, οπότε χρησιμοποιείται η μέθοδος του υβριδισμού με ραδιενεργά σημασμένο ή χημικά τροποποιημένο ανιχνευτή ώστε να εμφανιστεί το πρότυπο των πολυμορφικών ζωνών (Wicker 1974, Allen & Bodowle 1994, Beebee & Rowe 2004). Στην ηλεκτροφόρηση πηκτωμάτων, τα ενισχυμένα δείγματα DNA φορτώνονται σε ένα πήκτωμα αгарόζης όπου ένα ηλεκτρικό ρεύμα περνά μέσα από αυτό. Καθώς το DNA χρεώνεται αρνητικά, θα μεταναστεύσει πέρα από το πήκτωμα προς το θετικά χρεωμένο τέλος σύμφωνα με το διαφορετικό μέγεθος των τεμαχίων. Το DNA έτσι θα χωριστεί σε μεμονωμένες ζώνες, με το κάθε ένα τμήμα να φαίνεται σταδιακά ξεκινώντας από αυτό που έχει το μικρότερο μέγεθος. Οι ζώνες DNA που έχουν ενσωματωθεί με το βρωμιούχο αιθίδιο μπορούν να απεικονιστούν κάτω από ένα υπεριώδες (UV) φωτιστικό (Εικόνα 4).



ΕΙΚΟΝΑ 4: Τμήμα DNA σε πήκτωμα αгарόζης κάτω από υπεριώδη ακτινοβολία.

Οι δείκτες RFLP χρησιμοποιούνται επίσης για την ταυτοποίηση περιοχών του γονιδιώματος καθώς και στην εκτίμηση της ποικιλομορφίας σε τράπεζες γενετικού υλικού. Γενικά πρόκειται για μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο με υψηλή επαναληψιμότητα. Δεν παύει όμως να έχει κάποια μειονεκτήματα όπως το ότι πρόκειται για μια χρονοβόρο διαδικασία, έχει υψηλό κόστος ανάλυσης και ορισμένες φορές για καλύτερα αποτελέσματα χρησιμοποιείται ραδιενέργεια (Χατζόπουλος, 2001). Το 1999

χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP για την ανάλυση μιτοχονδριακού DNA και πλασμιδίων συμβιωτικών βακτηρίων του είδους *Buchnera*, προκειμένου να μελετηθεί η γενετική παραλλακτικότητα της αφίδας *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae). Μέσω αυτής της μεθόδου διαπιστώθηκε ότι η διαφοροποίηση βιοτύπων της συγκεκριμένης αφίδας έχει γίνει εδώ και 100.000 χρόνια (Birkle et al. 1999). Με τη χρήση της μεθόδου RFLP μπορεί επίσης να γίνει αναγνώριση μεταλλάξεων ή άλλων λειτουργιών του γενώματος όπως π.χ. έγινε από τους Cassanelli et al. (2005) όπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP για τη διάγνωση μηχανισμών ανθεκτικότητας στην αφίδα *M. persicae*.

7.3. Χρήση PCR-RFLP

Η μεθοδολογία PCR-RFLP συνδυάζει και τις δυο τεχνικές (RFLP και PCR) ώστε να είναι αποτελεσματική σε περιπτώσεις μικρών ποσοτικά δειγμάτων DNA και να έχει την ικανότητα να διακρίνει μεταξύ γενοτύπων ανάλογα με την παρουσία ή απουσία μιας θέσης αναγνώρισης ενός ενζύμου περιορισμού. Εκκινητές με συντηρητική αλληλουχία χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA (Sunhucks 2000). Ακολούθως, το ενισχυμένο τμήμα πέπτεται με ένζυμο περιορισμού (συνήθως αυτά που αναγνωρίζουν θέσεις 4 βάσεων). Η πρακτική αυτή αυξάνει την πιθανότητα εύρεσης κάποιου πολυμορφισμού μέσα σε ένα συγκεκριμένο τμήμα DNA. Η μεθοδολογία αυτή ονομάζεται πολυμορφισμός κομμένων ενισχυμένων αλληλουχιών (CAPS) (Wicker 1974, Beebe & Rowe 2004).

7.4 Η χρήση των RFLP μαρτύρων (restriction fragment length polymorphism – πολυμορφισμός του μεγέθους των θραυσμάτων περιορισμού) στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος.

Για τη χαρτογράφηση ενός μεγάλου γονιδιώματος υπάρχουν δύο τρόποι : ο φυσικός και ο γενετικός.

Ο φυσικός χάρτης (physical map) βασίζεται στην απευθείας ανάλυση των DNA μορίων κάθε χρωμοσώματος ξεχωριστά, και περιλαμβάνει τους χάρτες περιορισμού και τις βιβλιοθήκες των γενομικών DNA κλώνων. Επιπλέον ένας φυσικός χάρτης περιλαμβάνει την πλήρη νουκλεοτιδική αλληλουχία του γονιδιώματος.

Αντίθετα οι γενετικοί χάρτες δεσμών (genetic linkage maps) βασίζονται στη συχνότητα κληρονομικότητας δύο ή περισσότερων χαρακτηριστικών του οργανισμού τα οποία χρησιμεύουν ως γενετικοί μάρτυρες στη διασταύρωση των ειδών. Ως γενετικός μάρτυρας χαρακτηρίζεται κάθε περιοχή του DNA στην οποία υπάρχει ποικιλία στην νουκλεοτιδική αλληλουχία. Αυτή η ποικιλία πρέπει να είναι ανιχνεύσιμη ως διαφορά μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού. Αν η διαφορά αυτή είναι σπάνια χαρακτηρίζεται ως μετάλλαξη, ενώ αν είναι συνηθισμένη τότε χαρακτηρίζεται ως πολυμορφισμός. Οι γενετικοί χάρτες σχεδιάζονται βάση του μοτίβου της κληρονομικότητας τέτοιων παραλλαγών.

Παραδοσιακά η γενετική χαρτογράφηση βασιζόταν στην ταυτοποίηση μεταλλάξεων ανάλογα με την επίδραση που είχαν σε κάποιο χαρακτηριστικό του οργανισμού, όπως το χρώμα των ματιών ή την ομάδα του αίματος. Τελευταία όμως, με τη χρήση μεθόδων ανασυνδυασμένου DNA, είναι δυνατή η χρησιμοποίηση μικρών DNA αλληλουχιών ως γενετικών μαρτύρων, οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ φυσιολογικών ατόμων, χωρίς όμως να έχουν επίδραση στον οργανισμό. Ένας ευρέως χρήσεως γενετικός μάρτυρας αυτού του τύπου εξαρτάται από τον τρόπο που μικρές διαφορές στην DNA αλληλουχία μπορούν να μεταβάλλουν τις θέσεις περιορισμού στις οποίες θα έκοβε μία συγκεκριμένη ενδονουκλεάση περιορισμού. Για παράδειγμα,

διαφορά μίας βάσης σε μία συγκεκριμένη χρωμοσωμική θέση μπορεί να εξαλείψει μία θέση περιορισμού προκαλώντας μεγάλες διαφορές στο μέγεθος των προκαθορισμένων θραυσμάτων περιορισμού, που θα δημιουργούνταν από το DNA αυτής της θέσης. Παρόμοια διαγραφές ή εισαγωγές μικρών θραυσμάτων DNA θα άλλαζαν το μέγεθος των θραυσμάτων περιορισμού. Τέτοιες διαφορές μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους είναι γνωστές ως **RFLPs – restriction fragment length polymorphisms – πολυμορφισμός του μεγέθους των θραυσμάτων περιορισμού**. Ένας πολυμορφισμός αυτού του τύπου είναι πολύ χρήσιμος όταν είναι αρκετά συνηθισμένος σε έναν πληθυσμό, έτσι ώστε να υπάρχει μεγάλη πιθανότητα οι γονείς ενός ατόμου να έχουν ευδιάκριτους μάρτυρες. Για αυτό το λόγο, μικρές επαναλαμβανόμενες διαταγμένες στη σειρά αλληλουχίες (VNTR – variable number of tandem repeat), στις οποίες το ακριβές μέγεθος ποικίλει σε έναν πληθυσμό, είναι η βάση για τους πιο χρήσιμους RFLP μάρτυρες. Οι RFLP μάρτυρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη χαρτογράφηση του γονιδιώματος επειδή οι διαφορές μεγέθους των θραυσμάτων, που ένα άτομο κληρονομεί, είναι εύκολα ανιχνεύσιμες με την μέθοδο υβριδισμού κατά Southern (Southern blot), με έναν DNA μάρτυρα (επισημασμένο ραδιενεργά ή χημικά) συμπληρωματικό με τη συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA σε αυτή τη θέση. Η χρήση των RFLPs εξασφαλίζει έναν άμεσο τρόπο για τη συσχέτιση ενός γενετικού χάρτη με έναν φυσικό : πρώτον, χρησιμεύουν ως κληρονομικοί γενετικοί μάρτυρες, όπως το χρώμα των ματιών και δεύτερον, οι DNA μάρτυρες που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευσή τους αντιπροσωπεύουν DNA αλληλουχίες η θέση των οποίων σε ένα φυσικό χάρτη μπορεί εύκολα να βρεθεί με υβριδισμό.

8. Μιτοχονδριακό DNA

8.1. Εισαγωγή

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταροπλασματικά οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων τα οποία έχουν το δικό τους DNA, το μιτοχονδριακό (mt) DNA. Το mtDNA είναι απλοειδές, δίκλωνο, κυκλικό μόριο. Έχει σχετικά μικρό μέγεθος και μπορεί εύκολα να απομονωθεί. Συγκεκριμένα, το μέγεθος του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των ζώων κυμαίνεται από 14000 ζεύγη βάσεων (14kb) (στον νηματώδη, *Caenorhabditis elegans*), έως 42000 ζεύγη βάσεων (42kb) (στο χτένι, *Placopecten megallanicus*), ενώ στα περισσότερα ζώα είναι γύρω στις 16-20 kb. Στο έντομο *Drosophila yakuba* έχει βρεθεί η πλήρης αλληλουχία των 16,019 ζευγών βάσεων του μιτοχονδριακού DNA (Wolstenholme, 1992).

Η απομόνωση του mtDNA των 16-20 kb από τα δισεκατομμύρια άλλα νουκλεοτίδια του γονιδιώματος είναι σχετικά εύκολη λόγω φυσικού διαχωρισμού του. Το mtDNA δεν ανασυνδυάζεται και μεταβιβάζεται σχεδόν αποκλειστικά μέσω της μητέρας. Παρουσιάζει ταχύτερο αριθμό αλλαγών σε σχέση με το πυρηνικό DNA στην αλληλουχία των βάσεών του. Έτσι, μπορούν να εντοπιστούν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών ακόμη και στις περιπτώσεις όπου οι πληθυσμοί είναι στο ίδιο επίπεδο του πυρηνικού DNA (Avisé *et al.*, 1987).

Το ζωικό mtDNA παρουσιάζει μια σαφή συντηρητικότητα ως προς τα γονίδια που περιέχει. Πράγματι, το mtDNA των σπονδυλωτών, εχινόδερμων και εντόμων περιλαμβάνει 13 γονίδια που μεταφράζονται σε πολυπεπτιδικές αλυσίδες, 2 γονίδια για ριβοσωμικά RNA (12s και 16s rRNA) και 22 γονίδια για μεταφορικά RNA (tRNA). Επίσης υπάρχει μια περιοχή που δεν κωδικοποιεί, αλλά περιέχει τις αρχικές θέσεις για αντιγραφή του mtDNA και την μεταγραφή του σε RNA, γνωστή ως περιοχή ελέγχου ή βρόγχος D (D-loop). Τα μιτοχονδριακά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες καθορίζουν υπομονάδες ενζύμων που εμπλέκονται στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα (Εικόνα 5). Αυτά είναι: οι 7 υπομονάδες αφυδρογονάσης του NADH (ND 1, 2, 3, 4, 4L, 5, 6), μια υπομονάδα του

κυτοχρώματος b, τρεις υπομονάδες της οξειδάσης του κυτοχρώματος c (COI, COII, COIII) και δυο υπομονάδες της μιτοχονδριακής συνθετάσης του ATP (ΑΤάση 6, 8). Για τη λειτουργία των βιοχημικών αντιδράσεων των μιτοχονδρίων χρειάζονται περισσότερα ένζυμα, από το μεγαλύτερο μέρος των οποίων ελέγχεται από το πυρηνικό DNA, συντίθεται στο κυτταρόπλασμα και εισάγεται στα μιτοχόνδρια. Προφανώς το εξαρτώμενο από τον πυρήνα μιτοχονδριακό γονιδίωμα είναι αποτέλεσμα της προοδευτικής μεταφοράς του γενετικού ελέγχου στον πυρήνα από ένα προηγούμενο πιο σύνθετο και μεγαλύτερο μιτοχονδριακό γονιδίωμα (Wolstenholme, 1992).

Η απουσία ενδονίων, ψευδογονιδίων, επαναλαμβανόμενου DNA και μεγάλων ακολουθιών, οι οποίες παρεμβάλλονται μεταξύ των γονιδίων του, καθιστούν το mtDNA παράδειγμα γενετικής οικονομίας στη φύση. Εξάλλου, οι περισσότερες από τις γενετικές αλλαγές που παρατηρούνται είναι απλές αντικαταστάσεις βάσεων, μικρές προσθήκες ή ελλείμματα ενός ή λίγων νουκλεοτιδίων, ενώ λιγότερες αφορούν σε μεγάλες αλλαγές (μέχρι αρκετές εκατοντάδες νουκλεοτίδια) στο μήκος του μορίου. Οι περισσότερες διαφορές μήκους περιορίζονται στην περιοχή ελέγχου του μορίου (Roehrhantz & Degrugillier, 1998).

Στα σπονδυλωτά, οι αλυσίδες mtDNA, γνωστές ως L (light- ελαφριά), και H (heavy-βαριά), παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο G+T. Με λίγες εξαιρέσεις, όλα τα γονίδια στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα των σπονδυλωτών κωδικοποιούνται από την αλυσίδα H. Έτσι από τα 37 γονίδια στο mtDNA των σπονδυλωτών μόνο ο τύπος tRNA και το γονίδιο ND6 κωδικοποιούνται από την αλυσίδα L (Avisé *et al.*, 1987).

Όμως, ενώ στα σπονδυλωτά λιγότερο από το 10% του ολικού αριθμού των βάσεων που κωδικοποιούν στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα βρίσκονται στην αλυσίδα L, στη *Drosophila* (Meyer, 1993), το 50% περίπου βρίσκεται σε αυτή.

Η διάταξη των γονιδίων στο ζωικό mtDNA, είναι εξαιρετικά σταθερή, τουλάχιστον μέσα σε μια ταξινομική τάξη ή φύλλο. Ωστόσο, μπορεί να υπάρξει ποικιλότητα στη σειρά των γονιδίων του mtDNA, ακόμα και μέσα στο ίδιο φύλλο (Wilson *et al.*, 1985).

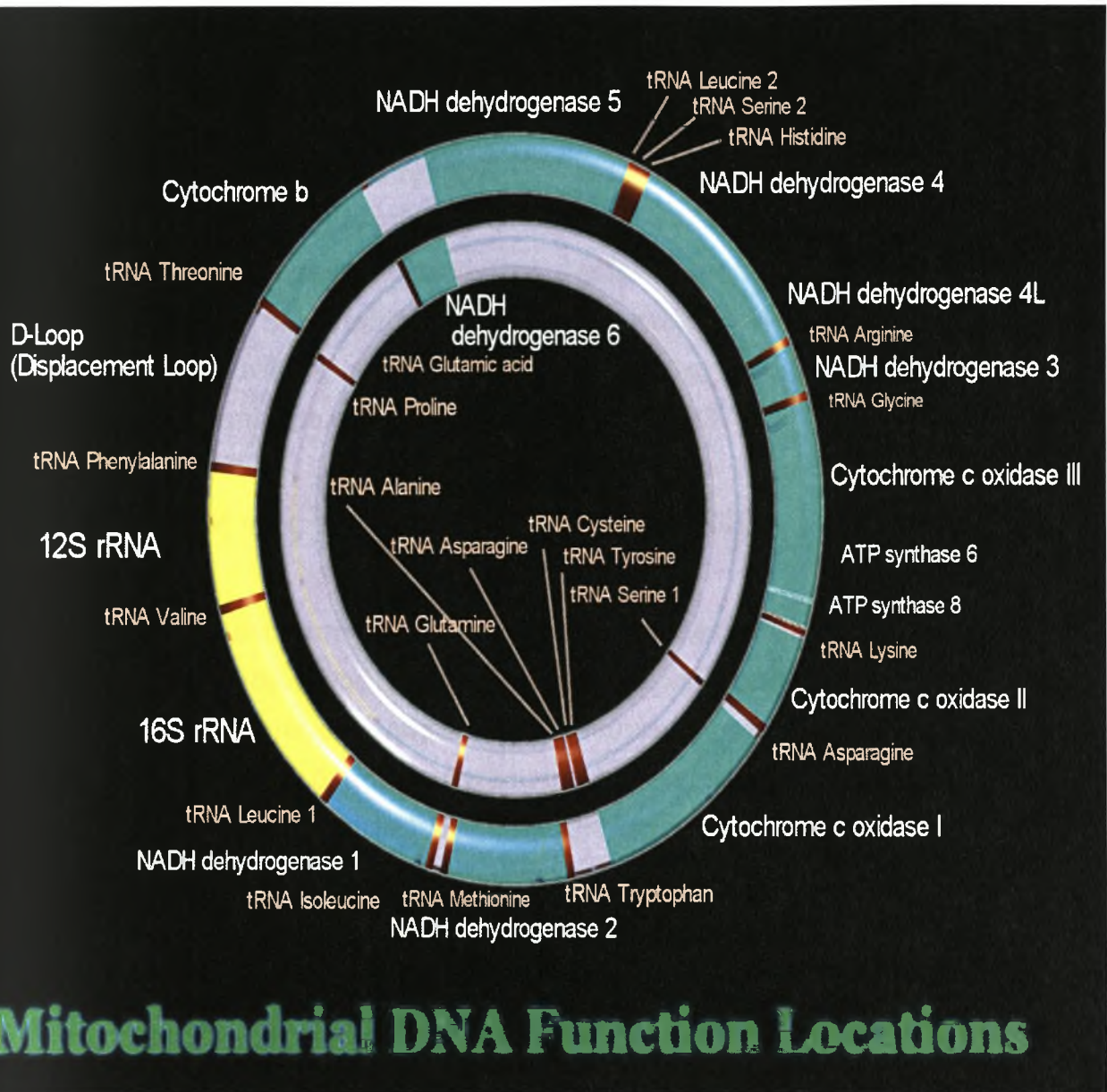
Τα περισσότερα σωματικά κύτταρα και τα ώριμα ωοκύτταρα, περιέχουν εκατοντάδες ή χιλιάδες μόρια mtDNA. Έτσι, μια καινούρια μετάλλαξη θα δημιουργήσει μια κατάσταση ετεροπλασμίας, κατά την οποία δύο ή

περισσότεροι γενότυποι θα συνυπάρχουν στο ίδιο άτομο. Στην πράξη κάθε μιτοχόνδριο περιέχει μόνο έναν τύπο mtDNA (ομοπλασμία). Περιπτώσεις ετεροπλασμίας έχουν διαπιστωθεί σε διάφορες ομάδες οργανισμών, αλλά είναι σπάνιες και έτσι έχουν μικρή σημασία σε μελέτες του ζωικού mtDNA (Awise *et al.*, 1987).

Ο μιτοχονδριακός γενετικός κώδικας είναι εκφυλισμένος και λιγότερος αυστηρός από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα. Ο μιτοχονδριακός κώδικας διαφέρει από τον παγκόσμιο γενετικό κώδικα στα εξής σημεία:

- Το UGA κωδικοποιεί για τρυπτοφάνη και δεν αποτελεί σημείο τερματισμού.
- Το CUA κωδικοποιεί για θρεονίνη αντί για λευκίνη.
- Το AUA κωδικοποιεί για μεθειονίνη αντί για ισολευκίνη.

Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι τα μεταλλαγμένα κωδικόνια αντιπροσωπεύουν εξελικτικά ατυχήματα, τα οποία όμως διατηρήθηκαν διότι συνθέτουν ελάχιστες πρωτεΐνες και είναι συνεπώς αβλαβή για τον οργανισμό. Η αντιγραφή του mtDNA βρίσκεται κάτω από τον έλεγχο του πυρήνα, αφού τα χρησιμοποιούμενα ένζυμα, εισάγονται στο μιτοχόνδριο από το κυτταρόπλασμα. Στα ζωικά κύτταρα η κληρονομική μεταβίβαση του mtDNA γίνεται μητρικά καθώς το ωάριο προσφέρει πάντα όλο το κυτταρόπλασμα για το σχηματισμό του ζυγωτού (Griffiths *et al.*, 2002).



Εικόνα 5: Η διάταξη των γονιδίων στο μιτοχόνδριο των εντόμων.
<http://images.google.gr/images?svnum=10&hl=el&lr=&q=MITOCHONDRIAL+DNA+>

Ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA ποικίλει ανάμεσα στις διάφορες ομάδες οργανισμών. Στα θηλαστικά εξελίσσεται 5 με 10 φορές ταχύτερα από το πυρηνικό DNA, ίσως επειδή η DNA πολυμεράση, που αντιγράφει το mtDNA, στερείται της ικανότητας εντοπισμού και διόρθωσης λαθών, ικανότητα που διαθέτουν οι πολυμεράσες που αντιγράφουν το πυρηνικό γονιδίωμα (Brown, 1993). Για παράδειγμα, ο ρυθμός εξέλιξης του mtDNA εκτιμάται ότι είναι 2% νουκλεοτιδική απόκλιση ανά ένα εκατομμύριο χρόνια. Ο ρυθμός αυτός αφορά σε ανώτερα ταξινομικά τάξα, ενώ στα έντομα εκτιμάται ότι είναι μικρότερος

καθώς επηρεάζεται από διάφορα γνωρίσματα, όπως ο μεταβολικός αριθμός, ο χρόνος γενιάς και το μέγεθος (Avisé *et al.*, 1992). Η πλειονότητα των μεταλλάξεων που συμβαίνει στο μόριο του μιτοχονδριακού DNA αφορούν απλές αντικαταστάσεις νουκλεοτιδίων. Οι μεταπτώσεις υπερισχύουν των μεταστροφών σε συγκρίσεις στενά συγγενικών ειδών, αλλά η αναλογία μεταπτώσεων/μεταστροφών ελαττώνεται καθώς αυξάνει η εξελικτική απόσταση μεταξύ των ειδών. Πιο σπάνια συμβαίνουν προσθήκες ή ελλείμματα και συνήθως περιορίζονται στην περιοχή του βρόγχου D σε ασπόνδυλα και κατώτερα σπονδυλωτά (Moritz *et al.*, 1987).

8.2. Έρευνες της ποικιλότητας του mtDNA

Το mtDNA είναι από τα περισσότερα και καλύτερα μελετημένα τμήματα του ζωικού γονιδιώματος, καθώς τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα στις πληθυσμιακές μελέτες. Υποθέτοντας ίση αναλογία φύλων, το δραστικό μέγεθος του πληθυσμού του mtDNA είναι το 1/4 σε σύγκριση με το πυρηνικό DNA. Το γεγονός αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη γενετική διαφοροποίηση εξαιτίας των φαινομένων της γενετικής παρέκκλισης και έτσι το καθιστά πιο ικανό στην αποκάλυψη ειδικών πληθυσμιακών δεικτών. Από φυλογενετική σκοπιά, η έλλειψη ανασυνδυασμού σημαίνει ότι οι δείκτες του mtDNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να διαπιστωθεί εάν τα άτομα των πληθυσμών είναι οργανωμένα σε μητριαρχικές σειρές. Οι λόγοι αυτοί καθιέρωσαν το mtDNA, ως το δημοφιλέστερο γενετικό υλικό για τη μελέτη της δομής πληθυσμών, της γονιδιακής ροής, των ζωνών υβριδισμού, της βιογεωγραφίας και των φυλογενετικών σχέσεων σε ενδοειδικό και διεϊδικό επίπεδο (Loxdale & Lushai, 1998).

Στα έντομα η ανάλυση της παραλλακτικότητας του mtDNA έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη ταξινομικών και πληθυσμιακών γενετικών μελετών σε βιότυπους αφίδων των σιτηρών (Powers *et al.*, 1989), σε Δίπτερα (fruit flies) (Gasparich *et al.*, 1997), παρασιτοειδή Υμενόπτερα (Heimpel *et al.*, 1997), για την μελέτη μιμητισμού σε Λεπιδόπτερα (Brower 1996), γενετικής παραλλακτικότητας σε ακρίδες (Charco *et al.*, 1994), μέλισσες (Crozier &

Crozier 1993), μελέτες μητριαρχίας σε μυρμήγκια και της κίνησης τους μεταξύ των φωλιών (Stille & Stille, 1992; Tek Tay *et al.* 1997), μελέτη ενδοσυμβιωτικών βακτηρίων των εντόμων (Aksoy, 1995) και μελέτη του φαινομένου της αρχής του ιδρυτή (Sheppard *et al.*, 1992).

Η χρησιμοποίηση της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR), η οποία επιτρέπει την ενίσχυση επιλεγμένων περιοχών του DNA, σε συνδυασμό με τη χρήση κατάλληλων ανιχνευτών του mtDNA, έκανε την εξέταση της ποικιλότητας του mtDNA σημαντικά ευκολότερη και ταχύτερη, από ότι στο παρελθόν. Σήμερα, υπάρχουν διαθέσιμοι αρκετοί “παγκόσμιοι εκκινητές” (universal primers), δηλαδή εκκινητές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον πολλαπλασιασμό της ίδιας περιοχής του mtDNA, για ένα αριθμό διαφορετικών ειδών (Simon *et al.*, 1994).

Τα ενισχυμένα αυτά τμήματα του mtDNA, μπορούν στη συνέχεια να μελετηθούν με την βοήθεια ενζύμων περιορισμού και την ανάλυση των RFLP's (Restriction Fragment length Polymorphism). Τα RFLP's αντιπροσωπεύουν αλλαγές στα μήκη του DNA μεταξύ συγκεκριμένων σημείων “κοπής” των ενζύμων, που οφείλονται σε αλλαγές της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Το DNA μπορεί να “κοπεί” χρησιμοποιώντας ενδονουκλεάσες περιορισμού, οι οποίες αναγνωρίζουν σημεία κοπής στο τμήμα του DNA που εξετάζεται. Συνήθως, οι ενδονουκλεάσες περιορισμού έχουν μήκος 4 ή 6 βάσεων, αλλά υπάρχουν ενδονουκλεάσες περιορισμού με μικρότερο ή μεγαλύτερο μήκος, οι οποίες όμως δεν χρησιμοποιούνται τόσο συχνά. Τα “κομμένα” τμήματα DNA ελέγχονται για πολυμορφισμό χρησιμοποιώντας πηκτές αγαρόζης, παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου EtBr (1 mg/ml), ή για μεγαλύτερη ανάλυση σε πηκτές πολυακρυλαμίδης 6% ή 8% (Loxdale & Lushai, 1998).

9. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Το έντομο *Sesamia nonagrioides* (*Lepidoptera:Noctuidae*) είναι ένα ολιγοφάγο έντομο και θεωρείται ως ένα από τους κυριότερους εχθρούς που είναι επιβλαβής για το καλαμπόκι *Zea mays* L. (*Poaceae*) σε πολλές χώρες τις Μεσογειακής λεκάνης. Η μέχρι τώρα γνώση μας για την γενετική παραλλακτικότητα για τα εσωτερικά επίπεδα του πληθυσμού αλλά και μεταξύ των επιπέδων του πληθυσμού στο *S.nonagrioides* είναι περιορισμένη. Υπάρχει μόνο μια μελέτη, αυτή του Bues *et al.*,1996 που εκτέλεσε μια αλλοενζυμική μέθοδο σε δυτικούς πληθυσμούς της Μεσογείου. Στην παρούσα μελέτη εξετάζεται η παραλλακτικότητα των γονιδίων του 16s RNA μεταξύ των πληθυσμών του *S.nonagrioides* χρησιμοποιώντας την μέθοδο RFLP (Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA). Επίσης μελέτη έγινε και στο τμήμα COI του μιτοχονδριακού DNA το οποίο όμως δεν έδειξε πολυμορφισμό.

Πιο συγκεκριμένα οι ιδιαίτεροι στόχοι μας είναι i) η διερεύνηση της φυλογενετικής ιστορίας πληθυσμών της Μεσογείου του εντόμου *S.Nonagrioides*, συμπεριλαμβανομένων εκείνων από το βόρειο όριο της περιοχής εξάπλωσης του είδους, και η γνώση ii) του παρόντος επιπέδου γενετικής ποικιλομορφίας μεταξύ των πληθυσμών, καθώς και iii) του επιπέδου ροής γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών.

Β! ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τεμαχίων περιορισμού (rflp) δύο τμημάτων του μιτοχονδριακού DNA (COI και 16S rRNA) χρησιμοποιήθηκε για να εξετάσουμε τη γενετική παραλλακτικότητα στους πληθυσμούς *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae) από χώρες της λεκάνης της Μεσογείου. Συνοπτικά τέσσερις πληθυσμοί συλλέχθηκαν από την κεντρική και νότια Ελλάδα, και πέντε από τα βόρεια γεωγραφικά πλάτη από την Ελλάδα, την Ιταλία, τη Γαλλία, και την Ισπανία. Δεν παρατηρήθηκε οποιαδήποτε παραλλαγή στο τμήμα COI, ενώ το τμήμα 16S rRNA αποδείχθηκε ιδιαίτερα πολύμορφο και βρέθηκαν 28 διαφορετικοί απλότυποι. Το χαμηλότερο επίπεδο πολυμορφισμού ενδοπληθυσμών βρέθηκε στους βόρειους πληθυσμούς απ'ό,τι νότιους. Αν και καμία σημαντική απομόνωση από την απόσταση δεν βρέθηκε, το UPGMA φαινογράφημα βασισμένο στο Nei's ακατέργαστο αριθμό των διαφορών νουκλεοτιδίων χώρισε τους πληθυσμούς σε δύο σημαντικές ομάδες, δηλαδή μια με τους βόρειους (40.6°N - 43.4°N) και άλλη με τους νότιους πληθυσμούς (37.3°N - 39.2°N).

Η ανάλυση της μοριακής διαφοράς αποκάλυψε ότι το μεγαλύτερο μέρος της παραλλακτικότητας ήταν μεταξύ των δύο σημαντικών ομάδων ($F_{ST} = 0.559$), και όλες οι συγκρίσεις μεταξύ βόρειων και νότιων πληθυσμών οδήγησαν σε υψηλό και σημαντικό F_{ST} (γενικό $F_{ST} = 0.604$). Η μεγάλης απόστασης μετανάστευση του *S.nonagrioides* φαίνεται να είναι ένα σπάνιο γεγονός. Η εμφάνιση μερικών διαδεδομένων απλότυπων και η γενετική ομοιότητα των βόρειων πληθυσμών θα μπορούσαν να αποδοθούν σε μια ιστορική επέκταση ορισμένων απλότυπων, ανεκτική στους σκληρούς χειμώνες, από τα νότια προς τα βόρεια σύνορα της περιοχής διανομής ειδών.

Η μεσογειακή κάμπια καλαμποκιού *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lepidoptera: Noctuidae) είναι ένα ολιγοφάγο έντομο και θεωρείται σημαντικό έντομο παράσιτο του αραβόσιτου, *Zea mays* L. (Poaceae) σε διάφορες χώρες

της λεκάνης της Μεσογείου. Η περιοχή εξάπλωσης του είδους περιορίζεται νότια του βόρειου παραλλήλου 45°N και της βορειοδυτικής Αφρικής (Nucifora, 1966 Stavrakis, 1967; Melamed- Madjar και Tam, 1980; Lodos, 1981 Galichet, 1982). Είναι ένα είδος εντόμων με πολλές γενιές σε μια περίοδο ολοκληρώνοντας έναν μεταβλητό αριθμό γενεών ετησίως, από δύο στη νότια Γαλλία μέχρι σε τέσσερα στην Ελλάδα και το Μαρόκο (Anglade, 1972; Tsitsipis, 1988). Διαχειμάζει ως πλήρως αναπτυγμένη προνύμφη και τα ενήλικα προκύπτουν από τα τέλη Μαρτίου μέχρι το Μάιο. Τα ζευγαρωμένα θηλυκά γεννούν τα αυγά μεταξύ κολεού και στελέχους. Ο έλεγχος του εντόμου είναι βασισμένος κυρίως στα χημικά εντομοκτόνα, αν και εναλλακτικές μέθοδοι ελέγχου έχουν εξεταστεί και έχουν εφαρμοστεί, όπως τα μικροβιακά εντομοκτόνα, και οι ανθεκτικές ποικιλίες (Gutierrez et al., 1986). Μια πτυχή της βιολογίας εντόμων που πρέπει να ληφθεί υπόψη στα προγράμματα διαχείρισης είναι η ικανότητα διασποράς. Από έναν πληθυσμό η δυναμική διασποράς των θηλυκών είναι ο αποφασιστικός παράγοντας επειδή είναι τα θηλυκά που γεννούν τα αυγά. Στις οικολογικές μελέτες δύο διαφορετικές μέθοδοι που μετρούν τη διασπορά εντόμων μπορούν να εφαρμοστούν. Η πρώτη αναφέρεται ως «εξάπλωση- επανασύλληψη» (release-recapture) (άμεσες μέθοδοι) που μπορούν να παρέχουν τις πληροφορίες για το σύγχρονο σχέδιο της μετανάστευσης αλλά έχουν πολλές πρακτικές δυσκολίες και περιορισμούς. Επίσης, οι άμεσες μέθοδοι δεν μπορούν να υπολογίσουν τη συμβολή των μεταναστών στους τοπικούς πληθυσμούς δεδομένου ότι οι μεταναστεύσεις δεν μπορούν να μεταφραστούν πάντα ως επιτυχής αποίκιση. Οι «έμμεσες» μέθοδοι στηρίζονται στις συχνότητες αλληλόμορφων γονιδίων, τις ακολουθίες DNA ή τα τεμάχια περιορισμού και έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για την αξιολόγηση της ροής γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών των φυτοφάγων εντόμων (Peterson & Denno 1998). Οι γενετικοί δείκτες θα μπορούσαν να παρέχουν τις μακροπρόθεσμες έμμεσες εκτιμήσεις και αυτές οι πληροφορίες θα ήταν χρήσιμες στην κατανόηση της δυναμικής της επέκτασης παρασίτων (Roderick, 1996; Peterson & Denno, 1998). Η ικανότητα διασποράς του *S. nonagrioides* δεν έχει μελετηθεί καλά. Μόνο οι μελέτες που έχουν βασιστεί στις «άμεσες μεθόδους» έχουν εξετάσει αυτό το ζήτημα.

Μέχρι τώρα η γνώση μας σχετικά με τη γενετική παραλλακτικότητα σε επίπεδο μεταξύ και εντός των πληθυσμών στο *S. nonagrioides* είναι περιορισμένη. Υπάρχει μόνο μια μελέτη, εκείνη των Bues et al. (1996), οι οποίοι εκτέλεσαν μια ανάλυση με αλλοένζυμα στους δυτικούς μεσογειακούς πληθυσμούς. Οι συντάκτες ανέφεραν την ετερογένεια μεταξύ των πληθυσμών που συσχετίστηκε με τις οικοφυσιολογικές διαφορές. Σε αντίθεση, οι μοριακοί δείκτες έχουν εφαρμοστεί εκτενώς σε άλλα είδη παρασίτων Noctuidae για να αποκαλύψουν τις πληροφορίες για την προσαρμογή ξενιστή-φυτού, τη ροή γονιδίων, την επέκταση πληθυσμών, και την φυλλογεωγραφική δόμηση (π.χ. Nibouch et al., 1998; Zhou et al., 2000; Salvato et al., 2002; Martel et al., 2003; Scott et al., 2003; Sezonlin et al., 2006).

Οι ιδιότητες του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), όπως τα υψηλά ποσοστά μεταλλαγής σε σύγκρισή με το πυρηνικό DNA, τον απλοειδή τρόπο (μητρικό) κληρονομιάς και κανέναν επανασυνδυασμό, το κάνουν ένα πολύτιμο εργαλείο για την πρόσφατη ιστορία των πληθυσμών (Avise, 1994 ; 2000). Λόγω του τρόπου κληρονομιάς του, το mtDNA είναι ευαίσθητο στις δυσχέρειες και στις συνέπειες της υποδιαίρεσης πληθυσμών (Wilson et al, 1985). Η ανάλυση mtDNA έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε διάφορες μελέτες συμπεραίνοντας τις ενδοσυγκεκριμένες γενετικές σχέσεις και τη σύνθεση πληθυσμών στα διάφορα είδη εντόμων διαφορετικών τάξεων, όπως για παράδειγμα: ημίπτερα (Powers et al., 1989; Downie, 2002), δίπτερα (Hale & Singh, 1991; Gasparich et al., 2002), υμενόπτερα (Heimpel, et al., 1997; Taylor et al., 1997), και λεπιδόπτερα (Salvato et al., 2002; Meagher & Meagher, 2003; Snall et al, 2004; Vandewoestijne et al., 2004; Sezonlin et al., 2006)

Στην παρούσα μελέτη εξετάσαμε την παραλλακτικότητα στα γονίδια rRNA και COI 16S mtDNA μεταξύ των πληθυσμών του *S. nonagrioides* χρησιμοποιώντας την ανάλυση πολυμορφισμού μήκους τεμαχίων περιορισμού (RFLP). Το γονίδιο COI είναι το ο πιο αργό γονίδιο της πρωτεΐνης που κωδικοποιεί τα μιτοχονδριακά γονίδια (Simon et al., 1994). Τα γονίδια rRNA mtDNA έχουν αποδειχθεί να είναι χρήσιμα για τις σχέσεις σε διαφορετικά ταξινομικά επίπεδα (Arnason et al., 1991). Οι συγκεκριμένοι στόχοι μας ήταν i) να ερευνήσουμε τη φυλογενετική ιστορία των πληθυσμών του *S. Nonagrioides*, που προήλθε από το ευρωπαϊκό μέρος χωρών της λεκάνης της Μεσογείου, συμπεριλαμβανομένων εκείνων από το βόρειο όριο

της περιοχής εξάπλωσης του είδους , και για να λάβουμε τις πληροφορίες για ii) το παρόν επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας εντός και μεταξύ των πληθυσμών, και iii) το επίπεδο ροής γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Βιολογικό υλικό

Συνολικά εξετάστηκαν 180 άτομα του εντόμου *Sesamia nonagrioides* με την μέθοδο RFLP-PCR. Τα έντομα συλλέχθηκαν όταν βρισκόντουσαν στο στάδιο της πλήρους προνύμφης από καλλιέργειες αραβοσίτου, από διάφορες τοποθεσίες στην Ελλάδα, την Ιταλία, τη Γαλλία και την Ισπανία. Η συλλογή των εντόμων πραγματοποιήθηκε κατά την περίοδο από Σεπτέμβριο έως Οκτώβριο του 2004. Οι πληθυσμοί του εντόμου προέρχονταν από διαφορετικά γεωγραφικά πλάτη. Πιο συγκεκριμένα τέσσερις πληθυσμοί επιλέχθηκαν από τα νότια γεωγραφικά πλάτη (37,3°N - 39,2°N) και πέντε από τα βόρεια (40,6°N - 43,4°N). (Σχήμα 3). Οι περιοχές αυτές είναι :1: Toulouse (43.4°N), 2: Pontevedra (42.3°N), 3: Lleida (41.4°N), 4: Perugia (43.1°N), 5 Achioupoli (40.6°N), 6: Velestino (39.2°N), 7: Mornos (38.2°N), 8: Kilini (37.5°N) and 9: Tripoli (37.3°N) (Εικόνα 6).

Τα άτομα που συλλέχθηκαν από κάθε πληθυσμό άλλα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf μαζί με καθαρή αιθανόλη στους 4°C στη συντήρηση ενώ άλλα τοποθετήθηκαν σε φιαλίδια Eppendorf και κατευθείαν στη κατάψυξη. Στη συνέχεια τα Eppendorf, μαζί με τα άτομα, τοποθετήθηκαν και διατηρήθηκαν στους -23°C μέχρι την εξαγωγή του DNA. Η εξαγωγή του DNA έγινε από το κεφάλι της κάθε προνύμφης ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται από τον Margaritoroulos *et al.* (2003).



Εικόνα 6: Οι περιοχές δειγματοληψίας των εννέα πληθυσμών του εντόμου *Sesamia nonagrioides*. 1: Toulouse (43.4°N), 2: Pontevedra (42.3°N), 3: Lleida (41.4°N), 4: Perugia (43.1°N), 5 Axioupoli (40.6°N), 6: Velestino (39.2°N), 7: Mornos (38.2°N), 8: Kilini (37.5°N) and 9: Tripoli (37.3°N).

2.2. ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA

2.2.1 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η εξαγωγή του mtDNA έγινε με την χρήση πρωτεϊνάσης K (K proteinase) σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται από τους Margaritoroulos et al., (2003): το έντομο αρχικά λιώνεται ελαφρά και στη συνέχεια προστίθενται 300 μl διαλύματος πέψης (digestion buffer: extraction buffer: 40 mM Tris, pH 8.5, 10 mM EDTA, 200 mM NaCl, 1% SDS και 100mg/ml Proteinase K). Στη συνέχεια γίνεται σχολαστική λειοτρίβηση και τοποθέτηση των δειγμάτων σε υδατόλουτρο στους 37° C για δυο ώρες. Κάθε μισή ώρα γίνεται ανάδευση των δειγμάτων. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν στη συνέχεια ήταν τα εξής: Προστέθηκαν 100μl οξικού νατρίου NaOAc 3M, pH 5,2 και το φιαλίδιο τοποθετήθηκε στους -20° C για 15-20 λεπτά. Κατόπιν, τα φιαλίδια φυγοκεντρήθηκαν στις 13800 στροφές για 5 λεπτά και το

υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε νέο φιαλίδιο. Ακολούθησαν διαδοχικές εκχυλίσεις με φαινόλη, φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (25:24:1; v:v:v) και χλωροφόρμιο:ισοαμυλική αλκοόλη (24:1; v:v) και φυγοκέντριση στις 13800 στροφές για 20, 5 και 5 λεπτά αντίστοιχα. Πριν τις φυγοκεντρίσεις γινόταν έντονη ανάδευση στο vortex. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε νέο περιέκτη, όπου προστέθηκε 1ml ισοπροπανόλης, όπου παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντριση στις 13800 στροφές, για 20 λεπτά. Αφού απορρίφθηκε προσεκτικά το υπερκείμενο ώστε να παραμείνει το ίζημα, προστέθηκε 1ml αλκοόλη 70% και ακολούθησε φυγοκέντρίσή στις 13800 στροφές για 5 λεπτά. Τέλος, έγινε προσεκτική απόρριψη του υπερκειμένου υγρού, ώστε να παραμείνει το ίζημα και ακολούθησε στέγνωμα του DNA στον κλίβανο, για 15 λεπτά στους 37° C. Στη συνέχεια προστέθηκαν 100μl ddH₂O και τα DNA τοποθετήθηκαν στο ψυγείο (8°C).

Το λεπτομερές πρωτόκολλο παρατίθεται στο παράρτημα, στη σελίδα 81.

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR), χρησιμοποιήθηκε για την ενίσχυση της περιοχής 16s RNA του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, μήκους 600 περίπου βάσεων. Για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής 16S RNA του μιτοχονδριακού DNA χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος των εκκινητικών μορίων (Palumbi *et al.*, 1991) με σκοπό να ενισχύσουν ένα τμήμα 600 bp στην περιοχή αυτή:

L2510: 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3'

H3080: 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'

Ενώ για τον πολλαπλασιασμό της περιοχής COI DNA χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω ζεύγος των εκκινητικών μορίων, οι οποίοι συντέθηκαν με βάση την υποστήριξη GenBank J829717 με σκοπό να ενισχύσουν ένα τμήμα 780 bp:

COI forward: 5-CCG GGA TTT GGA ATA ATC TC-3'

COI reverse: 5'-CAG CTG GAG GAA GAT TTT GA-3'

Ο πολλαπλασιασμός του δίκλωνου DNA πραγματοποιήθηκε σε όγκους αντιδράσεων των 50μl σύμφωνα με τις συνθήκες που έχουν περιγραφεί από τους Martinez-Torres *et al.*, 1997, και με μερικές τροποποιήσεις:

- 1,5 Ταq DNA πολυμεράση
- 5 μl ρυθμιστικό διάλυμα Taq 10 × (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl pH 9)
- 2,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs
- περίπου 100 ng από κάθε εκκινητή και
- 1 μl (περίπου 100 ng) από DNA κάθε ατόμου

Οι συνθήκες ενίσχυσης περιελάμβαναν μια προκαταρκτική αποδιάταξη του DNA στους 95° C για 4 λεπτά, ένα σύνολο 35 κύκλων των 40 δευτερολέπτων στους 94° C, 40 δευτερολέπτων στους 56° C {52° C για το COI}, 40 δευτερολέπτων {1λεπτό για το COI} στους 72° C. Τέλος το πρόγραμμα της αντίδρασης ολοκληρωνόταν με ένα τελικό στάδιο συμπληρωματικής επιμήκυνσης στους 72°C για δέκα λεπτά.

Μετά τον πολλαπλασιασμό, ο έλεγχος της επιτυχίας της PCR γινόταν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής αγαρόζης 2% που περιείχε βρωμιούχο αιθίδιο 0,5 μl ml⁻¹ σε διάλυμα TAE. Η εξέταση των ζωνών του DNA έγινε κάτω από λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας. Όταν τα αποτελέσματα ήταν θετικά, ακολουθούσαν πέψεις με ένζυμα περιορισμού

Ένζυμο περιορισμού	Αλληλουχία αναγνώρισής	Αριθμός δειγμάτων
<i>AluI</i>	AG/CT	20
<i>AseI</i>	AT/TAAT	20
<i>Avall</i>	G/GWCC	20
<i>BssSI</i>	C/ACGAG	20
<i>DdeI</i>	C/TANG	20
<i>HaeIII</i>	GG/CC	20
<i>HhaI</i>	GGG/C	20
<i>HinI</i>	G/ANTC	20
<i>MboI</i>	/GATC	20
<i>MseI</i>	T/TAA	20
<i>MspI</i>	C/CGG	20
<i>SpeI</i>	A/CTAGT	20
<i>SspI</i>	AAT/ATT	20
<i>TaqI</i> ,	T/CGA	20
<i>XbaI</i>	T/CTAGA	20

ΠΙΝΑΚΑΣ 1^{ος}: Ένζυμα περιορισμού που χρησιμοποιήθηκαν κατά την μελέτη του mtDNA, η αλληλουχία αναγνώρισής και ο αριθμός των δειγμάτων που εξετάστηκαν με κάθε ένα από αυτά.

Τα τμήματα του mtDNA που πολλαπλασιάστηκαν με την τεχνική της PCR, εξετάστηκαν για την ύπαρξη πολυμορφισμού με τις παρακάτω ενδονουκλεάσες περιορισμού : *AluI*, *AseI*, *Avall*, *BssSI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HhaI*, *HinI*, *MboI*, *MseI*, *MspI*, *SpeI*, *SspI*, *TaqI*, *XbaI* (New England, Biolabs, UK).

Οι πέψεις έγιναν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα της κατασκευάστριάς εταιρίας New England, Biolabs. Το διάλυμα της κάθε αντίδρασης περιείχε:

- 1 μl κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα
- 2 μονάδες ενζύμου
- 2μl από το προϊόν της PCR
- 5μl ddH₂O

Ακολούθησε επώαση στο σκοτάδι, στους 37° C για περίπου 24 ώρες. Τα προϊόντα κάθε πέψης διαχωρίστηκαν σε ηλεκτροφόρηση πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%, με σκοπό το καλύτερο διαχωρισμό τους.

Ο λεπτομερής τρόπος παρασκευής και η χρώση της πηκτής πολυακρυλαμίδης δίδονται στο παράρτημα στη σελίδα 84.

2.3. Δείκτες ποικιλίας και γενετική δομή πληθυσμού

Τα αρχικά δεδομένα ήταν πρότυπα περιορισμένης τοποθεσίας. Κάθε απλότυπος προσδιορίστηκε ως μια σειρά δυαδικών δεδομένων, «1» για την παρουσία περιορισμένης τοποθεσίας και «0» για την απουσία της. Τα πρότυπα περιορισμού είναι διαθέσιμα εφόσον ζητηθούν. Οι σταθεροί δείκτες γενετικής ποικιλίας, όπως ο αριθμός των διαφορετικών απλότυπων που βρέθηκαν σε κάθε δείγμα, η ποικιλία απλότυπου (h) (η πιθανότητα ότι δύο τυχαία επιλεγμένα απλότυπα είναι διαφορετικά στο δείγμα), η ποικιλία νουκλεοτιδίου (π) (η πιθανότητα ότι δύο τυχαία επιλεγμένα ομόλογα νουκλεοτίδια είναι διαφορετικά) (Nei, 1987) και ο μέσος αριθμός των ζευγαρωτών διαφορών (d_x) (Tajima, 1983), υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την έκδοση Arlequin 3.01 (Excoffier et al., 2005).

Η δομή του πληθυσμού εκτιμήθηκε υπολογίζοντας τις τιμές F_{ST} για τις ζευγαρωτές συγκρίσεις των δειγμάτων. Μια εκτίμηση της ροής του γονιδίου με mtDNA μπορεί να εξασφαλιστεί με πολλές μεθόδους, μεταξύ των οποίων προτάθηκε και η εξελικτική μέθοδος των Slatkin & Maddison (1989). Ωστόσο, σε περιπτώσεις μικρών ταχυτήτων μετανάστευσης, όπως βρέθηκε στη μελέτη μας, η μέθοδος που βασίζεται στο F_{ST} παρέχει καλύτερες εκτιμήσεις (Roderick, 1996). Οι τιμές F_{ST} υπολογίστηκαν χρησιμοποιώντας την έκδοση Arlequin 3.01. Η μηδενική διανομή των ζευγαρωτών τιμών F_{ST} με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει καμία διαφορά ανάμεσα στους πληθυσμούς εξασφαλίζεται συνδυάζοντας με πολλούς τρόπους τα απλότυπα ανάμεσα στους πληθυσμούς. Η τιμή P του ελέγχου είναι η αναλογία 10.000 συνδυασμών που οδηγεί σε μια τιμή F_{ST} μεγαλύτερη ή ίση με την παρατηρημένη. Η δομή των δεδομένων επίσης ερευνήθηκε με ανάλυση της

μοριακής διακύμανσης (AMOVA, Excoffier et al., 1992) χρησιμοποιώντας την έκδοση Arlequin 3.01. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν ο διαχωρισμός της ποικιλίας απλότυπου ανάμεσα στις ομάδες (βόρειοι και νότιοι πληθυσμοί), μεταξύ των πληθυσμών μέσα στις ομάδες και μέσα στους πληθυσμούς. Αυτή η προσέγγιση βασίζεται σε αναλύσεις της διακύμανσης των συχνοτήτων του γονιδίου αλλά λαμβάνει υπ' όψη τον αριθμό των μεταλλαγών ανάμεσα στα μοριακά απλότυπα. Μια μη παραμετρική μεταλλακτική προσέγγιση χρησιμοποιήθηκε για τη σημασία των δεικτών σταθεροποίησης (Φ_{CT} , Φ_{ST} , F_{ST}) που περιγράφηκαν από τον Excoffier και τους συνεργάτες του (1992). Εξετάστηκε επίσης η φυλογενετική σχέση μεταξύ των πληθυσμών σχεδιάζοντας ένα δέντρο UPGMA χρησιμοποιώντας το PHYLIP 3,5 (Felsenstein, 1993) βασισμένο στον αρχικό αριθμό διαφοράς νουκλεοτιδίου ανάμεσα στους πληθυσμούς του Nei (Nei & Li, 1979). Για να ελεγχθεί η σημασία απομόνωσης από απόσταση, εκτελέστηκε ένα τεστ Mantel χρησιμοποιώντας πίνακες γεωγραφικής απόστασης και τον αρχικό αριθμό διαφοράς νουκλεοτιδίου του Nei ανάμεσα στους πληθυσμούς ή στις ζευγαρωτές τιμές F_{ST} ως δεδομένα εισαγωγής. Ο έλεγχος εκτελέστηκε χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Fstat v. 2.9.3.2 (Goudet, 2001).

2.3.1. Σχέση μεταξύ απλότυπων

Εξετάστηκε η σχέση μεταξύ των απλότυπων με τη χρήση του ελάχιστου ανοιγόμενου δικτύου (MSN). Το MSN σχεδιάστηκε από το σετ δεδομένων των απλότυπων χρησιμοποιώντας τον Μειωμένο Ενδιάμεσο Αλγόριθμο (Bandelt et al., 1995) που πραγματοποιήθηκε στο πρόγραμμα NETWORK έκδοση 4.1.1.2 (Fluxus technology Ltd.).

2.3.2. Δημογραφική ιστορία των πληθυσμών

Η διανομή των παρατηρημένων διαφορών ανάμεσα σε ζευγάρια απλότυπων αναλύθηκε από την κατοπροσάρμοστη διανομή χρησιμοποιώντας το Arlequin 3.01. Αυτή η διανομή είναι συνήθως πολλαπλή σε πληθυσμούς σε δημογραφική ισορροπία αλλά συνήθως είναι μονοκόρυφη

σε πληθυσμούς που έχουν περάσει πρόσφατα μια καθαρή δημογραφική επέκταση (Rogers and Harpending, 1992; Slatkin and Hudson, 1991). Η εγκυρότητα του εκτιμώμενου μοντέλου βηματικής επέκτασης (Roger, 1995) ελέγχθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο του συνόλου τετραγωνικής απόκλισης ανάμεσα στην παρατηρημένη και την αναμενόμενη κακοπροσαρμογή ως ένας στατιστικός έλεγχος (Schneider and Excoffier, 1999). Η σπουδαιότητα αυτού του στατιστικού ελέγχθηκε ως ένα εργαλείο στο Arlequin 3.01. Επιπροσθέτως, πιθανή χωρική επέκταση του πληθυσμού εξετάστηκε χρησιμοποιώντας το μοντέλο του Excoffier (2004). Ο Ray και οι συνεργάτες του (2003) έδειξαν ότι μια μεγάλη χωρική επέκταση μπορεί να οδηγήσει στο ίδιο σήμα στην κακοπροσαρμοστή διανομή όπως στην καθαρή δημογραφική επέκταση σε ένα πανμικτικό πληθυσμό αλλά μόνο αν οι γειτονικές φυλές ανταλλάσσουν πολλούς μετανάστες. Η εγκυρότητα του μοντέλου χωρικής επέκτασης εξετάστηκε χρησιμοποιώντας την προαναφερθείσα μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων ως εργαλείο στο Arlequin έκδοση 3.01.

Υπολογίστηκε επίσης το τεστ Tajima (D) για ουδετερότητα (Tajima, 1989). Σημειώστε ότι οι σημαντικές τιμές D μπορεί να οφείλονται σε παράγοντες και όχι σε επιλεκτικά φαινόμενα, όπως επέκταση του πληθυσμού, κυκλοφοριακή συμφόρηση ή ετερογένεια των ρυθμών μεταλλαγής (Tajima, 1993; 1996; Aris-Brosou and Excoffier, 1996; Tajima, 1996).

3. Στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων

3.1. Συχνότητες απλότυπου μέσα στην ποικιλία πληθυσμού

Το ενισχυμένο τμήμα του COI ήταν 780 bp και έξι από τα 15 ένζυμα περιορισμού είχαν μια θέση αναγνώρισης (καταγράφηκαν ένα ως τέσσερα ανά ένζυμο και ένα σύνολο 16 θέσεων αναγνώρισης). Καμία απόκλιση δεν βρέθηκε μεταξύ των πληθυσμών και κάθε ένα προσδιορίζεται σε ένα απλότυπο. Συνεπώς, τα δεδομένα από το COI αποκλείστηκαν από την ανάλυση πληθυσμού. Αντίθετα, 12 από τα 15 ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν

είχαν μια θέση αναγνώρισης (καταγράφηκαν δύο ως έξι ανά ένζυμο και ένα σύνολο 48 θέσεων αναγνώρισης) σε 16S rRNA και βαθμολογήθηκαν συνολικά 28 απλότυπα (Πίνακας 2). Ωστόσο, παρατηρήθηκε μήκος ετεροπλασμίας. Σε 8 ξεχωριστά δέντρα ενισχύθηκε ένα τμήμα ~590 bp ενώ στα άλλα 97 το τμήμα ήταν ~610 bp. Αυτό το μήκος ετεροπλασμίας έδειξε έναν ενδιαφέρον βαθμό αλλαγής από το βορρά προς το νότο. Οι πέντε βόρειοι πληθυσμοί, δηλαδή αυτοί με τοποθεσίες (Τουλούζη, Περούτζια, Ποντεβέντρα, Λέιντα, Αξιούπολη) με γεωγραφικό πλάτος μεγαλύτερο από 40°N (Σχήμα 1) αποτελούνται αποκλειστικά από ξεχωριστούς πληθυσμούς με τμήμα ~590 bp ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε στους τέσσερις νότιους πληθυσμούς (Βελεστίνο 45%, Μόρνος 15%, Κυλλήνη 10%, Τρίπολη 5%). Το μήκος ετεροπλασμίας παρατηρήθηκε σε ποικίλα ζώα, όπως λαγόμορφα (Biju-Duval et al., 1991; Casane et al., 1997) που έχει αποδοθεί σε αποκλίσεις στον αριθμό αντιγράφων των σύντομων επαναλαμβανόμενων ακολουθιών στις μεγάλες μη κωδικοποιημένες περιοχές του mtDNA.

15 από τα 28 απλότυπα που καταγράφηκαν ήταν μοναδικά. Δηλαδή βρέθηκαν σε έναν πληθυσμό και αντιπροσωπεύουν το 11.6% των ξεχωριστών πληθυσμών που εξετάστηκαν. Τα υπόλοιπα 13 απλότυπα ήταν κοινά ανάμεσα σε δύο ή παραπάνω πληθυσμούς. Οι πιο κοινοί απλότυποι ήταν h1, h2 και h3 που όλοι μαζί κάνουν το 62% των απλότυπων που εξετάστηκαν. Οι πιο κοινοί απλότυποι (h1) βρέθηκαν σε όλες τις τοποθεσίες που εξετάστηκαν (Πίνακας 2). Η συχνότητα των απλότυπων h1 και h2 μειώθηκε σημαντικά στο νότο αν και το h2 δεν δειγματίστηκε στην Περούτζια (συνδυασμός δεδομένων για το h1 και h2: 56.0% στο βορρά έναντι 6.0% στο νότο, $\chi_1^2 = 46.3$, $P < 0.001$ και 24% στο βορρά έναντι 8.8% στο νότο, $\chi_1^2 = 7.3$, $P < 0.007$, αντίστοιχα). Αντίθετα, το απλότυπο h3 συγκεντρώθηκε μόνο στο νότο (Πίνακας 2). Γενικά, η μεγαλύτερη ενδοπληθυσμιακή ποικιλία παρατηρήθηκε στους νότιους πληθυσμούς σε σύγκριση με αυτούς από το βορρά. Ο αριθμός απλότυπων και η ποικιλία απλότυπου ήταν μεγαλύτεροι στο νότο απ' ό τι στο βορρά. Επίσης, βρέθηκαν 17 απλότυποι μόνο στο νότο ενώ μόνο επτά στο βορρά. Οι εναπομείναντες 5 απλότυποι ήταν κοινοί ανάμεσα στους βόρειους και νότιους πληθυσμούς (Πίνακες 2 & 3). Η ποικιλία νουκλεοτιδίου (π) και ο μέσος αριθμός διαφορών (dx) ήταν 2-6 φορές μεγαλύτερα στους νότιους πληθυσμούς απ' ό τι στους βόρειους και ~3 φορές

μεγαλύτερη όταν συγκρίθηκαν οι συνδυασμοί δεδομένων των βόρειων και νότιων τοποθεσιών (Πίνακας 3).

Το MSN δεν επιδεικνύει ένα μοντέλο που μοιάζει με αστέρι και ομαδοποίησε τους απλότυπους σε δύο μεγάλες ομάδες (Εικόνα 2). Τρεις απλότυποι (δειγματολήφθηκαν μόνο στο νότο) βρίσκονται στη μέση του δικτύου (ή του δέντρου). Στη μία άκρη βρίσκεται η ομάδα με απλότυπους από το βορρά και αυτά που βρέθηκαν και στις βόρειες και νότιες τοποθεσίες, ενώ στην αντίθετη άκρη βρίσκονται οι απλότυποι από το νότο.

Πίνακας 2. Συχνότητα και αριθμός (εντός παρενθέσεων) των διαφορετικών απλότυπων που βρίσκονται σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας. Εξετάστηκαν είκοσι άτομα ανά περιοχή δειγματοληψίας.

Haplotypes	Βόρειες περιοχές					Νότιες περιοχές				Βορράς N = 100	Νότος N = 80	Ολικό N = 180
	Tou	Per	Pon	Lle	Axi	Vel	Mor	Kil	Tri			
h1	0.55	0.70	0.40	0.50	0.65	0.10	0.05	0.10	0.05	0.56	0.08	0.34 (62)
h2	0.25		0.40	0.35	0.20	0.25	0.10			0.24	0.09	0.17 (31)
h3					0.10					0.02	0.00	0.01 (2)
h4	0.10				0.05	0.05				0.03	0.01	0.02 (4)
h5	0.05									0.01	0.00	0.01 (1)
h6	0.05			0.05						0.02	0.00	0.01 (2)
h7		0.05	0.10							0.03	0.00	0.02 (3)
h8		0.05		0.05						0.02	0.00	0.01 (2)
h9		0.15	0.05	0.05			0.05			0.05	0.01	0.03 (6)
h10		0.05								0.01	0.00	0.01 (1)
h11								0.20		0.00	0.05	0.02 (4)
h12								0.05		0.00	0.01	0.01 (1)
h13						0.05	0.40	0.30	0.25	0.00	0.25	0.11 (20)
h14							0.05	0.05		0.00	0.03	0.01 (2)
h15								0.15		0.00	0.04	0.02 (3)
h16						0.05	0.10	0.10		0.00	0.06	0.03 (5)
h17						0.10	0.05	0.05	0.20	0.00	0.10	0.04 (8)
h18			0.05							0.01	0.00	0.01 (1)
h19							0.05		0.20	0.00	0.06	0.03 (5)
h20							0.05			0.00	0.01	0.01 (1)
h21						0.15	0.15		0.15	0.00	0.11	0.05 (9)
h22									0.05	0.00	0.01	0.01 (1)
h23									0.05	0.00	0.01	0.01 (1)
h24									0.05	0.00	0.01	0.01 (1)
h25						0.05				0.00	0.01	0.01 (1)
h26						0.05				0.00	0.01	0.01 (1)
h27						0.05				0.00	0.01	0.01 (1)
h28						0.05				0.00	0.01	0.01 (1)

Βόρειες περιοχές: Tou = Toulouse, France; Pon = Pontevedra, Spain; Lle = Lleida, Spain; Per = Perugia, Italy; Axi = Axioupoli, Greece; Νότιες περιοχές: Vel = Velestino, Greece; Mor = Mornos, Greece; Kil = Kilini, Greece; Tri = Tripoli, Greece.

Πίνακας 3. Ο αριθμός ατόμων που εξετάστηκαν (N), αριθμός (N_h) διαφορετικών απλότυπων που βρέθηκαν σε κάθε περιοχή δειγματοληψίας, απλότυπος (h) και η νουκλεοτιδική ποικιλομορφία (π), μέσος αριθμός συνδυασμών άνα ζεύγος διαφορών (dx), πιθανότητα για το ξαφνικό πρότυπο επέκτασης και Tajima D τεστ για την ουδετερότητα

	N	N_h	h	π	dx	Ξαφνικό πρότυπο επέκτασης ($P_{Exp. SSD \geq Obs. SSD}$)	Χωρικό πρότυπο επέκτασης ($P_{Exp. SSD \geq Obs. SSD}$)	D
Northern								
Colosse	20	5	0.653±0.093	0.078±0.046	3.5±1.9	P = 0.05	P = 0.60	- 0.147 ^{NS}
Perugia	20	5	0.505±0.126	0.068±0.041	3.1±1.7	P = 0.15	P = 0.60	- 0.322 ^{NS}
Montevedra	20	5	0.700±0.066	0.097±0.056	4.4±2.3	P = 0.001	P = 0.35	- 0.331 ^{NS}
Lleida	20	5	0.653±0.076	0.077±0.046	3.5±1.8	P = 0.001	P = 0.30	0.800 ^{NS}
Kioupoli	20	4	0.553±0.111	0.048±0.031	2.2±1.2	P = 0.10	P = 0.35	- 0.153 ^{NS}
Southern								
Castellino	20	12	0.921±0.042	0.270±0.142	12.1±5.7	P = 0.35	P = 0.50	2.315 ^{**}
Mornos	20	10	0.826±0.073	0.196±0.105	8.8±4.2	P = 0.20	P = 0.60	1.176 ^{NS}
Kilini	20	8	0.863±0.049	0.137±0.073	7.4±3.6	P = 0.50	P = 0.15	0.386 ^{NS}
Tripoli	20	8	0.868±0.041	0.140±0.077	6.3±3.1	P = 0.95	P = 0.80	- 0.542 ^{NS}
North	100	11	0.629±0.044	0.076±0.044	3.4±1.8	P = 0.05	P = 0.70	- 0.444 ^{NS}
South	80	21	0.899±0.020	0.215±0.110	9.7±4.5	P = 0.75	P = 0.50	1.741 ^{NS}

NS = όχι στατιστικός σημαντικές διαφορές, **P < 0.01

3.2. Δομή πληθυσμού

Ο AMOVA δηλώνει ότι η πλειοψηφία της γενετικής απόκλισης (55.9%) συνέβη ανάμεσα στους νότιους και βόρειους πληθυσμούς και η τιμή F_{CT} (0.559, $P < 0.001$) υποδηλώνει υψηλό επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης. Η απόκλιση μεταξύ των πληθυσμών μέσα στις ομάδες ήταν 4,5% ($F_{ST} = 0.102$, $P < 0.001$) και μέσα στους πληθυσμούς ήταν 29,6%. Η συνολική τιμή F_{ST} (0,604, $P < 0,001$) υποδήλωνε ένα υψηλό επίπεδο διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών.

Η γεωγραφική δόμηση των πληθυσμών αποκαλύφθηκε επίσης από το δέντρο UPGMA (Εικόνα 7) βασισμένο στον αρχικό αριθμό του N_{ei} για τις διαφορές νουκλεοτιδίου ανάμεσα στους πληθυσμούς και την ανάλυση F_{ST} (Πίνακας 4). Το δέντρο αποκάλυψε δύο ξεχωριστές ομάδες. Η πρώτη περιελάμβανε τους πέντε πληθυσμούς από βόρεια γεωγραφικά πλάτη και η άλλη ομάδα αυτούς τους πληθυσμούς από το νότο. Η ανάλυση F_{ST} αποκάλυψε σημαντικές και υψηλές τιμές που κυμαίνονται από 0,236 ως 0,715 ανάμεσα στους βόρειους και νότιους πληθυσμούς. Αντίθετα, ασήμαντες και χαμηλές τιμές F_{ST} βρέθηκαν στις περισσότερες συγκρίσεις μεταξύ των δειγμάτων από το βορρά. Στη νότια ομάδα, μόνο οι δύο από τις έξι συγκρίσεις (Βελεστίνο έναντι Κυλλήνης και Βελεστίνο έναντι Τρίπολης) οδήγησαν σε μέτριες και σημαντικές τιμές F_{ST} (0,222 και 0,244 αντίστοιχα). Αυτές οι τιμές ήταν στην ίδια τάξη όπως αυτές που αποκτήθηκαν σε συγκρίσεις ανάμεσα στο Βελεστίνο και σε κάθε έναν από τους βόρειους πληθυσμούς.

Τέλος, το τεστ Mantel δεν έδειξε σημαντική συσχέτιση ανάμεσα στη γεωγραφική απόσταση και στον αρχικό αριθμό διαφορών νουκλεοτιδίου του N_{ei} ανάμεσα στους πληθυσμούς ($r = 0,300$, $P = 0,910$) ή στην απόσταση F_{ST} ($r = 0,3280$, $P = 0,893$).

3.3. Δημογραφική ιστορία των πληθυσμών

Το τεστ Tajima (D) για επιλεκτική ουδετερότητα δεν απορρίφθηκε σε όλους τους πληθυσμούς αλλά σε έναν. Ο πληθυσμός από το Βελεστίνο έδειξε μια σημαντική θετική τιμή (2,315). Όταν τα δείγματα συνδυάστηκαν σύμφωνα με το γεωγραφικό πλάτος, δεν παρατηρήθηκε καμία σημαντική απόκλιση από την ουδετερότητα ούτε στη βόρεια ούτε στη νότια ομάδα πληθυσμών (Πίνακας

3). Το μοντέλο ξαφνικής (δημογραφικής) επέκτασης απορρίφθηκε σε τρεις από τους πέντε βόρειους πληθυσμούς καθώς η διανομή του παρατηρημένου αριθμού διαφορών μεταξύ ζευγαριών απλότυπων διέφερε σημαντικά από τη διανομή με το μοντέλο ξαφνικής επέκτασης. Αντίθετα, το μοντέλο δεν θα μπορούσε να απορριφθεί και στους τέσσερις νότιους πληθυσμούς. Όταν τα δείγματα συνδυάστηκαν σε δύο μεγάλες ομάδες, το μοντέλο απορρίφθηκε στη βόρεια αλλά όχι και στη νότια ομάδα. Το μοντέλο χωρικής επέκτασης δεν απορρίφθηκε σε κανέναν από τους εννιά πληθυσμούς που εξετάστηκαν ή όταν τα δείγματα συνδυάστηκαν στη βόρεια και στη νότια ομάδα.

4. Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη είναι η πρώτη προσπάθεια να εξεταστεί η απόκλιση στο mtDNA στο *S. Nonagrioides*, ενός μεγάλου βλαβερού οργανισμού του καλαμποκιού στη Μεσόγειο. Τα αποτελέσματα δεν έδειξαν καμία απόκλιση στο COI, το οποίο έχει αποδειχθεί ενημερωτικό σε μελέτες άλλων Λεπιδοπτέρων ειδών, (Sperling & Hickey, 1994; Vandewostijne et al., 2004), συμπεριλαμβανομένων προνυμφών, για παράδειγμα *Panolis flammea* (Denis & Schiffermiller) (Lowe et al., 2005), *Thaumetopoea pityocampa* (Denis & Schiffermiller) (Salvato et al., 2002). Αντίθετα, σημαντική απόκλιση βρέθηκε στο τμήμα 16S rRNA. Τα γονίδια RNA θεωρήθηκαν ως το πιο αργά αναπτυσσόμενο τμήμα μέσα στο μιτοχονδριακό γονιδίωμα και διατηρούνται μεταξύ των μακρινών ταξινομικών ομάδων των ζώων (Meyer, 1993; Orti et al., 1996). Στην παρούσα μελέτη, βρέθηκαν 28 διαφορετικοί απλότυποι μεταξύ των 180 που εξετάστηκαν. Αυτοί οι απλότυποι διέφεραν ο ένας από τον άλλο για 1-5 μεταλλαξιογόνες αλλαγές (όπως αποκαλύφθηκε από την ανάλυση MSN) υποδηλώνοντας έναν ουσιαστικό βαθμό γενετικής απόκλισης.

4.1. Γεωγραφική δόμηση και διανομή

Ένα ενδιαφέρον εύρημα ήταν το υψηλό επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης και η δυνατή δομή του πληθυσμού. Το φαινογράφημα UPGMA, βασισμένο στις αρχικές διαφορές του N_{ei} , ταξινομήσε τους εννιά πληθυσμούς σε δύο μεγάλες ομάδες σύμφωνα με το γεωγραφικό πλάτος. Η πρώτη ομάδα αποτελείται από τους λιγότερο ποικίλους πληθυσμούς από τα βόρεια γεωγραφικά πλάτη ($<40^{\circ}N$), και η δεύτερη περιέχει αυτούς που χαρακτηρίζονται από υψηλή ενδοπληθυσμιακή ποικιλία που δειγματίστηκαν στο νότο (βλέπε Εικόνα 6). Αυτή η ομαδοποίηση απεικονίζει το διαχωρισμό των απλότυπων mtDNA και τα επίπεδα ενδοπληθυσμιακής ποικιλίας που σχετίζονται με το γεωγραφικό πλάτος παρά με την απομόνωση από την απόσταση. Αποδείξεις που παρέχονται από τον AMOVA, οι οποίες δείχνουν ότι η περισσότερη γενετική διακύμανση (56%), που παρατηρήθηκε στα δεδομένα οφειλόταν στη διαφορά ανάμεσα στις βόρειες και νότιες ομάδες πληθυσμών. Η ζευγαρωτή ανάλυση F_{ST} επιβεβαίωσε επίσης την ουσιαστική γεωγραφική δόμηση αφού σημαντικές και υψηλές τιμές F_{ST} έχουν βρεθεί ανάμεσα στους βόρειους και νότιους πληθυσμούς. Μέσα στη βόρεια ομάδα παρατηρήθηκε μικρή ή καθόλου διαφοροποίηση αν και κάποιοι πληθυσμοί συλλέχθηκαν σε τοποθεσίες ~1800 km ξεχωριστά ο ένας από τον άλλο (π.χ. Αξιούπολη έναντι Τουλούζης). Μεταξύ των τεσσάρων πληθυσμών της νότιας ομάδας, ο ένας που συλλέχθηκε στο νότιο γεωγραφικό πλάτος (δηλαδή Βελεστίνο) φαίνεται να διαφοροποιείται κάπως (σημαντικές και μέτριες τιμές F_{ST}) από αυτούς που συλλέχθηκαν ακόμα πιο νότια στην Κυλλήνη και την Τρίπολη. Είναι ενδιαφέρον ότι το δείγμα από το Βελεστίνο έδειξε παρόμοια ποσότητα γενετικής διαφοροποίησης ανάμεσα στους βόρειους και νότιους πληθυσμούς. Αυτό μπορεί επίσης να φανεί κάπως και στο δέντρο UPGMA.

Η συνολική τιμή F_{ST} που βρέθηκε στην παρούσα μελέτη (0,604) και αυτές στις ζευγαρωτές συγκρίσεις ανάμεσα στους βόρειους και νότιους πληθυσμούς (0,236 – 0,715, Πίνακας 2) είναι μεταξύ των υψηλότερων που αναφέρθηκαν για άλλα είδη προνυμφών με βάση το mtDNA ή την ανάλυση αλλοένζυμου και παρόμοιες με αυτές που βρέθηκαν σε είδη με δυνατή δόμηση πληθυσμού. Ο Salvo και οι συνεργάτες του (2002) βρήκαν μια

συνολική τιμή $F_{ST} = 0,799$ μεταξύ πληθυσμών του δασικού παράσιτου *T. pityocampa* που συλλέχθηκε σε διαφορετικές χώρες από τη Μεσόγειο. Στο *Busseola fusca* Fuller, ένα μεγάλο παράσιτο του καλαμποκιού και του καλλιεργημένου ζαχαρόχορτου, *Sorghum bicolor* (L.) (Poaceae), ο Sezonlin και οι συνεργάτες του (2006) ανέφεραν μια τιμή $F_{CT} 0,708$ μεταξύ τριών μεγάλων βιογεωγραφικών ζωνών στην Αφρική ($F_{CT} = 0,559$ ανάμεσα στη νότια και τη βόρεια ομάδα στη μελέτη μας). Αντίθετα, πολύ μικρότερες τιμές F_{ST} έχουν βρεθεί μεταξύ πληθυσμών προνυμφών του μεταναστευτικού π.χ. *Heliothis virescens* (Fabricious) σε μια χωρική κλίμακα 2000 km (0,002; Schneider, 1999), οι πληθυσμοί *H. armigera* από την Τουρκία και το Ισραήλ (0,004 – 0,020 ανάλογα με τη μέθοδο υπολογισμού, ο Zhou και οι συνεργάτες του (2000), πληθυσμοί *Ostrinia nubilalis* (Hübner) από τον Ατλαντικό και τις μεσοδυτικές περιοχές της Η.Π.Α. (0,024, ο Coates και οι συνεργάτες του, 2004).

Μια προηγούμενη μελέτη (Buès et al., 1996) σε μια ποικιλία αλλοένζυμου στους πληθυσμούς *S.nonagiroides* του Μαρόκου, στους πληθυσμούς της βόρειας Ισπανίας και της νότιας Γαλλίας αναφέρθηκε μια τιμή $F_{ST} = 0,064$. Αυτό πάνω κάτω συμφωνεί με τις τιμές μας που αναφέρθηκαν στις ζευγαρωτές συγκρίσεις ανάμεσα στους πληθυσμούς από την Ισπανία και τη Γαλλία. Η παρούσα μελέτη επίσης επιβεβαιώνει μια προηγούμενη υπόθεση σχετικά με αναπαραγωγική απομόνωση ανάμεσα στους πληθυσμούς της βορειοανατολικής Ισπανίας και της νότιας Ελλάδας (Lopez et al., 2003). Έχει αποδειχθεί ότι οι πληθυσμοί της βορειοανατολικής Ισπανίας και της νότιας Ελλάδας έχουν διαφορές σε ποικίλα οικοφυσιολογικά χαρακτηριστικά, όπως περίοδος προ-αναπαραγωγής, ενήλικη ηλικία στο ζευγάρωμα, το ξεκίνημα της θηλυκής συμπεριφοράς κατά τη διάρκεια της ημέρας (Lopez et al., 2003) και η αντίδραση στις αναλογίες συστατικού φερομόνης (Sans et al., 1997).

Η χαμηλή ικανότητα διανομής, τα γεωγραφικά εμπόδια, ο κατακερματισμός του ενδιαιτήματος και η διαθεσιμότητα ξενιστή θεωρούνταν ως οι υπεύθυνοι παράγοντες για την παρατηρημένη γενετική διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών σε φυτοφάγα έντομα (Morper, 1996). Όλοι αυτοί οι παράγοντες μπορεί να συμβάλλουν στη γεωγραφική δόμηση που παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη. Με βάση τις τιμές F_{ST} ανάμεσα στους βόρειους και νότιους πληθυσμούς, φαίνεται ότι η μακρινή μετανάστευση των

θηλυκών του *S.nonagiroides* ανάμεσα σε αυτές τις δύο ομάδες είναι μάλλον σπάνια. Ο αριθμός μεταναστών που υπολογίστηκε για τέτοια απόσταση είναι κάτω από του ορίου του ενός που θεωρητικά είναι επαρκές για να διατηρηθεί η γενετική ομοιογένεια μεταξύ των πληθυσμών (Wright, 1978). Αξίζει να σημειωθεί ωστόσο, ότι η χαμηλή ικανότητα διασποράς δεν μπορεί να εξηγήσει τη γενετική ομοιότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των περισσότερων πληθυσμών από τα βόρεια γεωγραφικά πλάτη (δηλαδή Αξιούπολη στη Βόρεια Ελλάδα και αυτούς από τη Δυτική Ευρώπη). Η ανάλυση F_{ST} , αν και επαρκής στην επίδειξη γενετικής διαφοροποίησης, έχει αρκετούς περιορισμούς όταν αφορά ρυθμούς μετανάστευσης (Pearse & Crandall, 2004), για παράδειγμα μια πρόσφατη ροή γονιδίου είναι δύσκολο να διαχωριστεί από μια ιστορική (Slatkin & Madson, 1989). Είναι δύσκολο να φανταστούμε πώς γεωγραφικά διαχωρισμένες κυριότητες ανταλλάσσουν μεγάλους αριθμούς τέτοιων μικρής διάρκειας ζωής θηλυκών εντόμων ανά γενιά, ενώ η ανταλλαγή ανάμεσα στην Αξιούπολη και τη Βόρεια Ελλάδα είναι περιορισμένη. Μια παλαιά επέκταση των ειδών από το νότο προς τις βόρειες περιοχές σε μια μακροχρόνια κλίμακα ακολουθούμενη από την επιβίωση γονότυπων ικανών να αντέχουν στο βαρύ χειμώνα φαίνεται να είναι μια λογική εξήγηση. Αυτή η πιθανότητα θα συζητηθεί επιπλέον στο παρακάτω κείμενο.

4.2. Χαμηλότερη ποικιλία mtDNA στο βορρά

Η παρούσα μελέτη αποκαλύπτει επίσης υψηλότερο ενδοπληθυσμιακό πολυμορφισμό στις βόρειες τοποθεσίες σε σύγκριση με τις νότιες. Τα υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού σε έναν πληθυσμό μπορούν να διατηρηθούν αν ο πληθυσμός είναι αρκετά μεγάλος και σταθερός για μια μεγάλη χρονική περίοδο. Αυτό το μοτίβο, δηλαδή η μείωση της γενετικής μεταβλητότητας στο βορρά, παρατηρείται σε ποικίλα Ευρωπαϊκά είδη εντόμων (Schmitt & Seitz, 2002; Cooper et al., 1995; Snäll et al., 2004) και θεωρείται ως συνέπεια των μετά πλειστοκαινικών γεγονότων αποίκησης, στα οποία οι πληθυσμοί που επεκτείνονταν με κατεύθυνση το βορρά αντιμετώπισαν κυκλοφοριακά προβλήματα που οδήγησαν στην απώλεια μεγάλων ποσοτήτων της αρχικής

γενετικής μεταβλητότητας (Avise, 2000). Το τεστ Tajima για ουδετερότητα, ωστόσο, δεν απορρίφθηκε σε κανέναν από τους πέντε βόρειους πληθυσμούς ή όταν εφαρμόστηκε στα συνδυασμένα δεδομένα αυτών των δειγμάτων. Η ερμηνεία μας είναι ότι οι βόρειοι πληθυσμοί μπορεί να μην έχουν βιώσει μια μεγάλη συμφόρηση, αλλά η παρατηρημένη χαμηλή γενετική μεταβλητότητα θα μπορούσε απλά να αντανακλά το αποτέλεσμα του ιδρυτή. Η προοδευτική σε μακροχρόνια κλίμακα επέκταση των ειδών από τις νότιες και λιγότερο διασπασμένες περιοχές προς το βόρειο όριο φαίνεται πιθανή κατά τη διάρκεια της οποίας δημιουργήθηκαν μερικοί γονότυποι με επιλεκτικά προτερήματα (π.χ. ανθεκτικότητα στο βαρύ χειμώνα). Η κατοπρόσάρμοστη ανάλυση διανομής υποδήλωνε μια χωρική επέκταση και των βόρειων και των νότιων πληθυσμών.

Η θεωρία συνασπισμού (Kingman, 1980) προβλέπει ότι η πιθανότητα ένας απλότυπος να είναι ο παλαιότερος και ίσος με τη συχνότητα του στον πληθυσμό δειγματοληψίας. Η αναμενόμενη σειρά απλότυπων με βάση την ηλικία είναι ίση με την σειρά τους με βάση τη συχνότητα. Δύο από τους πιο συχνούς απλότυπους και πιθανότατα των πιο παλαιών έχουν δειγματοποιηθεί και από τις βόρειες και από τις νότιες τοποθεσίες. Αυτό υποστηρίζει κάπως τη θεωρία μας σχετικά με τη διανομή, από τις νότιες προς τις βόρειες περιοχές, συγκεκριμένων γονότυπων στην παλαιότερη ιστορία των ειδών. Εναλλακτικά, η εμφάνιση ευρέως διαδεδομένων απλότυπων θα μπορούσε να δηλώνει κάποια αυξανόμενη ροή γονιδίου ανάμεσα στις τοποθεσίες. Ωστόσο, η περιορισμένη ροή γονιδίου που υπολογίστηκε, η μόνιμη φύση και η μικρή διάρκεια ζωής των ανεπτυγμένων φυτών μαζί με τα πολλά γεωγραφικά εμπόδια ανάμεσα στους βόρειους και νότιους πληθυσμούς ευνοούν την πιθανότητα παλαιάς διανομής συγκεκριμένων απλότυπων προς τα βόρεια σύνορα της περιοχής διανομής των ειδών. Τέλος, η ξαφνική (δημογραφική) επέκταση έχει αποδειχθεί για τη νότια ομάδα συνοδευόμενη από μια θετική τιμή D του Tajima. Έχει υποδηλωθεί ότι οι σημαντικές θετικές τιμές D δηλώνουν είτε εξισορρόπηση επιλογής ή μίξη δύο γενετικά διαφορετικών πληθυσμών (Rand, 1996).

Η υπόθεση συνεπώς ότι το έντομο είναι μόνιμο και ότι η ροή γονιδίου μεταξύ των γεωγραφικά διαχωρισμένων πληθυσμών είναι περιορισμένη (Tsitsipis, 1988; Buès et al., 1996; Albajes et al., 2004) υποστηρίζεται από τα

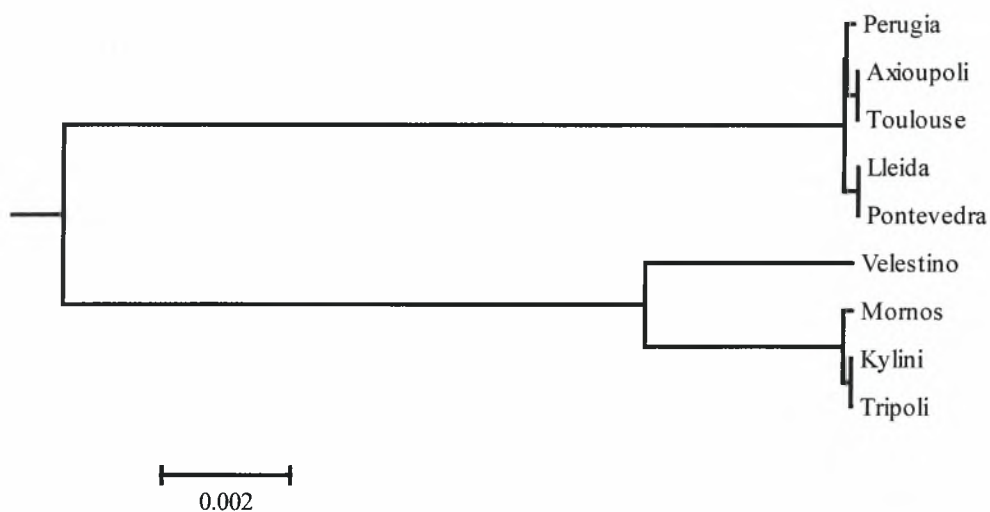
αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Προς αυτήν την κατεύθυνση, αποδείξεις υποστήριξης παρέχονται από το παρατηρημένο μήκος ετεροπλασμίας. Αυτή η ετεροπλασμία διαχωρίζει επαρκώς τους βόρειους από τους νότιους πληθυσμούς. Σε όλους τους οργανισμούς από το βορρά ενισχύθηκε το διαλογικό τμήμα ενώ στους οργανισμούς από το νότο βρέθηκε μόνο στο 19%. Αυτό το ποσοστό απεικονίζει την ύπαρξη τεσσάρων απλότυπων και στις βόρειες και στις νότιες τοποθεσίες.

Αξίζει να σημειωθεί ότι λόγω της μητρικής κληρονομικότητας του mtDNA, η εκτίμηση της ροής του γονιδίου και οι ρυθμοί μετανάστευσης που βασίζονται σε τέτοιους δείκτες μπορεί να μην είναι και πολύ ακριβείς. Σε άλλα είδη προνύμφης, *T. pityocampa* (Salvato et al., 2002), η γενετική ανάλυση του πληθυσμού που βασίζεται και σε μιτοχόνδριους και πυρηνικούς δείκτες υποδήλωνε υψηλότερη αρσενική παρά θηλυκή μετανάστευση. Το ίδιο μπορεί να συμβαίνει και στο *S. nonagrioides*, αφού σε εργαστηριακά πειράματα ο Lopez και οι συνεργάτες του (2003) βρήκαν ότι τα θηλυκά σπάνια μετακομίζουν πριν το ζευγάρωμα. Επιπλέον, χρειάζεται έρευνα που να αφορά τους πυρηνικούς δείκτες για να συγκριθεί η αρσενική και η θηλυκή μετανάστευση. Συμπερασματικά, η παρούσα μελέτη έδειξε μεγάλη γεωγραφική δόμηση στο *S. nonagrioides* με υψηλό επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης κυρίως ανάμεσα στους βόρειους και νότιους πληθυσμούς, και παρείχε αποδείξεις ότι η τωρινή διανομή μακρινής απόστασης είναι μάλλον ένα σπάνιο γεγονός. Από μια συγκεκριμένη άποψη, αυτές οι πληροφορίες δηλώνουν ότι οι ίδιες μέθοδοι ελέγχου δεν μπορούν να είναι πάντα αποτελεσματικές όταν εφαρμόζονται σε γεωγραφικά διαχωρισμένους πληθυσμούς και λόγω της μόνιμης φύσης των ειδών, η ραγδαία εξάπλωση των γονότυπων που είναι ανθεκτικοί σε εντομοκτόνα δεν θα πρέπει να αναμένεται.

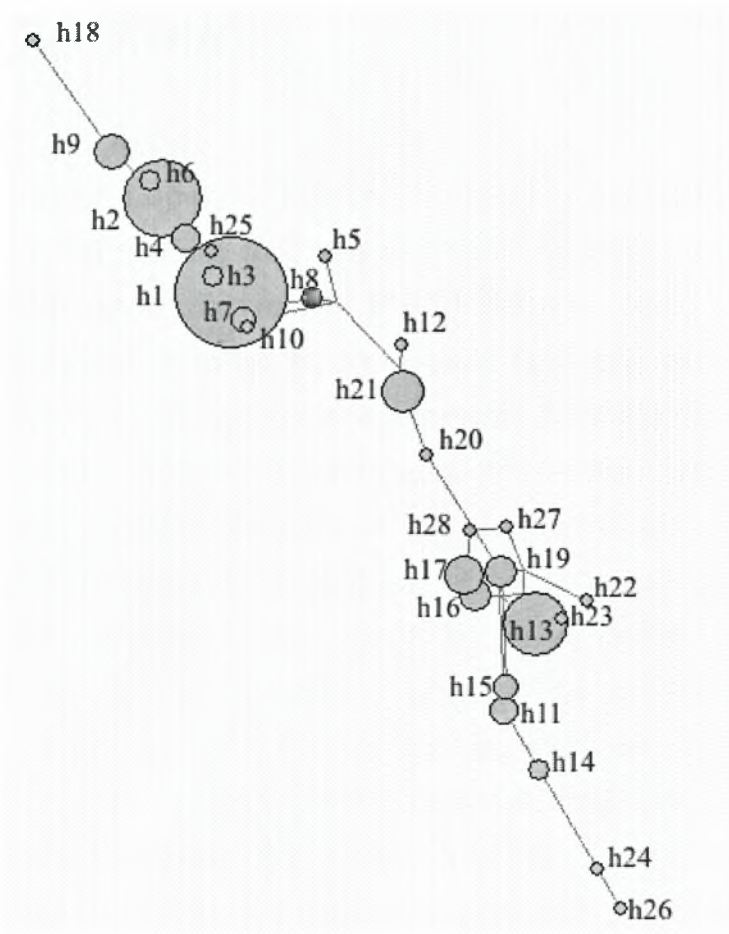
Πίνακας 4. Οι τιμές F_{ST} μεταξύ των τοποθεσιών κάτω από τη διαγώνιο και ο αριθμός θηλυκών ($M = Nm$) που ανταλλάχθηκαν μεταξύ των πληθυσμών ανά παραγωγή επάνω από τη διαγώνιο.

	Toulouse	Perugia	Pontevedra	Lleida	Axioupoli	Velestino	Mornos	Kilini	Tripoli
Toulouse,	-	17.8	22.4	112.4	infinite	1.5	0.3	0.2	0.2
Perugia, IT	0.027 ^{NS}	-	3.8	4.8	17.6	1.5	0.4	0.2	0.2
Pontevedra,	0.022 ^{NS}	0.116*	-	infinite	4.3	1.6	0.4	0.3	0.2
Lleida, SP	0.004 ^{NS}	0.095 ^{NS}	-0.039 ^{NS}	-	5.8	1.5	0.4	0.2	0.2
Axioupoli,	-0.021 ^{NS}	0.028 ^{NS}	0.104*	0.079*	-	1.2	0.3	0.2	0.2
Velestino,	0.251 ^{***}	0.245 ^{***}	0.236 ^{***}	0.251 ^{***}	0.299 ^{***}	-	4.1	1.8	1.6
Mornos, GR	0.579 ^{***}	0.558 ^{***}	0.566 ^{***}	0.586 ^{***}	0.619 ^{***}	0.109 ^{NS}	-	9.0	42.4
Kilini, GR	0.689 ^{***}	0.687 ^{***}	0.666 ^{***}	0.687 ^{***}	0.728 ^{***}	0.222 ^{***}	0.053 ^{NS}	-	10.3
Tripoli, GR	0.707 ^{***}	0.696 ^{***}	0.695 ^{***}	0.715 ^{***}	0.743 ^{***}	0.244 ^{***}	0.012 ^{NS}	0.046 ^{NS}	-

^{NS} όχι στατιστικά σημαντικές διαφορές, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.



Εικόνα 7. UPGMA δένδρογραμμα που συγκεντρώνεται τους εννέα πληθυσμούς *Sesamia nonagrioides* σύμφωνα με τη μήτρα απόστασης του μέσου αριθμού αντικαταστάσεων νουκλεοτίδας ανά περιοχή μεταξύ των πληθυσμών (απόκλιση νουκλεοτίδας). Γενετικές αποστάσεις μεταξύ των πληθυσμών.



Εικόνα 8. Ελάχιστο spanning network των 28 απλότυπων *Sesamia nonagrioides* (h1-h28). Οι διάμετροι της σκίασης των κύκλων είναι ανάλογοι στον αριθμό ατόμων για κάθε από τους απλότυπους. Η απόσταση μεταξύ των απλότυπων είναι ανάλογη προς τον αριθμό μεταλλαγών, η μικρότερη απόσταση είναι μια μεταλλαγή.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albajes R, Eras, J, Lopez, C, Ferran, X, Vigata, J & Eizaguirre, M (2004).** Testing rubidium marking for measuring adult dispersal of the corn borer *Sesamia nonagrioides*: first results. IOBC Bulletin 27: 15-21.
- Albajes R, Konstantopoulou M, Etchepare O, Eizaguirre M, Frerot B, Sans A, Krokos F, Ameline A & Mazomenos B (2002).** Mating disruption of the corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) using sprayable formulations of pheromone. Crop Protection 21: 217–255.
- Allen, R. C. & Budowle, B. (1994).** *Gel Electrophoresis of Proteins and Nucleic Acids: Selected Techniques*. W. de Gruyter, Berlin
- Aris-Brosou, S., and L. Excoffier, (1996).** The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology of Evolution* 13: 494-504.
- Armstrong, K.A. & Wratten, S.D. (1996).** The use of DNA analysis and the polymerase chain reaction in the study of introduced pests in New Zealand. pp. 231–263 in Symondson, W.O.C. & Liddell, J.E. (Eds) *The ecology of agricultural pests: biochemical approaches*, London, Chapman & Hall.
- Anglade, P., (1972).** Les *Sesamia*. Les *Sésamias*. *Entomologie Appliquée à l'Agriculture*, Tome II. *Lepidopteres*, 2eme vol, Masson et Cie, Paris, pp. 1389–1401
- Ansorge, W., Voss, H. & Zimmerman, J. (1997).** *DNA Sequencing Strategies: Automated and Advanced Approaches*, EMBO Practical Course. Wiley, New York.
- Arnason, U., Gullberg, A., Widegren, B., (1991).** The complete nucleotide sequence of the mitochondrial DNA of the fin whale, *Balaenoptera physalus*. *J. Mol. Evol.* 33, 556–568.
- Avise, J.C., Bowen, B.W., Lamb, T., Meylan, A.B & Bermingham, E. (1992).** Mitochondrial DNA evolution at turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the testudines. *Molecular Biology and Evolution* 9:457-473
- Avise, J.C., (1994).** *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, pp. 511

- Avise JC (2000).** Phylogeography. The History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA, pp.447
- Bandelt, H.-J., Foster, P., Sykes, B.C. & Richards, M.B. (1995).** Mitochondrial portraits of human populations. *Genetics* 141, 743-753.
- Beebee, T. C. & Rowe G. (2004).** *An introduction to Molecular Ecology.* Oxford University Press, UK 246 pp.
- Beridze, T. G. (1986)** **Satellite DNA.** Springer-Verlag, New York 149 pp.
- Biju-Duval, C., Ennafaa, H., Dennebouy, N., Monnerot, M., Mignotte, F., Soriguer, R.C., El Gaaied, A., El Hili, A., Mounolou, J.-C., (1991).** Mitochondrial DNA evolution in lagomorphs: origin of systematic heteroplasmy and organization of diversity in European rabbits. *Journal of Molecular Evolution* 33, 92–102
- Buès, R., Eizaguirre, M., Toubon, J.F. & Albages, R. (1996).** Différences enzymatiques et écophysiologicals entre populations de *Sesamia nonagrioides* Lefèvre (Lépidoptère: Noctuidae) originaires de L'ouest du bassin Méditerranéen. *The Canadian Entomologist* 128, 849-858.
- Casane, D., Dennebouy, N., De Rochambeau, H., Mounolou, J.C., Monnerot, M., (1997).** Nonneutral evolution of tandem repeats in the mitochondrial DNA control region of lagomorphs. *Molecular Biology and Evolution* 14, 779–789
- Coates BS, Sumerford DV, and Hellmich RL. (2004).** Geographic and voltinism differentiation among North American *Ostrinia nubilalis* (European corn borer) mitochondrial cytochrome c oxidase haplotypes. 9pp. *Journal of Insect Science*, 4:35, Available online: insectscience.org/4.35
- Cooper S.J.B., Ibrahim K.M. & Hewitt G.M. (1995).** Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular. Ecology.* 4: 49–60.
- Downie, D.A. (2002).** Locating the sources of an invasive pest, grape phylloxera, using a mitochondrial DNA gene genealogy. *Molecular Ecology* 11: 2013-2026.
- Eizaguirre, M., Lopez, C. & Albajes, R. (2004).** Dispersal capacity in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 113: 25–34.

- Excoffier L. (2004).** Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13(4): 853-864.
- Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider (2005).** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992).** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491.
- Felsenstein, J. (1993).** PHYLIP: (phylogeny inference package) version 3.5c. Seattle: University of Washington.
- Figuera, C. C., Simon, J. C., Gallic, L. C & Niemeyer, H. M. (1999).** Molecular markers to differentiate two morphologically close species of the genus *Sitobion*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 92, 217–225
- Foster, S.P, Harrington, R., Dewar, A.M, Denholm, I. and Devonshire, A. L (2002).** Temporal and spatial dynamics of insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Pest Management Science* 58:895–907.
- Galichet, P.F., (1982).** Hibernation d'une population de *Sesamia nonagrioides* Lef. (Lep.: Noctuidae) en France meridionale. *Agronomie* 2, pp. 561–566.
- Gasparich, G.E., Silva, J.G., Han, H.Y., McPheron, B.A., Steck, G.J. & Sheppard, W.S. (1997).** Population genetic structure of Mediterranean fruit fly (Diptera: Tephritidae) and implications for worldwide colonisation patterns. *Annals of the Entomological Society of America* 90, 790–797.
- Goudet J, (1995).** FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*. 86: 485-486.
- Goudet, J. (2001).** FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995)
- Griffiths, A.J.F., Miller, J.H., Suzuki, D.T., R.C.& Gelbart, W.M. (2002).** An Introduction to Genetic Analysis, 7th Edition, W.H. Freeman and Company, New York, pp. 626-627.
- Gutierrez C, Castanera P., & Torres CP (1986).** Wound induced changes in DIMBOA (2,4-dihydroxy-7-methoxy-2H-1,4-benzoxazin-3(4H)-one)

- concentration in maize plants caused by *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Applied Biology* 113: 447–454.
- Hale, L.H. & Singh, R.s. (1991).** A comprehensive study of genic variation in natural populations of *Drosophila melanogaster*. IV. Mitochondrial DNA variation and the role of history vs. selection in the genetic structure of geographic populations. *Genetics* 129, 103-117.
- Heimpel, G.E., Antolin, M.F., Franqui, R.A. & Strand, M.R. (1997).** Reproductive isolation and genetic variation between two 'Strains' of *Bracon hebetor* (Hymenoptera: Braconidae). *Biological Control* 9, 149–156.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993).** Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026–1030.
- Larue P (1984).** La Sesamie du maïs (*Sesamia nonagrioides* Lef.). Degats et actualisation de lutte. *Defense Vegetaux* 227: 163-181.
- Lodos, N., (1981).** Maize pests and their importance in Turkey. *EPPO Bull.* 11, pp. 87-89.
- Lowe, A.J., Hicks, B.J., Worley, K., Ennos, R.A., Morman, J.D., Stone, G. & Watt, A.D. (2005).** Genetic differentiation in Scottish populations of the pine beauty moth, *Panolis flammea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bulletin of Entomological Research* 95, 517-526
- Loxdale, H.D. & Lushai, G. (1998).** Molecular markers in entomology. *Bulletin of Entomological Research* 88, 577-600.
- López C, Eizaguirre M & Albajes R (2003).** Courtship and mating behaviour of the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Spanish Journal of Agricultural Research* 1: 43–51.
- Martel, C, Réjasse, A. Rousset, F., Bethenod, M-T and Bourguet, D (2003).** Host-plant-associated genetic differentiation Northern French populations of the European borer. *Heredity* 90, 141-149
- Mopper S (1996).** Adaptive genetic structure in phytophagous insect populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 11, 235-238.
- Margaritopoulos, J.T., Bacandritsos, N., Pekas, A.N. Stamatis, C., Mamuris, Z. & Tsitsipis, J.A. (2003).** Genetic variation of *Marchalina*

- hellenica* (Hemiptera: Margarodidae) sampled from different hosts and localities in Greece. *Bulletin of Entomological Research* 93, 447–453.
- McPherson, M.J. & Moller, S.G. (2000).** *PCR the basics from background to bench*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Meagher, J.R., R.L. & Gallo-Meagher, M. (2003).** Identifying host strains of fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) in Florida using mitochondrial markers. *Florida Entomologist* 86 450-455
- Melamed-Madjar, V. and Tam, S., (1980).** A field survey of changes in the composition of corn borer population in Israel. *Phytoparasitica* 8, pp. 201–204.
- Meyer A. (1993).** Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, Vol. 2 (Eds P.W. Mochachka, & T.P. Mommsen), pp. 1-38. Elsevier, Amsterdam.
- Moritz, C., (1994).** Defining ‘evolutionary significant units’ for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 363–373.
- Mullis, K.B., Falloona, F.A (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* 155: 335-350.
- Nei M (1978).** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Nucifora, A., (1966).** Appunti sulla biologia di *Sesamia nonagrioides* (Lef.) in Sicilia. *Tec. Agr.* 18, pp. 395–419.
- Nibouche, S., Bues, R., Toubon, J. F. & Poitout, S. (1998).** Allozyme polymorphism in the cotton bollworm *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae): comparison of African and European populations. *Heredity*, 80, 438±445.
- Orti G., Petry P., Porto J.I.R., Jegu M. & Meyer A. (1996).** Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of Piranhas. *Journal of Molecular Evolution*, 42, 169-182.
- Palumbi, S.R., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L. & Grabowski, G., (1991).** The simple tool’s guide to PCR. Department of Zoology, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- Pearse, D.E. & Crandall, K.A. (2004).** Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation *Conservation Genetics* 5: 585–602.

- Peterson MA, Denno RF (1998).** Life history strategies and the genetic structure of phytophagous insect populations. In: Genetic Structure and Local Adaptation in Natural Insect Populations (eds Mopper S, Strauss SY), pp. 263-322. Chapman & Hall, New York.
- Powers, T.O., Jensen, S.G., Kindler, S.D., Stryker, C.J. & Sandall, L.J. (1989).** Mitochondrial divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Annals of the Entomological Society of America* 82, 298–302.
- Rand, D.M. (1996).** Neutrality tests of molecular markers and the connection between DNA polymorphism, demography, and conservation biology. *Conservation Biology* 10: 665–671.
- Ray N, Currat M, Excoffier L. (2003).** Intra-Deme Molecular Diversity in Spatially Expanding Populations. *Molecular Biology of Evolution* 20: 76-86.
- Roderick GK (1996).** Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41, 325-352.
- Rogers, A. R., and H. Harpending, (1992).** Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology Evolution*, 9: 552-569.
- Rogers, A., (1995).** Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 608-615.
- Salvato, P. Battisti, A. Concato, S. Masutti, L. Patarnello, T. & Lorenzo, Z. (2006).** Genetic differentiation in the winter pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa - wilkinsoni* complex), inferred by AFLP and mitochondrial DNA markers. *Molecular Ecology*, 11, 2435-2444.
- Sans, A., Riba, M., Eizaguirre, M., and López, C. (1997).** Electroantennogram, wind tunnel and field response of male Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, to several blends of its sex pheromone components. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 82:121–127.
- Schneider JC (1999).** Dispersal of a highly vagile insect in a heterogeneous environment. *Ecology*, 80, 2740-2749.
- Schneider, S., and Excoffier, L. (1999).** Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152:1079-1089.

- Scott, K.D., Wilkinson, K.S., Merritt, M.A., Scott, L.J., Lange, C.L., Schutze, M.K., Kent, J.K., Merritt, D.J., Grundy, P.R. and G.C. Gracham (2003).** Genetic shifts in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) over a year in the Dawson/Callide Valleys. *Australian Journal of Agricultural Research*, 54, 739-744.
- Sezonlin, M., Dupas, S., Le Ru, B., Le Gall, P., Moyal, P., Calatayud, P.-A., Giffard, I., Faure, N & Silvain, J.-F. (2006).** Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Molecular Ecology*, 15, 407–420
- Slatkin M, Maddison WP (1989).** A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics*, 123, 603-613.
- Schmitt T. & Seitz A. (2002).** Postglacial distribution area expansion of *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae) from its Ponto-Mediterranean glacial refugium. *Heredity* 89: 20–26.
- Snäll N., Huoponen, k. Saloniemi, I. Savontaus, M.-L. & Ruohomäki, K. (2004).** Dispersal of females and differentiation between populations of *Epirrita autumnata* (Lepidoptera: Geometridae) inferred from variation in mitochondrial DNA.
- Sperling, F.A.H. & Hickey, D.A. (1994).** Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (Choristoneutra: Lepidoptera). *Molecular Biology and Evolution* 11, 656-665.
- Slatkin, M. & Maddison, W.P. (1989).** A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles. *Genetics* 123: 603-613.
- Slatkin, M. and R. R. Hudson (1991).** Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129, 555-562.
- Stayrakis, G.N., (1967).** Contributions a l'étude des especes nuisibles au mais en Grece du genre *Sesamia* [Lepidoptera-Noctuidae]. *Annals Institute Phytopathology Benaki* 8, pp. 20-23.
- Tajima, F. (1983).** Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- Tajima, F. (1989).** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595,.

- Tajima, F. (1993).** Measurement of DNA polymorphism. In: Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology, edited by Takahata, N. and Clark, A.G., Tokyo, Sunderland, MA:Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc., p. 37-59.
- Tajima, F., (1996).** The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites. *Genetics* 143: 1457-1465.
- Taylor, D.B., Peterson, R.D. (II), Szalanki, A.L. & Petersen, J.J. (1997).** Mitochondrial DNA variation among *Muscidifurax* spp. (Hymenoptera: Pteromalidae), pupal parasitoids of filth flies (Diptera). *Annals of the Entomological Society of America* 90, 814-824.
- Τζανακάκης Μ. Ε. (1980).** Μαθήματα Εφαρμοσμένης Εντομολογίας. 2. Ειδικό μέρος. Έκδοση: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη.
- Tsitsipis, (1988).** The corn stalk borer *Sesamia nonagrioides*: forecasting, crop-loss assessment and pest management, pp. 171-177. In R. Cavalloro, and K.D. Sunderland (eds.), integrated Crop Protection in Cereals. Balkema, Rotterdam.
- Vandewoestijne, S., Baguette, M., Brakefield, P.M. & Saccherib, I.J.** Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31 630–646.
- Wolstenholme, D.R. (1992).** Animal mitochondrial DNA: structure and evolution *International Review of Cytology* 141:173-216.
- Wickner, R. B. (1974).** *DNA Replication Methods in Molecular Biology*. Volume 7. Dekker, New York.
- Wilson, A.C., Can, R.L., Carr, S.M., George, M., Gyllensten, U.B., Helm-Bychowski, K.M., Higuchi, R.G., Palumbi, S.R., Prager, E.M., Sage, R.D., Stoneking, M., (1985).** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal Linnaeus Society*. 26, 375-400.
- Wong, M. L. & Medrano, J. F. (2005).** Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 39, 75-85.

Wright S (1978). Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.

Χατζόπουλος, Π. (2001). Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.

Zhou, X.F., Faktor, O., Applebaum, S.W. & Moshe, C. (2000). Population structure of the pestiferous moth *Helicoverpa armigera* in the Eastern Mediterranean using RAPD analysis. *Heredity* 85, 251±256

Zitoudi, K., Margaritopoulos, J. T., Mamuris, Z. & Tsitsipis, J. A. (2001). Genetic variation in *Myzus persicae* populations associated with host-plant and life cycle category. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 99, 303–311.

8. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA (RFLP)

- ✓ Ομογενοποίηση σε σωλήνα erpendorf ενός ατόμου σε 300λ extraction buffer.
- ✓ Προσθήκη 150λ οξικού νατρίου NaOC 3M pH 5.2 και τοποθέτησή του σωλήνα στους -20°C για 10 λεπτά.
- ✓ Φυγοκέντρηση στις 13800 rpm στους 4°C για 5 λεπτά και μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο σωλήνα.
- ✓ Προσθήκη 1 ml φαινόλης και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13800 rpm και στους 4 °C (μικρή ανάδευση).
- ✓ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο περιέκτη, προσθήκη 1 ml φαινόλης-χλωροφόρμιο ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και φυγοκέντρηση στις 13800 rpm και στους 4°C (μικρή ανάδευση).
- ✓ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο περιέκτη, προσθήκη 1 ml χλωροφόρμιο ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και φυγοκέντρηση στις 13800 rpm και στους 4 °C (μικρή ανάδευση).
- ✓ Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο περιέκτη, προσθήκη παγωμένης αιθανόλης και τοποθέτηση στους -23°C για όλη τη διάρκεια της νύχτας (overnight).
- ✓ Φυγοκέντρηση του ιζήματος DNA για 20 λεπτά, απομάκρυνση της αλκοόλης και ξέπλυμα με 70% αιθανόλη.
- ✓ Στέγνωμα στους 37°C για 10-15 λεπτά και προσθήκη 100λ ddH₂O.

ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA ΜΕ K⁺ ΠΡΩΤΕΪΝΑΣΗ

Extraction buffer (K⁺ proteinase)	
	<u>100 ml</u>
Tris-Hcl, pH 8.5 2M	2 ml
EDTA 0.5 M	2 ml
NaCl 5 M	4 ml
H ₂ O	92 ml

Digestion buffer (K⁺ proteinase)		
	<u>20 ml</u>	<u>2 ml</u>
Extraction buffer	18 ml	1.8 ml
SDS 10%	2 ml	0,2 ml
Proteinase K ⁺ (100 mg/ml)	100 λ	10 λ

(Το digestion buffer παρασκευάζεται κάθε φορά που κάνουμε απομόνωση.)

Απομόνωση DNA με χρήση K⁺ proteinase

- 300λ digestion buffer (το έντομο να λιωθεί λίγο πριν την προσθήκη των 300λ digestion)
- Υδατόλουτρο για 2hr στους 37° C (ανάδευση ανά μισή ώρα)
- Προσθήκη 150λ (100 στις αφίδες) NaOC 3M pH 5.2 και τοποθέτηση στους -20°C για 10min.
- Φυγοκέντρηση σε 13000 rpm (σε 4°C) για 5 min και μεταφορά υπερκείμενου σε νέο περιέκτη. Προσθήκη 1ml φαινόλη (vortex), φυγόκεντρο για 15 min.
- Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο περιέκτη. Προσθήκη φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμλική 1ml (vortex), φυγόκεντρο για 5 min.
- Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο περιέκτη. Προσθήκη χλωροφόρμιο/ισοαμλική (24:1) 1 ml (vortex), φυγόκεντρο για 5 min.

- Μεταφορά υπερκείμενου σε νέο περιέκτη. Προσθήκη 1ml ισοπροπανόλη (ανάδευση με το χέρι), παραμονή σε θερμοκρασία δωματίου για 20 min. Φυγοκέντρωση για 15 min.
- Απομάκρυνση ισοπροπανόλης και προσθήκη 1ml αιθανόλης 70%, μικρή ανάδευση με το χέρι. Φυγόκεντρο για 5 min.
- Απομάκρυνση αιθανόλης στέγνωμα για 15 min στους 37 ° C.

Πιο αναλυτικά η απομόνωση γίνεται ως εξής:

- Το έντομο λιώνεται ελαφρά. Στη συνέχεια προσθέτουμε 300λ digestion buffer και λειοτριβούμε σχολαστικά. Τοποθετούμε τα δείγματα στο υδατόλουτρο για 2 ώρες στους 37° C, αναδεύοντας ανά μισή ώρα.
- Προσθέτουμε 100λ οξικό Na και τοποθετούμε τα δείγματα στους – 20° C για 15-20 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο περιέκτη και προσθήκη 1 ml φαινόλης (vortex). Φυγόκεντρο για 20 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο περιέκτη και προσθήκη 1ml φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλική (vortex). Φυγόκεντρο για 5 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο περιέκτη και προσθήκη 1ml χλωροφόρμιο:ισοαμυλική (vortex). Φυγόκεντρο για 5 λεπτά.
- Μεταφορά του υπερκείμενου σε νέο περιέκτη και προσθήκη 1ml ισοπροπανόλης (ανάδευση με το χέρι), 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και φυγόκεντρο για 20 λεπτά.
- Αδειάζουμε προσεκτικά το περιεχόμενο ώστε να παραμείνει το ίζημα και προσθέτουμε 1 ml αλκοόλη 70%. Φυγοκεντρούμε για 5 λεπτά.
- Αδειάζουμε προσεκτικά το περιεχόμενο ώστε να παραμείνει το ίζημα και στεγνώνουμε τα δείγματα για 15 λεπτά στους 37° C. Στη συνέχεια προσθέτουμε 100λ ενέσιμο H₂O σε κάθε δείγμα και τα τοποθετούμε στο ψυγείο (8° C).

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης

Μητρικό διάλυμα πολυακρυλαμίδης 30%: 29 gr ακρυλαμίδης + 1 gr bis-acrilamide διαλύονται σε 60 ml ddH₂O και στη συνέχεια διηθούνται και συμπληρώνονται με ddH₂O έως τα 100 ml. Το διάλυμα διατηρείται στους 4° C.

Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%	
25 ml	50 ml
3,2 gr ουρίας	6,4 gr ουρίας
6,65 ml μητρικού διαλ/τος πολ/μίδης	13,3 ml μητρικού διαλ/τος πολ/μίδης
1,65 ml TBE 20X	3,3 ml TBE 20X

Το διάλυμα διηθείται και συμπληρώνεται με ddH₂O έως τα 25 ή τα 50 ml αντιστοίχως.

Για να αρχίσει ο πολυμερισμός της ακρυλαμίδης, στο παραπάνω διάλυμα προσθέτουμε (για 25 ή για 50 ml):

25 ml	50 ml
33,3 μl TEMED	66.6 μl TEMED
200 μl διαλύματος APS 20%	400 μl διαλύματος APS 20%

Αμέσως μετά το διάλυμα χύνεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται η χτένα δημιουργίας πηγαδιών.

Silver staining (Βαφή gel πολυακρυλαμίδης)

Διάλυμα 1: Σε 72 ml ddH₂O προσθέτουμε 8 ml αιθανόλη και 10λ οξικό οξύ.

Τελικός όγκος 400 ml.

Διάλυμα I (400ml)	
H ₂ O	72ml
Ethanol	8ml
Οξικό οξύ	10λ

Προσθέτουμε νερό μέχρι να συμπληρωθούν τα 400 ml. Κατόπιν, εκτελούμε 2 πλύσεις με 200 ml για 3 min στην κάθε μία.

Διάλυμα 2: AgNO₃, 1 gr/lit

V = 200 ml στο shaker για 10 λεπτά.

Ξεπλένουμε 2 φορές με dd H₂O. Κάθε φορά για 2 λεπτά (shaker).

Διάλυμα 3: 3 gr NaOH

0.01 gr NaBH₄ V_{τελ.} = 200 ml και για 15-20 λεπτά στο shaker

0.8 ml HCHO

Διάλυμα III (200 ml)	
NaOH	3 g
HCHO	0,8 ml
NaBH ₄	0,01 g

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Extraction buffer (Διατήρηση στο ψυγείο)				
Διάλυμα	10 ml	20 ml	50 ml	100 ml
NaCl 5M (MB=58.44)(ml)	0,4			4
EDTA 0.5M (ml)	0,2			2
Tris-HCl 2M PH 8.5 (ml)	0,2			2
H ₂ O (ml)	9,2			92

EDTA 0.5M PH 8.0			
Διάλυμα	50 ml	100 ml	800 ml
EDTA (gr)	11,63	23,26	186,1
NaOH (gr)	1,25 +	2,5 +	20,0 +
H ₂ O (ml)	50	100	800

Tris-HCl 2M PH 8.5			
Διάλυμα	50 ml	100 ml	1000 ml
H ₂ O (ml)	42,5	85	850
Tris (gr)	12,11	24,22	242.2
HCl (ml)	3,25	7,5	75
H ₂ O (ml)	3,25	7,5	75

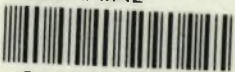
NaCl (MB=58.44) 5 M			
Διάλυμα	50 ml	100 ml	1000 ml
NaCl (gr)	2,922	5,844	58,44
H ₂ O (ml)	50	100	1000

Digestion buffer (ψυγείο, fresh)			
Διάλυμα	5 ml	10 ml	20 ml
Extraction buffer (ml)	4,5	9	18
SDS 10% (ml)	0,5	1	2
Proteinase K (100 mg/ml) λ	25	50	100

Οξικό Na (Sodium acetate NaOAc) 3M, PH 5,2		
Διάλυμα	50 ml	100 ml
NAOAc (gr)	20,4	40,8
H ₂ O (ml)	45	90
H ₂ O (ml)	5+	10+



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000085687