



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΡΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Αριθμ. Πρωτοκ. 135

Ημερομηνία 13-10-2006

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ
ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών
της αφίδας *Myzus persicae* (Hemiptera:Aphididae)
με μοριακές μεθόδους



ΜΑΡΙΑ Ι. ΚΑΛΛΕΡΓΗ

Βόλος, 2006



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

Αριθ. Εισ.: 5761/1
Ημερ. Εισ.: 29-08-2007
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΦΠΑΠ
2006
ΚΑΛ

**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ
ΤΗΣ ΑΦΙΔΑΣ *MYZUS PERSICAE* (HEMIPTERA: APHIDIDAE)
ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ**

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

- | | |
|-----------------------------|--|
| Ι. Τσιτσιπής
(Επιβλέπων) | Καθηγητής
Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας |
| Ν. Παπαδόπουλος
(Μέλος) | Επίκουρος καθηγητής
Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου
Θεσσαλίας |
| Ι. Γούναρης
(Μέλος) | Αν. καθηγητής
Μοριακής Βιολογίας Γεωπονικού Τμήματος του
Πανεπιστημίου Θεσσαλίας |

Ευχαριστίες

Με το πέρας της πτυχιακής διατριβής μου θα ήθελα να ευχαριστήσω αυτούς που με βοήθησαν και με στηριξαν σε αυτή μου την προσπάθεια.

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Ιωάννη Αθ. Τσιτσιπή Καθηγητή Εντομολογίας του Τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τη πολύτιμη βοήθεια του σε όλα τα στάδια της διατριβής. Πάνω από όλα όμως θέλω να τον ευχαριστήσω γιατί ήταν εκείνος που μου κίνησε το ενδιαφέρον για την επιστήμη της Εντομολογίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον κ. Ν. Παπαδόπουλο, επίκουρο καθηγητή Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας και κ. Ι. Γούναρη Αν. καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Γεωπονικού Τμήματος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για τις πολύτιμες διορθώσεις και συμβουλές τους, όσον αφορά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής καθώς και για τη συμβολή τους στην απόκτηση βασικών γνώσεων σε θέματα Εντομολογίας και Μοριακής Βιολογίας.

Ευχαριστίες εκφράζονται στο Διδάκτορα του Εργαστηρίου Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ιωάννη Μαργαριτόπουλο για την βοήθεια του κατά τη διεκπεραίωση του πειράματος. Ευχαριστίες εκφράζονται στον υποψήφιο Διδάκτορα του Εργαστηρίου Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Κωνσταντίνο Ζάρπα για την βοήθειά του στη κατανόηση τεχνικών και οργάνων.

Ευχαριστώ ιδιαίτερα την μεταπτυχιακή φοιτήτρια Μαρίτσα Αικατερίνη με την οποία συνεργαστήκαμε καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος και για τη βοήθειά της στη κατανόηση των μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν. Ευχαριστίες εκφράζονται και στον υποψήφιο Διδάκτορα του Εργαστηρίου Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Παναγιώτη Σκούρα για τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος καθώς και για τη βοήθειά του κατά τη συγγραφή της διατριβής.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου για την αμέριστη ηθική και υλική συμπαράσταση κατά τη διάρκεια των σπουδών καθώς και τους στενούς μου φίλους για τη κατανόηση και τη συμπαράστασή τους όλο αυτό το διάστημα.

Μαρία Καλλέργη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
ABSTRACT	8
α. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	10
1. Αφίδες.....	11
1.1 Γενικά	11
1.2 Ζημιά	15
1.3 Βιολογικός κύκλος των αφίδων.....	16
1.4 Αφίδες και ανθεκτικότητα	21
2. Γενετική παραλλακτικότητα.....	22
3. Μέθοδοι μελέτης γενετικής παραλλακτικότητας	25
3.1 Γενικά	25
3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR).26	
3.3 Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)	28
3.4 Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP).....	29
4 Μικροδορυφόροι (Microsatellites).....	30
4.1 Γενικά	30
4.2 Οι μικροδορυφόροι ως γενετική μέθοδο	34
4.2.1 Πλεονεκτήματα.....	36
4.2.2 Μειονεκτήματα.....	37
4.3 Σχετικές μελέτες	39
5 <i>Myzus persicae</i> (Sulzer).....	41
5.1 <i>Myzus nicotianae</i> Blackman.....	45
β. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	46
1. Εισαγωγή	47
2. Σκοπός μελέτης.....	49
3. Υλικά και μέθοδοι	50
3.1 Δειγματοληψίες αφίδων.....	50
3.2 Έλεγχος βιολογικού κύκλου	50
3.3 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA	52
4. Στατιστική ανάλυση	56
4.1 Συχνότητες αλληλομόρφων, ισορροπία Hardy-Weinberg και ανισορροπία σύνδεσης.....	56
4.2 Ανάλυση μεταξύ των πληθυσμών	57
4.3 Ανάλυση γενετικής απόστασης	57
5. Αποτελέσματα	58
5.1 Βιολογικός κύκλος.....	58
5.2 Ανάλυση μικροδορυφόρων	60
6. Συζήτηση	67
6.1 Κατηγορία βιολογικού κύκλου.....	67
6.2 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA	68
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) είναι ένα εξαιρετικά πολυφάγο είδος και σοβαρός εχθρός πολλών καλλιεργειών παγκοσμίως. Δυο χαρακτηριστικά της βιο-οικολογίας του, που παρουσιάζουν ενδιαφέρον, είναι η παραλλακτικότητα στο βιολογικό κύκλο και η προσαρμογή σε συγκεκριμένους ξενιστές. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το υποείδος *M. persicae nicotianae* Blackman που τρέφεται στον καπνό. Επίσης, η αντιμετώπισή της είναι δύσκολη λόγω της ανάπτυξης μηχανισμών ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές ομάδες.

Στη παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο βιολογικός κύκλος της αφίδας *Myzus persicae* καθώς και η γενετική της παραλλακτικότητα με τη χρήση μοριακών δεικτών (μικροδορυφόροι) Στο γενικό μέρος της διατριβής παρουσιάζονται θεωρητικά στοιχεία που εξηγούν το βιολογικό κύκλο των αφίδων και συγκεκριμένα της αφίδας *Myzus persicae*. Επίσης, αναλύονται βασικές αρχές γενετικής και μοριακής βιολογίας σε συνδυασμό με τις μεθόδους που χρησιμοποιούνται σε μελέτες γενετικής ανάλυσης.

Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η στρατηγική αναπαραγωγής 199 κλωνικών σειρών της αφίδας από καπνό και ροδακινιά από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και από μια περιοχή στη Νότια Αφρική (Ζιμπάμπουε). Με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών (*myz2*, *myz25*, *M35*) αναλύθηκαν 137 κλωνικές σειρές από τις παραπάνω περιοχές καθώς και από τη Σερβία.

Το πλείστο (77 - 82 %) των κλωνικών σειρών που συλλέχθηκαν από ροδακινιά ήταν ολοκυκλικοί. Υψηλό ποσοστό (57,4 %) βρέθηκε και στον πληθυσμό που συλλέχθηκε στη Β. Ελλάδα από καπνό πλησίον φυτειών της ροδακινιάς. Αντίθετα, στη Κεντρική και Νότια Ελλάδα και τη Ζιμπάμπουε το ποσοστό ήταν χαμηλό (0 - 12,5 %). Επίσης, στην Ελλάδα η γεωγραφική κατανομή των ολοκυκλικών γενοτύπων ήταν παράλληλη με αυτή των κλώνων πράσινου χρώματος.

Η γενετική ανάλυση με το μικροδορυφορικό DNA έδειξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ 7 πληθυσμών που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, οι δυο πληθυσμοί από τη Σερβία και ο ένας από τη Ζιμπάμπουε διαχωρίστηκαν από αυτούς που συλλέχθηκαν στην Ελλάδα. Βρέθηκαν ενδείξεις διαφοροποίησης μεταξύ

πληθυσμών που συλλέχθηκαν από περιοχές που καλλιεργείται και από αυτές που δεν καλλιεργείται καπνός. Επίσης, διαπιστώθηκε πρόσφατη δημιουργία γενοτύπων που έχουν χάσει μερικώς (ενδιάμεσοι, ανδροκυκλικοί) ή ολικώς την ικανότητα σεξουαλικής αναπαραγωγής (ανολοκυκλικοί).

Συνοψίζοντας, η παρούσα εργασία έδειξε ότι το *M. persicae* παρουσιάζει σημαντική ενδοειδική γενετική παραλλακτικότητα που εν μέρει σχετίζεται με βιολογικά χαρακτηριστικά όπως η στρατηγική αναπαραγωγής, η προσαρμογή σε συγκεκριμένους ξενιστές αλλά και με τους διαφορετικούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα. Από την πλευρά της φυτοπροστασίας, είναι ανησυχητικό το γεγονός της ευρείας εξάπλωσης γονιδίων ανθεκτικότητας.

ABSTRACT

The peach potato aphid *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae) is a world wide common pest. Two interesting features of *M. persicae* bio-ecology are the life cycle category variation and the adaptation in specific host plants. The tobacco feeding populations exhibit consistently genetic and morphological differentiation compared to those feeding on other secondary crops. Recently, the subspecific status has been proposed for the tobacco feeding populations, i.e. *M. persicae nicotianae* (Blackman). Worldwide the control of this major aphid pest has been based mainly on insecticides belonging to different chemical classes (i.e., organophosphates, carbamates, pyrethroids and neonicotinoids). As an adaptive response the aphid has evolved a variety of insecticide resistance mechanisms, which have reduced substantially the ability for chemical control.

In the present study I examine the life cycle category variation among *M. persicae* populations and their genetic diversity using microsatellite DNA markers. In the first part of the present thesis, some theoretical reviews are presented related to the lifecycle strategies of aphids along with information on population genetics and molecular biology methods that are commonly used in such kind of studies. In the second part of the thesis I present the materials and methods used for the examination of 1) life cycle category, 2) genetic variation, and 3) evolution of insecticide resistance mechanisms. The results and the discussion sections are also presented.

In particular, the mode of reproduction was examined in 199 *M. persicae* clones collected from peach and tobacco in different regions of Greece (north, central, eastern central) and in one region of South Africa (Zimbabwe). One hundred thirty seven clones were analysed using three microsatellite loci (myz2, myz25, M35). The clones we used three specific primers in 137 clones were collected from the aforementioned regions and also from two localities from Serbia.

Most of the clonal lineages (77 - 82 %) from peach were holocyclic (i.e., they have a sexual phase in autumn). A high percentage (57,4 %) of holocyclic lineages was observed in the population from tobacco in North Greece, which is the main peach-growing region of Greece. By contrast, low percentage of holocyclic clones

was observed in Central and South Greece and in Zimbabwe (0 –13 %). In Greece the geographical distribution of holocyclic genotypes was parrallel to that of the green coloured clonal lineages.

Microsatellite DNA analysis revealed important genetic differentiation among the 7 populations of *M. persicae* examined. According to F_{ST} and phylogenetic tree analysis the two populations from Serbia and one from Zimbabwe were separated from those collected in Greece. Important differentiation was also observed among populations from tobacco- and non-tobacco-growing regions. The analysis also denotes a recent loss of sexuality (totally or partially) in the non-holocyclic clones examined

In summury, the present study revealed significant interspecific genetic variation in *M. persicae*. This variation could be partially attributed to differences in several biological characteristics among populations and the mode of reproduction, adaption in specific hosts

A.ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΑΦΙΔΕΣ

1.1 Γενικά

Οι αφίδες είναι πού γνωστά έντομα στον αγρότη και στο μέσο άνθρωπο, με τα κοινά ονόματα μελίγκρες, ψύλλοι, ψείρες, φυτοφθείρες, μέλερη. Ανήκουν στην υπεροικογένεια Aphidoidea στη σειρά Sternorrhyncha της τάξης Hemiptera.

Τα πάνω από 3.600 είδη των Aphidoidea, σύμφωνα με τους Remaudière & Stroyan (1984) ταξινομούνται σε τρεις οικογένειες: Adelgidae, Phylloxeridae και Aphididae. Στην οικογένεια Aphididae εντάσσονται 20 υποοικογένειες: Pemphiginae, Mindarinae, Hormaphidinae, Tamaliinae, Neophyllaphidinae, Phloeomyzinae, Lizeriinae, Greenideinae, Anoecilinae, Thelaxinae, Phyllaphidinae, Saltusaphidinae, Macropodaphidinae, Drepanosiphinae, Israelaphidinae, Chaitophorinae, Lachninae, Pterocommatinae, Parachaitophorinae και Aphidinae. Για τη συστηματική κατάταξη των αφίδων ο Heie (1980) είχε προτείνει ένα άλλο σύστημα ταξινόμησης, στο οποίο κατατάσσει τις αφίδες σε δυο υπεροικογένειες: Phylloxeroidea και Aphidoidea. Στην πρώτη τοποθετεί τις οικογένειες Adelgidae, Phylloxeridae και στη δεύτερη τις: Mindaridae, Hormaphididae, Phloeomyzidae, Thelaxidae, Anoecilidae, Pemphigidae, Drepanosiphidae, Greenideidae, Aphididae και Lachnidae. Και τα δύο συστήματα ταξινόμησης θεωρούνται σωστά και ακολουθούνται από πολλούς ερευνητές – συγγραφείς. Οι Blackman & Eastop (2000) ακολουθούν την ταξινόμηση των Remaudière και Stroyan, και άλλοι (Ilharco & Van Harten 1987) αυτή του Heie.

Οι αφίδες είναι έντομα μικρού μεγέθους με μαλακό σώμα, γενικό σχήμα ωοειδές και μήκος 1-10 mm. Τα κυριότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τις αφίδες από τα άλλα έντομα είναι:

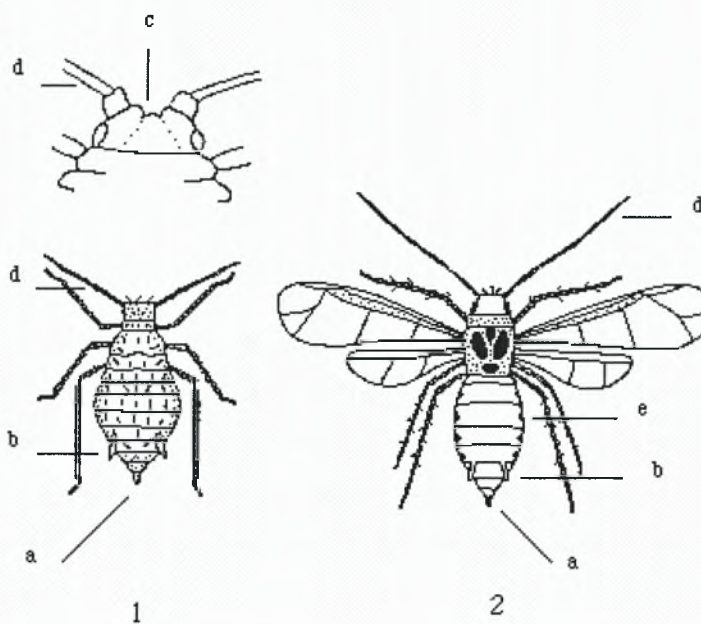


Εικόνα 1. Άπτερη μορφή θηλυκού της αφίδας *Myzus persicae*.(www.ent.vt.edu)

1. Η βάση του ρύγχους βρίσκεται μεταξύ και εμπρός από τα ισχία του πρώτου ζεύγους ποδιών
2. Η κεραία αποτελείται από δύο βασικά άρθρα (σκάπος και ποδίσκος) και το σχετικά

λεπτό μαστίγιο, που συνήθως έχει τέσσερα άρθρα. Το τελευταίο άρθρο της κεραίας αποτελείται από το βασικό τμήμα, και την τελική απόληξη.

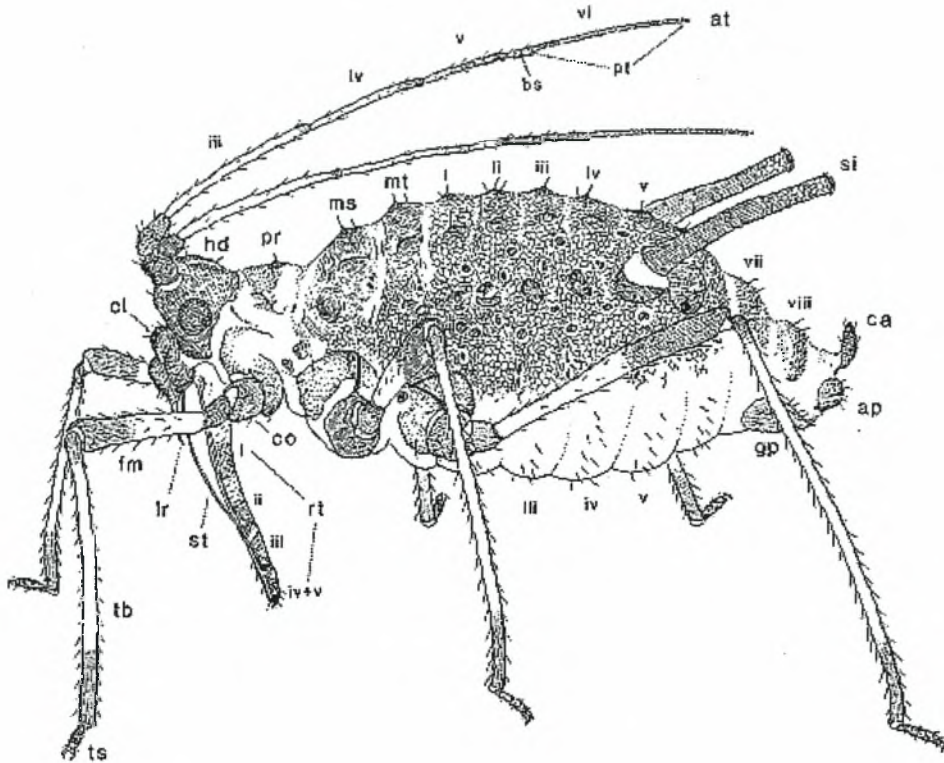
3. Κάτω από κάθε σύνθετο οφθαλμό υπάρχει ένας οπτικός λοβός με τρία οματίδια (τριοματίδιο). 4. Ο ταρσός αποτελείται από 2 άρθρα 5. Οι πτέρυγες έχουν μόνο ένα χαρακτηριστικό επίμηκες νεύρο 6. Στη ραχιαία πλευρά του πέμπτου κοιλιακού άρθρου υπάρχει ένα ζεύγος από σιφώνια ή κεράτια (τα σιφώνια είναι εκφορητικοί αγωγοί αδένων που παράγουν φερομόνες συναγερού) (Dixon 1998).



Εικόνα 2. Κατακόρυφη όψη άπτερου (1) και πτερωτού (2) ατόμου αφίδας, όπου a:κάρυα, b:σιφώνια c:εκβλάστωμα κεραίας d: κεραίες και e:τραχειακά ανοίγματα.

(www.inra.fr)

Οι αφίδες ζουν συνήθως σε τρυφερούς βλαστούς και τρυφερά φύλλα διαφόρων φυτών. Μερικά είδη είναι ριζόβια ή φυλλόβια και ριζόβια και αρκετά είναι κηκιδόβια, ζουν δηλαδή μέσα σε κηκίδες στο φύλλωμα των φυτών-ξενιστών τους, που δημιουργούνται από την αντίδραση του φύλλου στις αφίδες. Ζουν συνήθως σε ομάδες η μια κοντά στην άλλη και οι αποικίες τους μπορεί να σκεπάσουν σε ορισμένα φυτά ολόκληρο το κορυφαίο μέρος των νέων βλαστών.



Εικόνα 3 Πλευρική όψη άπτερου παρθενογενετικού θηλυκού της αφίδας *Macromyzus woodwardiae* (Takahashii) όπου: ap: εδρική πλάκα, at: κεραία, bs: βασικό τμήμα του τελευταίου άρθρου της κεραίας, ca: ουρίτσα, cl: επιστόμιο co: ισχύον, fm: μηρός, gr: γενετική πλάκα, hd: κεφαλή, lr: άνω χείλος ms: μεσοθώρακας, mt: μεταθώρακας, pr: προθώρακας, pt: τελικό τμήμα του τελευταίου άρθρου της κεραίας, rt: ρύγχος, si: σιφώνια, st: στιλέτα, tb: κνήμη, ts: ταρσός . Οι Λατινικοί αριθμοί υποδηλώνουν τον αριθμό του άρθρου (τροποποιημένο από Miyazaki 1987).

Η κυκλική παρθενογένεση και η εναλλαγή ξενιστού (ετεροοικία) είναι τα πλέον σημαντικά γνωρίσματα της εξέλιξης του βιολογικού κύκλου των αφίδων, που τις επιτρέπουν να εκμεταλλεύονται τους διαθέσιμους πόρους, ιδιαίτερα τους πόωδεις ξενιστές με μικρή διάρκεια ζωής, όπως είναι οι περισσότερες καλλιέργειες. Η ικανότητα αυτή φαίνεται ότι είναι περισσότερο αναπτυγμένη στις αφίδες από ότι στα άλλα έντομα (Blackman & Eastop 2000). Η κυκλική παρθενογένεση (cyclical parthenogenesis) χαρακτηρίζεται από την εναλλαγή της φάσης της σεξουαλικής αναπαραγωγής με τη φάση, όπου τα έντομα αναπαράγονται παρθενογενετικά. Στα είδη με εναλλαγή ξενιστών (host alternation), εμφανίζεται εποχική μετανάστευση μεταξύ δύο φυτών ξενιστών, του πρωτεύοντα ξενιστή (δένδρο ή θάμνος), όπου λαμβάνει χώρα η σεξουαλική αναπαραγωγή και του δευτερεύοντα (πόωδης,

θαμνώδης), όπου τα έντομα αναπαράγονται παρθενογενετικά για ορισμένο αριθμό γενεών. Η μετανάστευση δεν έχει σχέση με μετακινήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες σε διάφορους δευτερεύοντες ξενιστές και αφορούν στην εξάπλωση πληθυσμών του είδους λόγω της αύξησης του αριθμού τους. Ορισμένα είδη αφίδων (μονόοικα) δεν εμφανίζουν εναλλαγή ξενιστών και συμπληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε ένα μόνο ξενιστή (δενδρώδη, θαμνώδη, ποώδη). Η εναλλαγή ξενιστού εμφανίζεται σε μέλη τεσσάρων (Aphididae, Anoeciidae, Hormaphididae και Pemphigidae) από τις 10 οικογένειες των Aphidoidea (Eastop 1977). Ωστόσο, ακόμη και στο ίδιο γένος, κάποια είδη είναι ετερόοικα και άλλα αυτόοικα και περιστασιακά η ίδια παραλλακτικότητα εμφανίζεται μέσα στο ίδιο το είδος (Shaposhnikov 1981). Ορισμένοι γενότυποι, σε διάφορα είδη, έχουν χάσει πλήρως ή μερικώς την ικανότητα σεξουαλικής αναπαραγωγής. Οι πρώτοι αναπαράγονται όλο το έτος παρθενογενετικά ενώ οι δεύτεροι παράγουν κυρίως παρθενογενετικές μορφές αλλά και αριθμό αρσενικών ή και λίγων έμφυλων θηλυκών.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα της βιολογίας των αφίδων είναι η ωοτοκία και η ζωοτοκία. Στις οικογένειες Adelgidae και Phylloxeridae τόσο τα σεξουαλικά όσο και τα παρθενογενετικά θηλυκά εναποθέτουν ωά. Αντίθετα, στην οικογένεια Aphididae τα έμφυλα θηλυκά είναι ωοτόκα και τα παρθενογενετικά ζωοτόκα. Σημαντική είναι και η συνεισφορά των αφίδων στη ροή της ενέργειας σε φυσικά οικοσυστήματα, τόσο γιατί παράγουν μεγάλες ποσότητες μελιτώματος που προσφέρει θρεπτικά στοιχεία σε μύκητες ή σε ζωικούς οργανισμούς, όσο και γιατί μια πληθώρα οργανισμών τρέφεται από αυτές (Price 1984).

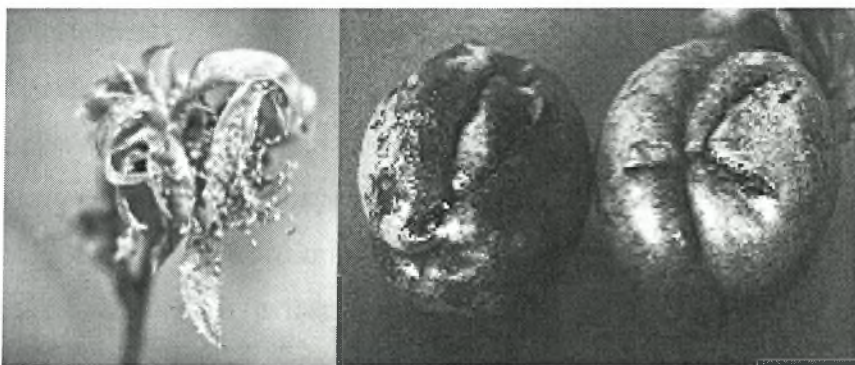
Οι αφίδες είναι άφθονες κυρίως την άνοιξη και το φθινόπωρο και γενικά με μετρίως θερμό και υγρό καιρό. Την άνοιξη τα παρθενογενετικά θηλυκά αναπαράγονται ταχύτατα γιατί και οι καιρικές συνθήκες και η αφθονία τρυφερής βλάστησης ευνοούν την ανάπτυξή τους. Σε κλίματα όπως της Ελλάδας οι θερμοί και ξηροί μήνες του καλοκαιριού δεν ευνοούν τη συνεχή αναπαραγωγή των αφίδων και οι πληθυσμοί τους περιορίζονται. Το μέγιστο των συλλήψεων πτερωτών αφίδων σε αναρροφητικές παγίδες τύπου Rothamsted παρουσιάζεται τους μήνες Μάιο-Ιούνιο κατά την περίοδο, που πολλές καλοκαιρινές καλλιέργειες βρίσκονται σε ευαίσθητο στάδιο ανάπτυξης (Tsitsipis et al. 1997). Οι αφίδες έχουν τη δυνατότητα να αναπτύξουν πολύ μεγάλους πληθυσμούς στις καλλιέργειες, όταν οι βιοτικοί και αβιοτικοί παράγοντες (π.χ. θερμοκρασία, φυσικοί εχθροί) το επιτρέπουν.

Ένας σημαντικός παράγοντας που περιορίζει την αύξηση των πληθυσμών των αφίδων είναι οι φυσικοί εχθροί, οι οποίοι σε αρκετές περιπτώσεις τους ελέγχουν ικανοποιητικά. Ανάμεσα στους φυσικούς εχθρούς είναι: α) αρπακτικά: Δίπτερα των οικογενειών Syrphidae και Cecidomyiidae, Νευρόπτερα των οικογενειών Hemerobiidae και Chrysopidae, Κολεόπτερα των οικογενειών Coccinellidae, Staphylinidae και Carabidae, β) παρασιτοειδή: Υμενόπτερα των οικογενειών Braconidae και Aphidiidae καθώς και εντομοπαθογόνοι μύκητες των γενών *Conidiobolus*, *Entomophthora*, *Erynia* κ.α.

1.2 Ζημιά

Οι αφίδες αφαιρούν μεγάλη ποσότητα χυμού από τα φυτά και το νύγμα πολλών ειδών προκαλεί συστροφή φύλλων και παραμόρφωση φύλλων ή καρπών. Τα άφθονα μελιτώδη απεκκρίματα ορισμένων ειδών ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς και ευνοούν την ανάπτυξη καπνιάς, που οφείλεται στην ανάπτυξη σαπροφυτικών μυκήτων. Οι αφίδες προκαλούν και άλλες έμμεσες ζημιές καθώς αποτελούν μια από τις κυριότερες κατηγορίες εντόμων που μεταδίδουν στα φυτά παθογόνους ιούς. Ορισμένα είδη, όπως το *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), είναι φορείς πολλών σοβαρών ιώσεων των καλλιεργούμενων φυτών (van Emden et al. 1969, Blackman & Eastop 2000).

Οι πυκνοί συνήθως πληθυσμοί τους, ο μεγάλος αριθμός γενεών το έτος, που συχνά ξεπερνά τις 10 και η μετάδοση ιών στα φυτά, κατατάσσουν τις αφίδες ανάμεσα στους πιο βλαβερούς εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών.



Εικόνα 4. Συστροφή και παραμόρφωση φύλλων (αριστερά), και παραμόρφωση καρπών (δεξιά). (www.inra.fr)

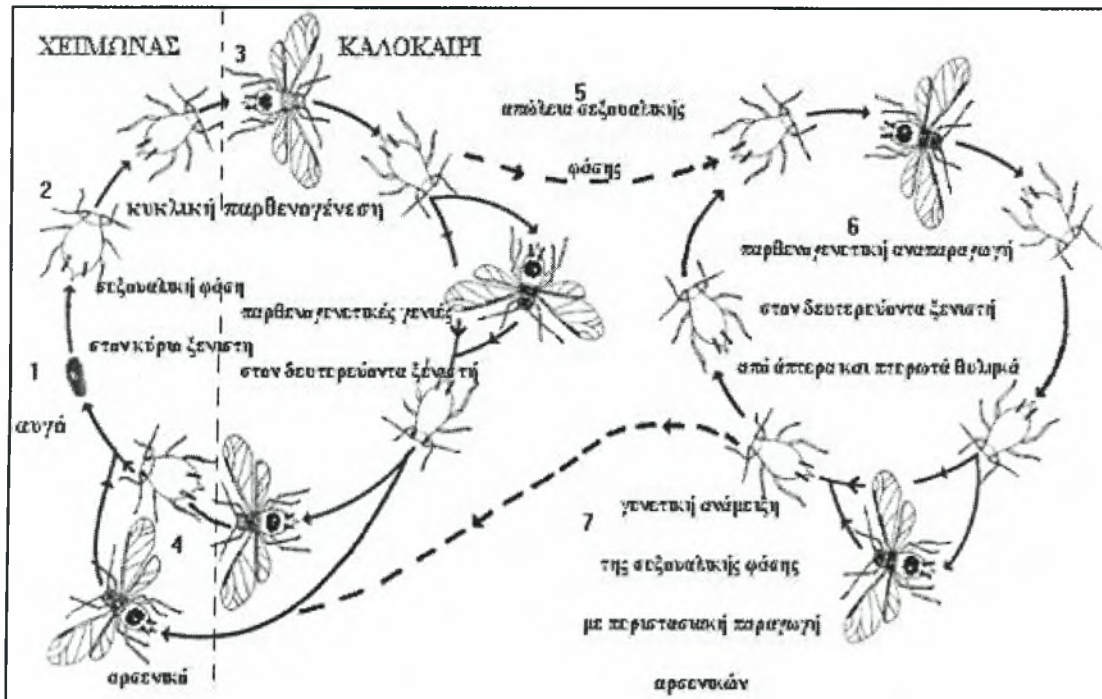
Η μείωση που προκαλούν στη γεωργική παραγωγή και κατά συνέπεια στο γεωργικό εισόδημα, στην Ελλάδα είναι σημαντική. Ενδεικτικά αναφέρονται δύο χαρακτηριστικές περιπτώσεις. Στην πεδιάδα Μεσσαράς Κρήτης, στις υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας το 1992, λόγω προσβολής από τους αφιδομεταδιδόμενους ιούς, μωσαϊκό της αγγουριάς (CMV) και Υ της πατάτας (PVY) η απώλεια του αγροτικού εισοδήματος εκτιμήθηκε στο ένα δισ. δρχ. (Αυγελής και Παπαδημητράκης, αδημοσίευτα στοιχεία). Στα Βασιλικά Θεσσαλονίκης η απώλεια του αγροτικού εισοδήματος το 1992 υπολογίσθηκε στα 210 εκτ. δρχ. λόγω της παρουσίας των αφιδομεταδιδόμενων ιών: μωσαϊκό της καρπουζιάς (WMV-2), κίτρινο μωσαϊκό της κοινής κολοκυθιάς (ZYMV) και αφιδομεταδιδόμενος ίκτερος των κολοκυνθοειδών (CABYV) (Βαϊτσόπουλος και Κατής 1993).

1.3 Βιολογικός κύκλος των αφίδων

Στα ετερόοικα (μεταναστευτικά) είδη αφίδων τα χειμερινά ωά γεννιούνται το φθινόπωρο στους κλάδους του κύριου ξενιστή. Την άνοιξη τα ωά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά, που ονομάζονται θεμελιωτικά ή ιδρυτικά άτομα (fundatrix). Ακολουθούν παρθενογενετικές γενιές με άπτερα (apterous fundatrigeniae) που παρουσιάζουν προοδευτική μεταβολή στη μορφολογία τους (Lees 1966). Έπειτα από ορισμένο αριθμό γενεών γεννιούνται τα πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά (migrantes ή alate fundatrigeniae), που διασπείρονται σε φυτά του ίδιου είδους με τον κύριο ξενιστή ή μεταναστεύουν στους δευτερεύοντες ποώδεις ξενιστές. Την άνοιξη και το καλοκαίρι στους δευτερεύοντες ξενιστές η μία παρθενογενετική γενιά διαδέχεται την άλλη. Εκτός από άπτερες μορφές παράγονται πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά (alienicolae), που μεταναστεύουν σε άλλα φυτά και συνεχίζουν την παρθενογενετική αναπαραγωγή. Το φθινόπωρο καθώς η διάρκεια της ημέρας μειώνεται, σε είδη ορισμένων οικογενειών, π.χ. στο είδος *A. fabae* Scopoli (Aphididae), παράγονται στο δευτερεύοντα ξενιστή θηλυτόκα πτερωτά (gynoparae) και αρσενικά που θα μεταναστεύσουν στον κύριο ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα θα γεννήσουν τα έμφυλα θηλυκά (oviparae), που εναποθέτουν τα χειμερινά ωά, μετά από σύζευξη με τα αρσενικά. Στα ετερόοικα είδη άλλων οικογενειών, π.χ. στο είδος *Pemphigus bursarius* (L.) (Pemphigidae), παράγεται στους δευτερεύοντες ξενιστές μόνο μια μεταναστευτική μορφή, τα πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά και ονομάζονται φυλογόνα (sexuparae). Τα φυλογόνα γενούν στον πρωτεύοντα ξενιστή άπτερα αρσενικά και ωοτόκα θηλυκά. Τα θηλυκά που επιστρέφουν στον πρωτεύοντα

ξενιστή, συχνά παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές από αυτά που μεταναστεύουν την άνοιξη στους δευτερεύοντες ξενιστές (Blackman & Eastop 2000).

Στα μονόικα (μη μεταναστευτικά) είδη αφίδων, π.χ. *Aphis rumicis* L. (Hemiptera: Aphididae), ο παραπάνω ετήσιος κύκλος συμπληρώνεται σε έναν ξενιστή, στο ίδιο φυτό ή σε φυτά του ίδιου είδους. Το φθινόπωρο άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά (φυλογόνα) θα γεννήσουν ωτόκα και αρσενικά. Τα αρσενικά συνήθως είναι άπτερα, γιατί δεν χρειάζεται να μεταναστεύσουν για να ολοκληρωθεί ο βιολογικός τους κύκλος. Σε ορισμένα είδη παράγονται πτερωτά και άπτερα αρσενικά. Τα περισσότερα μονόικα είδη σε ποώδη φυτά πιστεύεται ότι εξελίχθηκαν μέσα από την ετεροικία. Αρκετά μονόικα είδη, που συμπληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε έναν ποώδη ξενιστή, παρουσιάζουν μεγάλη συγγένεια με ετερόικα είδη που χρησιμοποιούν το ίδιο φυτό ως δευτερεύοντα ξενιστή. Το παραπάνω αποτελεί μια ένδειξη, ότι η μονοικία είναι ένα συχνό και συνεχές φαινόμενο τόσο στην πρόσφατη όσο και στη μακρινή εξελικτική ιστορία των αφίδων (Blackman & Eastop 2000).



Εικόνα 5. Εναλλαγή ξενιστών και μορφές της αφίδας *Myzus persicae*
(Τροποποιημένο από Field & Blackman 2003).

Αρκετές θεωρίες σχετικά με την εξέλιξη της εναλλαγής ξενιστών και της μονοοικίας έχουν διατυπωθεί από τις αρχές του αιώνα. Ο Mordvilko (1928) κατέληξε σε δυο πιθανούς λόγους για την εξέλιξη της εναλλαγής ξενιστών: 1. Έντομα με πολλές γενιές το έτος, όπως οι αφίδες, μπορούν να εκμεταλλευτούν τη συμπληρωματική ανάπτυξη που παρουσιάζουν οι ποώδεις και δενδρώδεις ξενιστές. 2. Εκμετάλλευση των ποωδών φυτών, που αποτελούν υψηλότερης ποιότητας τροφή. Ο ίδιος θεώρησε, ότι η ιδιότητα της εναλλαγής ξενιστών διατηρήθηκε μέσω της εξελικτικής διαδικασίας εξαιτίας της προσαρμογής που παρουσιάζουν τα θεμελιωτικά άτομα στον πρωτεύοντα ξενιστή.

Αυτή η προσαρμογή είναι δυνατή να εμποδίσει την εξέλιξη της αυτοοικίας στους δευτερεύοντες ξενιστές. Ο Böner (1939) πρότεινε, ότι οι αφίδες αρχικά ήταν πολυφάγες, αν και τώρα παρουσιάζουν αρκετή εξειδίκευση, ώστε οι καλοκαιρινοί και χειμερινοί ξενιστές τους μπορεί να σχετίζονται με την πολυφαγία στη διάρκεια του χρόνου. Ο Shaposhnikov (1987) πρότεινε ότι οι αλλαγές κατά την εξέλιξη των ξενιστών που προκλήθηκαν από αλλαγές του περιβάλλοντος, εξασθένησαν την εξειδίκευση των αφίδων και έκανε δυνατό τον αποικισμό νέων ξενιστών. Η μικρή θρεπτική ποιότητα των ξυλωδών ξενιστών κατά το καλοκαίρι μπορεί να οδήγησε τις αφίδες σε νέους ξενιστές. Ο Hille Ris Lambers (1953) διατύπωσε την άποψη ότι η ετεροοικία δεν πρέπει να θεωρείται ως ένα εξελικτικό αδιέξοδο. Αντίθετα ο Istock (1967) πρότεινε ότι οι πολύπλοκοι βιολογικοί κύκλοι είναι μη σταθεροί και τείνουν να τροποποιηθούν σε καταστάσεις, όπως η μονοοικία, που έχουν περισσότερα πλεονεκτήματα. Επικριτές της παραπάνω άποψης είναι οι Slade & Wassersung (1975) και Wilbur (1980), που θεωρούν ότι πολύπλοκοι βιολογικοί κύκλοι προτιμούνται εκεί που αναμένονται, συμπατριικοί, υψηλής ποιότητας εφήμεροι πόροι. Δύο άλλα αίτια της εξέλιξης της εναλλαγής ξενιστών είναι ο ενδοειδικός ανταγωνισμός και η αποφυγή των φυσικών εχθρών. Όσο αυξάνει ο ενδοειδικός ανταγωνισμός σε ένα ξενιστή τόσο μειώνονται οι κίνδυνοι που απορρέουν από τη μετανάστευση. Συνεπώς, ο ανταγωνισμός που υπάρχει στον πρωτεύοντα ξενιστή μπορεί να οδηγήσει τις αφίδες σε εναλλακτικούς καλοκαιρινούς ξενιστές (Dixon 1966). Οι Weed (1896) έχουν προτείνει ότι οι φυσικοί εχθροί συνέβαλαν στην εξέλιξη της ετεροοικίας. Η Moran (1990) πρότεινε, ότι η ετεροοικία διατηρείται λόγω της ισορροπίας μεταξύ των πλεονεκτημάτων που έχουν οι αφίδες όταν τρέφονται στους ποώδεις ξενιστές και της μεγαλύτερης επιβίωσης το χειμώνα και αναπαραγωγής την άνοιξη στους ξυλώδεις ξενιστές. Όπως οι Mordvilko και Istock, η Moran θεωρεί την ετεροοικία ως συνέπεια

της προσαρμογής και του περιορισμού του θεμελιωτικού ατόμου στον πρωτεύοντα ξενιστή. Επίσης συμφωνεί με τους Mordvilko και Shaposhnikov, ότι η εξέλιξη των αφίδων οδηγεί στη μονοοικία σε ποώδη φυτά. Αντίθετα οι Dixon & Kundu (1994) και Kundu & Dixon (1995) υποστηρίζουν την άποψη, ότι για τα έντομα με πολλές γενιές το έτος, η εναλλαγή ξενιστών είναι ένας τρόπος για να εκμεταλλευτούν καλύτερα φυτά που έχουν συμπληρωματική ανάπτυξη και αλλαγές στην θρεπτική ποιότητα δηλαδή συμφωνούν με την εναλλακτική υπόθεση του Mordvilko.

Σύμφωνα με τους Blackman & Eastop (2000), η κυκλική παρθενογένεση διαχωρίζει τις δύο βασικές λειτουργίες ενός οργανισμού, που είναι απαραίτητες στην εκμετάλλευση των πόρων του περιβάλλοντος: 1) την εγγενή αναπαραγωγή, που εμπλέκει τον ανασυνδυασμό των γονιδίων και την παραγωγή νέων γενοτύπων και 2) την αύξηση της βιομάζας κάθε γενοτύπου στο χώρο και στο χρόνο, ώστε να μεγιστοποιηθούν οι πιθανότητες συνεισφοράς των γονιδίων του στην επόμενη σεξουαλική φάση.

Αποτέλεσμα του διαχωρισμού των παραπάνω λειτουργιών είναι ότι η εξέλιξη τους συμβαίνει ανεξάρτητα, με συνέπεια να αποκλίνει η μορφολογία των σεξουαλικών από αυτή των παρθενογενετικών μορφών. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι αφίδες της υποοικογένειας Pemphiginae, όπου στην πρώτη παρθενογενετική γενιά (fundatrix) οι αφίδες είναι μεγάλωσμες, ζωοτόκες και γενούν πολλούς απογόνους, ενώ τα έμφυλα θηλυκά είναι μικρόσωμα, δεν τρέφονται και γενούν ένα ωό μεγέθους περίπου ίδιο με το δικό τους.

Το χαρακτηριστικό που απέκτησαν οι αφίδες (Aphididae) και τους επιτρέπει να αναπτύσσουν μεγάλους πληθυσμούς είναι η ζωοτοκία. Η ανάπτυξη του εμβρύου αρχίζει πριν γεννηθεί η μητέρα του και με την ενηλικίωσή της το έντομο είναι έτοιμο να γεννηθεί, η ανάπτυξη των γενεών έχει ως αποτέλεσμα οι αφίδες να συμπληρώνουν την ανάπτυξή τους σε χρόνο τρεις φορές μικρότερο από άλλα ισομεγέθη έντομα και οι πληθυσμοί τους να επιτυγχάνουν ρυθμούς αύξησης όμοιους με αυτούς μικρότερων οργανισμών όπως π.χ. τα ακάρεα (Dixon 1998). Επίσης, ένα άλλο χαρακτηριστικό των αφίδων που τις επιτρέπει να δημιουργούν μεγάλους πληθυσμούς και να εκμεταλλεύονται πόρους, που «χάνονται» στο χώρο και το χρόνο, είναι η παραγωγή πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών που μεταναστεύουν από φυτό σε φυτό και δημιουργούν καινούριες αποικίες.

Συχνό γεγονός στη φυλογένεση του βιολογικού κύκλου των αφίδων είναι η ανολοκυκλικότητα, δηλαδή η απώλεια της ικανότητας για σεξουαλική αναπαραγωγή.

Υπάρχουν είδη από σχεδόν όλες τις κύριες ομάδες των αφίδων, που είναι αποκλειστικά ανολοκυκλικά και αναπαράγονται όλο το έτος παρθενογενετικά. Επίσης, τόσο μονόοικα όσο και ετερόοικα είδη έχουν γίνει μερικώς ανολοκυκλικά, καθώς βρίσκονται ανολοκυκλικοί γενότυποι είτε στην ίδια περιοχή μαζί με ολοκυκλικούς είτε σε άλλες περιοχές του εύρους εξάπλωσης του είδους (Blackman & Eastop 2000). Αν και οι ανολοκυκλικοί κλώνοι έχουν την ικανότητα να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, να αποικίσουν ανθεκτικές ποικιλίες και να παρουσιάσουν υψηλότερο ρυθμό αύξησης από ότι οι αντίστοιχοι ολοκυκλικοί, μόνο το 3% των ειδών είναι αποκλειστικά ανολοκυκλικά (Blackman 1980). Φαίνεται, ότι η σεξουαλική αναπαραγωγή προσδίδει σημαντικές δυνατότητες προσαρμογής και επιβίωσης στις αφίδες. Μερικοί από τους λόγους, που σύμφωνα με τον Dixon (1998) είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της εγγενούς αναπαραγωγής στις αφίδες συνοψίζονται παρακάτω. Η εναπόθεση διαχειμαζόντων ωών, που είναι το πιο ανθεκτικό στάδιο του εντόμου στο ψύχος, δεν θα πρέπει να θεωρείται ως πλεονέκτημα της εγγενούς αναπαραγωγής αλλά ως μια προσαρμογή στις ψυχρές χειμερινές συνθήκες. Είδη των οικογενειών Adelgidae και Phylloxeridae παράγουν για το ίδιο λόγο ωά χωρίς γονιμοποίηση. Η ετερογένεια του περιβάλλοντος είναι ένας από τους λόγους που διατηρείται η εγγενής αναπαραγωγή. Παράγεται ένα εύρος γενοτύπων και αυξάνεται η πιθανότητα κάποιος από αυτούς να έχει μεγαλύτερη προσαρμογή σε συγκεκριμένο περιβάλλον. Επίσης, με την παραγωγή διαφορετικών γενοτύπων μειώνεται ο ενδοειδικός ανταγωνισμός, καθώς κάθε ένας από αυτούς έχει διαφορετικές ανάγκες και εκμεταλλεύονται διαφορετικούς πόρους. Η έλλειψη ετερογένειας στις καλλιέργειες εξηγεί γιατί οι αφίδες, που τις προσβάλλουν, έχουν την τάση να αναπαράγονται παρθενογενετικά όλο το έτος ακόμη και σε περιοχές με ψυχρούς χειμώνες. Ένα άλλο στοιχείο, που πιθανώς είναι υπεύθυνο για την επιλογή της εγγενούς αναπαραγωγής, είναι ότι στις παρθενογενετικές σειρές συσσωρεύονται θανατηφόρα ή μη λειτουργικά αλληλόμορφα και δεν υπάρχει τρόπος να μειωθούν. Με την εγγενή αναπαραγωγή και τον ανασυνδυασμό των γονιδίων το παραπάνω μπορεί να αποφευχθεί. Τέλος, η εγγενής αναπαραγωγή συνδέεται με τα είδη που παρουσιάζουν εξειδικευμένη στρατηγική αναπαραγωγής σχετική με την εποχή. Αντίθετα λείπει από τα είδη που ζουν σε περιβάλλοντα χωρίς εποχικότητα ή είναι μειωμένη.

Οι αφίδες λοιπόν, είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη κατηγορία εντόμων κυρίως λόγω του βιολογικού τους κύκλου και του πολυμορφισμού που παρουσιάζουν στους

πληθυσμούς τους, ο οποίος προσδίδει σ' αυτές μια μεγαλύτερη ικανότητα επιβίωσης καθώς μπορούν να προσαρμόζονται σε διάφορα περιβάλλοντα, σε σχέση βέβαια και με άλλους παράγοντες.

1.4 Αφίδες και ανθεκτικότητα

Όπως όλοι οι ζώντες οργανισμοί, έτσι και οι αφίδες έχουν προσαρμοστεί για εκατομμύρια έτη στο περιβάλλον τους. Ωστόσο, αποικίζοντας φυτά γεωργικής σημασίας, τα στάδια της εξέλιξής τους έχουν επιταχυνθεί για να μπορούν να αντιμετωπίζουν τις τεχνικές καταπολέμησης που εφαρμόζονται εναντίον τους. Τα οργανικά εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται για περισσότερο από 50 χρόνια στην αντιμετώπιση των εντόμων. Πολλά είδη εντόμων έχουν αναπτύξει ανθεκτικότητα σε νέα εντομοκτόνα που έχουν εφαρμοστεί. Κλασικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελεί το *M. persicae*, που έχει αναπτύξει διάφορους μηχανισμούς για να επιβιώνει στην εφαρμογή των εντομοκτόνων. Ένα χαρακτηριστικό των αφίδων γενικά είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιούν διαφορετικές μεθόδους για να επιβιώνουν το χειμώνα είτε ως διαπαύον ωό στον κυρίως δενδρώδη ξενιστή μετά τη σεξουαλική φάση ή με παρθενογενετική αναπαραγωγή σε χειμερινούς ξενιστές όπως αυτή συμβαίνει κατά τη διάρκεια του θέρους σε ποώδεις ξενιστές (Devonshire et al. 1999).

Αρκετοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας έχουν ανιχνευθεί σε διαφορετικά είδη αφίδων. Το 2004 σε μια εργασία των Toda et al. έγινε αναφορά για παρουσία στην *Aphis gossypii* (Glover) (Hemiptera: Aphididae), τροποποιημένης ακετυλοχολινεστεράσης. Συγκεκριμένα εφαρμόζοντας μοριακές μεθόδους, οι παραπάνω επιστήμονες εντόπισαν αντικαταστάσεις δυο αμινοξέων στο ένα γονίδιο της AChE που προσδίδουν ανθεκτικότητα στο έντομο σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και στο pirimicarb.

Μια άλλη αφίδα που έχει απασχολήσει αρκετά τους επιστήμονες για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι η *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae). Η αφίδα αυτή παρουσίασε ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, με αποτέλεσμα η αντιμετώπισή της να παρουσιάζει αποτυχίες.

2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού υπάρχουν πάντοτε αρκετές διαφορές οι οποίες είναι βέβαια πολύ πιο έντονες μεταξύ των διαφορετικών ειδών, όμως εξακολουθούν να υπάρχουν διαφορές και ανάμεσα σε άτομα του ίδιου είδους ή ακόμα και της ίδιας ποικιλίας. Γενικά μπορεί να πει κανείς με σιγουριά για όλους τους ζωντανούς οργανισμούς ότι δεν υπάρχουν δύο άτομα που να είναι ακριβώς τα ίδια. (Φανουράκης 2002)

Ένας πληθυσμός ατόμων για να θεωρηθεί ότι αναπτύσσεται εξελικτικά, πρέπει να περιέχει **γενετική παραλλακτικότητα**. Λόγω του γεγονότος ότι σε μια μελέτη δεν είναι δυνατόν να είναι γνωστές όλες οι γενετικές μεταβλητές που προσδίδουν εξελικτική επιτυχία, συνήθως μελετάται η παραλλακτικότητα διαφορετικών φαινοτύπων και γενοτύπων ώστε να σχηματιστεί μια γενική εικόνα του πληθυσμού (Futuyma 1997).

Η γενετική παραλλακτικότητα συναντάται με τη μορφή διαφορών σε πολλά χαρακτηριστικά και είναι το αποτέλεσμα διαφορών ως προς τη γενετική σύσταση των οργανισμών ενός πληθυσμού. Η γενετική παραλλακτικότητα μπορεί να είναι απλή στο να την παρατηρήσει κανείς, όπως π.χ. διαφορές στο χρώμα, ύπαρξη τριχιδίων κ.α. Η γενετική παραλλακτικότητα μεταβιβάζεται στους απογόνους και επομένως οι γενετικές διαφορές των οργανισμών εμφανίζονται και στις επόμενες γενεές, όμως η ένταση με την οποία εκδηλώνονται εξαρτάται και από τις συνθήκες του περιβάλλοντος.

Η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των φυτών οφείλεται στις διαφορές που υπάρχουν ως προς τα γονίδια που καθορίζουν το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό. Τα γονίδια είναι οι κληρονομικές μονάδες που μεταβιβάζονται από γενιά σε γενιά και καθορίζουν τη δυνατότητα ανάπτυξης του οργανισμού. Όμως η τελική έκφραση των χαρακτηριστικών ενός οργανισμού είναι το αποτέλεσμα της συνδυασμένης επίδρασης του γονότυπου και του περιβάλλοντος. (Φανουράκης 2002)

Υπάρχουν πολλά είδη οργανισμών που παρουσιάζουν μικρή γενετική παραλλακτικότητα, κυρίως λόγω μείωσης του πληθυσμού και περιορισμού του ενδιαίτηματός τους (Futuyma 1997). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα άτομα τα οποία απομένουν σε ένα πληθυσμό να είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους και ένας τέτοιος πληθυσμός χαρακτηρίζεται από χαμηλή παραλλακτικότητα.

Το παραπάνω παράδειγμα αποτελεί περίπτωση **bottleneck** (φαινόμενο στενωπού), στο οποίο ένα σημαντικό ποσοστό ενός πληθυσμού θανατώνεται ή για κάποιους λόγους εμποδίζεται να αναπαραχθεί, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός να μειώνεται κατά 50 % ή και παραπάνω. Αν αυτή η μείωση του πληθυσμού αναπαραχθεί με γραφική παράσταση, η καμπύλη που προκύπτει μοιάζει με το λαιμό ενός μπουκαλιού που στενεύει. Από αυτή την απεικόνιση πήρε και το όνομα bottleneck (λαιμός μπουκαλιού). Αυτό το φαινόμενο αυξάνει τη γενετική ροή μέσα σε ένα πληθυσμό, κάτι που είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό εφόσον η γενετική ροή είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος του πληθυσμού. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν πληθυσμοί που έχουν υποστεί το φαινόμενο bottleneck, είναι η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας. Κάτι τέτοιο παρουσιάζει ενδιαφέρον εφόσον ο μειωμένος πολυμορφισμός μειώνει την ικανότητα ενός πληθυσμού να ανταποκριθεί εξελικτικά σε ενδεχόμενες αλλαγές του περιβάλλοντος (Futuyma 1997).

Ένας τρόπος με τον οποίο μπορεί να εκφραστεί η παραλλακτικότητα, είναι μέσω της ανάλυσης γενετικών δεδομένων και στη συνέχεια μετάφραση των δεδομένων αυτών σε γονιδιακές συχνότητες. Κάθε γονίδιο περιέχει τουλάχιστον δυο αλληλόμορφα. Επομένως, η άθροιση των συχνοτήτων εμφάνισης των αλληλομόρφων για όλα τα γονίδια, που εξετάστηκαν σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό, θεωρείται χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου πληθυσμού. Οποιοσδήποτε πληθυσμός, για κάθε γονίδιο που εξετάζεται, μπορεί να απαρτίζεται από μεγάλο εύρος συχνοτήτων αλληλομόρφων. Τέλος, δυο πληθυσμοί που αποτελούνται από άτομα του ίδιου είδους δεν είναι απαραίτητο να έχουν τον ίδιο αριθμό γονιδιακών συχνοτήτων (Futuyma 1997).

Ως **γενετικός πληθυσμός** περιγράφεται το άθροισμα των συχνοτήτων όλων των γονιδίων που αντιπροσωπεύουν έναν συγκεκριμένο πληθυσμό. Απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου να εξελιχτεί ένα είδος, είναι να υπάρξουν αλλαγές στις συχνότητες των γονιδίων του πληθυσμού. Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να συντελέσουν στην αλλαγή της **αρμοστικότητας (fitness)** των ατόμων ενός πληθυσμού. Η θνησιμότητα και η γονιμότητα είναι δυο χαρακτηριστικά που σχετίζονται άμεσα με την αρμοστικότητα ενός ατόμου καθώς και με την ικανότητά του να καταφέρει να επιβιώσει μέχρι να αρχίσει να αναπαραγάγει. Μεταβάλλοντας την αρμοστικότητα ενός ατόμου μέσα σε ένα πληθυσμό θα αλλάξει και η κατανομή σύζευξης. Το γεγονός αυτό θα συμβεί διότι οι γενότυποι της επόμενης γενιάς δεν θα έχουν άμεση σχέση με τη συχνότητα γονιδίων του αρχικού πληθυσμού. Επομένως οι

συχνότητες γονιδίων θα αλλάξουν και ως συνέπεια, ο πληθυσμός θα εξελιχθεί (Futuyma 1997).

Η σύνθετη θεωρία της εξέλιξης, όπως περιγράφηκε από τον Sewell Wright (Wright 1931), έχει ως σκοπό να εξηγήσει την εξέλιξη σύμφωνα με τις αλλαγές στις συχνότητες των γονιδίων. Αυτή η θεωρία υπερασπίζεται ότι τα είδη εξελίσσονται, όταν οι συχνότητες των γονιδίων αλλάζουν και μεταφέρονται μαζί με τον οργανισμό στη καινούρια οικολογική βιοθέση, που θα επιλέξει. Τότε μέσω της επιλογής, θα επιλεγούν τα καλύτερα προσαρμοσμένα άτομα στο νέο περιβάλλον και ο πληθυσμός θα εξελιχθεί. Κάποιοι από τους παράγοντες που μεταβάλλουν την παραλλακτικότητα ενός πληθυσμού, είναι οι μεταλλάξεις των αλληλομόρφων και η μετανάστευση των ατόμων, που συνεπάγεται εισαγωγή νέων αλληλομόρφων στον πληθυσμό.

Εφόσον οι αλλαγές στους πληθυσμούς απαιτούν αλλαγές στις συχνότητες των γονιδίων είναι απαραίτητο να κατανοηθεί, πώς οι συχνότητες αυτές μπορούν να αλλάξουν. Οι τρεις κυριότεροι τρόποι με τους οποίους μπορεί να συμβεί κάτι τέτοιο είναι η μετάλλαξη, η μετανάστευση και η φυσική επιλογή.

Μετάλλαξη. Το πιο κοινό είδος μετάλλαξης παρατηρείται μέσα στο ίδιο το γονίδιο με την αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου. Γενικά οι μεταλλάξεις είναι επιβλαβείς, αλλά μέσα στο γένωμα μπορεί να συμβεί και ένα διαφορετικό είδος αλλαγής το οποίο στην πραγματικότητα ωφελεί τη δημιουργία μεταλλάξεων. Αν η μετάλλαξη είναι ωφέλιμη για ένα συγκεκριμένο είδος οργανισμού, θα εξαπλωθεί από τον πληθυσμό όπου πρωτοεμφανίστηκε σε άλλους πληθυσμούς μέσω της μετανάστευσης (Futuyma 1997, Beebee & Rowe 2004).

Μετανάστευση είναι η μετακίνηση πληθυσμού, η οποία συνοδεύεται με την εισαγωγή νέων αλληλομόρφων στον πληθυσμό. Αυτό θα επιτευχθεί μόνο όταν το άτομο που μεταναστεύσει, καταφέρει να συζευχθεί με ένα άτομο που υπήρχε ήδη στον πληθυσμό. Ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την εισαγωγή νέων αλληλομόρφων είναι γονιδιακή ροή (gene-flow). Οι δυο μεγάλες επιδράσεις που έχει η μετανάστευση σε ένα πληθυσμό είναι : (1) αυξάνει την παραλλακτικότητα μέσα στον πληθυσμό και (2) εμποδίζει τον πληθυσμό να εξελιχθεί σε ένα εντελώς διαφορετικό είδος. (Futuyma 1997).

Επιλογή είναι η διαδικασία διάκρισης μεταξύ ατόμων, η οποία επιτρέπει την αύξηση της αναλογίας ορισμένων γενότυπων στις επόμενες γενιές και σύμφωνα με το Δαρβίνο (Darwin 1872) η εξέλιξη ενός είδους εξαρτάται άμεσα από τη φυσική επιλογή.

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ

3.1 Γενικά

Από τις πρώτες δεκαετίες του 20^{ου} αιώνα, για τη μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως. Συχνά όμως το γονίδιο ή τα γονίδια που θέλουμε να διακρίνουμε δεν εκδηλώνεται με ξεκάθαρο φαινότυπο ή εκδηλώνεται καθυστερημένα στη διάρκεια της ανάπτυξης του οργανισμού ή χρειάζεται ειδικές τεχνικές για την επιλογή του. Σε τέτοιες περιπτώσεις η επιλογή είναι δυνατόν να βασιστεί σε άλλο ή άλλα γονίδια στενά συνδεδεμένα με το χαρακτηριστικό που θέλουμε να επιλέξουμε. Η βασική αρχή στην περίπτωση αυτή είναι ότι τέτοια συνδεδεμένα γονίδια εφόσον εκδηλώνονται εύκολα είναι δυνατόν να επιλεγούν, οπότε επιλέγεται έμμεσα το επιθυμητό χαρακτηριστικό το οποίο διαφορετικά θα ήταν δύσκολο να το επιλέξουμε τα γονίδια αυτά τα ονομάζουμε γενετικούς δείκτες (Genetic markers) (Φανουράκης 2002)

Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν μελετηθεί νέες πηγές δεικτών, οι μοριακοί δείκτες, οι οποίοι επικεντρώνονται στις τεχνικές ανάλυσης σε μοριακό επίπεδο (DNA), ώστε να γίνει λεπτομερέστερη ανάλυση και σαφώς πιο ακριβής εξαγωγή συμπερασμάτων. Με τους μοριακούς δείκτες ανιχνεύουμε διάφορες των ατόμων που οφείλονται στην ποικιλομορφία (πολυμορφισμό) του DNA ή και στις πρωτεΐνες που το DNA κωδικοποιεί. (Φανουράκης 2002)

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).

Οι μοριακοί δείκτες πλεονεκτούν θεωρητικά απέναντι στους κλασικούς (κύρια μορφολογικούς) δείκτες για τους παρακάτω λόγους.

- a) Στους μοριακούς δείκτες(μ.δ.) οι γενότυποι μπορούν να προσδιοριστούν όχι μόνο σε επίπεδο ατόμου αλλά και σε επίπεδου ενός ιστού ή και κυττάρου
- b) Στους περισσότερους μ.δ. απουσιάζει η επίδραση του περιβάλλοντος και η κυριαρχία
- c) Οι περισσότεροι μ.δ. παρουσιάζουν αρκετή ποικιλομορφία

- d) Οι μ.δ. δεν προκαλούν ανεπιθύμητες αλλαγές στο φαινότυπο
- e) Οι μ.δ. στην πλειονότητα τους ανιχνεύονται χωρίς επιστατικές αλληλεπιδράσεις, έτσι μπορεί να επιλέγονται στον ίδιο πληθυσμό περισσότεροι από ένας μ.δ. ταυτόχρονα. (Φανουράκης 2002)

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).

Στους μ.δ. περιλαμβάνονται δείκτες πρωτεϊνών (ισοένζυμα) καθώς και δείκτες νουκλεϊκών οξέων (RFLP, RAPD, MICROSATELLITES), όπως θα δούμε στη συνέχεια. Αρχικά, αξίζει να αναφερθεί η Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης για το λόγο ότι οι περισσότερες από τις μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται βασίζονται εν μέρει στη χρήση της, ώστε να επιτυγχάνεται και να ενισχύεται ο πολυμορφισμός.

3.2 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)

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. (Wong 2005)

Η PCR ανακαλύφθηκε το Δεκέμβριο του 1983 από τον **Kary Mullis** (Mullis 1983). 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 (Wong 2005).

Η τεχνική PCR στηρίζεται στην δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται οποιαδήποτε περιοχή του DNA εάν είναι γνωστές οι αλληλουχίες των άκρων της. Για τον πολλαπλασιασμό μιας περιοχής χρησιμοποιούνται εκκινητές και στα δύο άκρα της περιοχής αυτής, οι εκκινητές είναι μικρά τμήματα μονόκλωνα του DNA συνήθως μεγέθους 15-20 νουκλεοτιδίων, τα οποία είναι συμπληρωματικά του τμήματος αυτού

του DNA στο 5' άκρο και είναι απαραίτητα για να αρχίσει την αντιγραφή της αλυσίδας η DNA πολυμεράση. Για τον πολλαπλασιασμό ενός δίκλωνου τμήματος DNA είναι απαραίτητοι δύο εκκινητές, ένας για το 5' άκρο της κάθε αλυσίδας. (Φανουράκης 2002)

Η τεχνική PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη: μπορεί να ανιχνεύσει, έστω και ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, επαυξάνοντας το τόσο πολύ ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί με κατάλληλη χρώση μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης (Φανουράκης 2002).

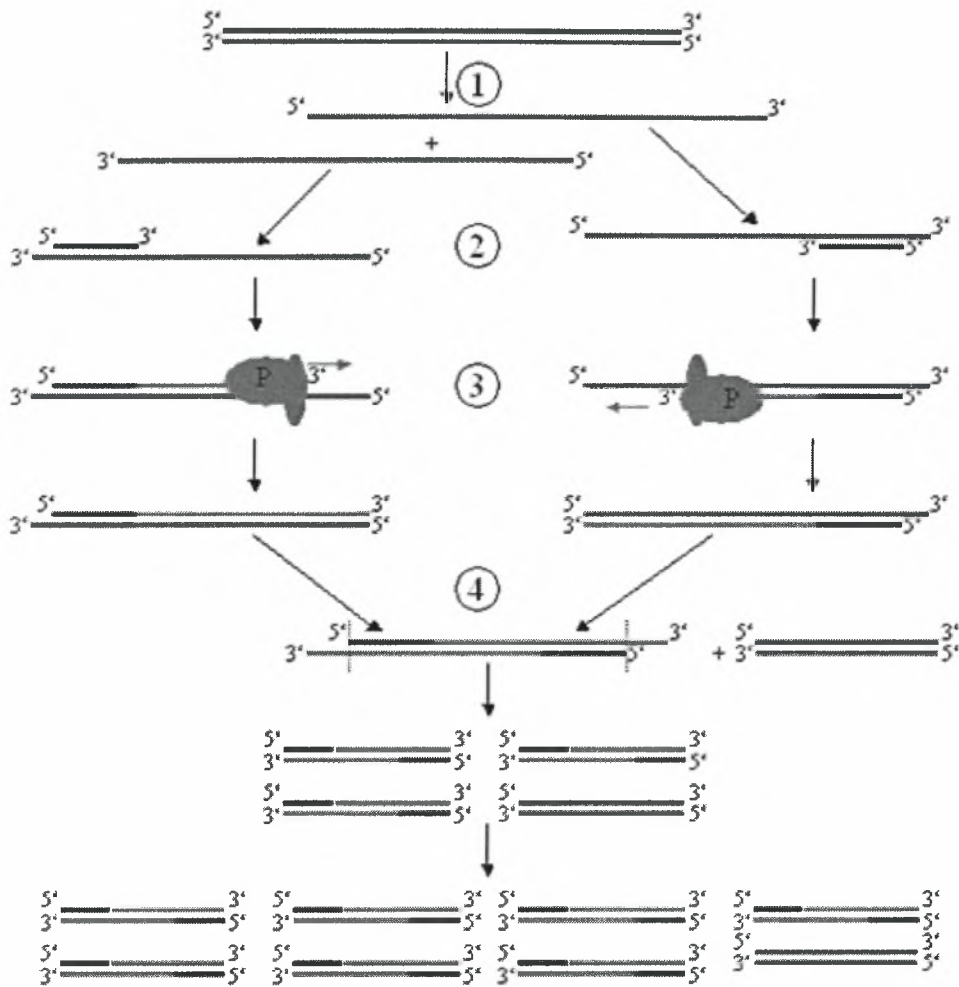
Η διαδικασία της PCR αποτελείται από είκοσι μέχρι τριάντα κύκλους και κάθε κύκλος περιλαμβάνει τα ακόλουθα τρία στάδια:

(1) Αποδιάταξη και διαχωρισμός του δίκλωνου μορίου του DNA. Επιτυγχάνεται με θέρμανση περίπου στους 92-96°C για 1-2 λεπτά. Η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δυο αλυσίδες μεταξύ τους και έτσι διαχωρίζονται.

(2) Η θερμοκρασία μειώνεται 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 για 1-2 λεπτά 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.

(3) Τέλος, η **επέκταση**, αυξάνεται και πάλι η θερμοκρασία, η οποία εξαρτάται από τη DNA-πολυμεράση για να γίνει η αντίδραση πολυμερισμού από το ένζυμο, το οποίο συνθέτει τις αντίστοιχες αλληλουχίες στη κάθε αλυσίδα που συγκολλήθηκαν οι εκκινητές. Ο χρόνος που διαρκεί εξαρτάται από το ένζυμο και από το μήκος του τμήματος του DNA που πρέπει να ενισχυθεί.

Για να αποφεύγεται η καταστροφή της DNA πολυμεράσης από τη θέρμανση που γίνεται σε κάθε κύκλο πολυμερισμού, χρησιμοποιείται η ταq DNA πολυμεράση, η οποία έχει απομονωθεί από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι ανθεκτική στην υψηλή θερμοκρασία. (Φανουράκης 2002)



Εικόνα 6. Τα στάδια της PCR: (1) Αποδιάταξη, (2) Συγκόλληση, (3) Επέκταση, P = πολυμεράση, (4) Τέλος πρώτου κύκλου (<http://www.ja.wikipedia.org>)

3.3 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. (Allen & Bodowle 1994). Οι εκκινητές δεν είναι συγκεκριμένοι αλλά επιλέγονται τυχαία, ώστε να στοχεύουν σε άγνωστες αλληλουχίες DNA. Έτσι κάθε εκκινητής μπορεί να συνδέεται με καμία, μία ή πολλές θέσεις στο μόριο DNA. Το αποτέλεσμα είναι ότι πολλαπλασιάζονται για το DNA κάθε ατόμου ανισομεγέθη τμήματα. (Φανουράκης 2002)

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 μονόκλιωνα 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 (μονόκλιωνα DNA) (Allen & Bodowle 1994)

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

Η μέθοδος RAPD χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να εκτιμηθεί η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ πληθυσμών της αφίδας *M. persicae* (Zitoudi et al. 2001).

3.4 Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Restriction Fragment Length Polymorfism, 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).

Με την τεχνική RFLP προσδιορίζονται οι διαφορές που παρουσιάζουν διαφορετικά άτομα ως προς το μήκος και τον αριθμό τμημάτων DNA τα οποία προέρχονται από πέψη με περιοριστικά ένζυμα. (Φανουράκης 2002)

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. Εκκινητές με συντηρητική αλληλουχία χρησιμοποιούνται για την ενίσχυση συγκεκριμένων τμημάτων DNA (Sunpuks 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).

Οι δείκτες RAPD πλεονεκτούν έναντι των δεικτών RFLP διότι η διαδικασία είναι απλούστερη και γρηγορότερη, είναι φθηνότερη και χρειάζεται λιγότερη εργασία και εξοπλισμό. Επίσης, είναι ασφαλέστερη λόγω της μη χρήσης ραδιενεργού σήμανσης. Όλες οι μεθοδολογίες που βασίζονται σε PCR απαιτούν μικρή ποσότητα DNA. Κάθε μεθοδολογία, έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα και για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η αξιολόγηση της πιθανής χρησιμότητας της κάθε μιας (Χατζόπουλος 2001, Φανουράκης 2002, Beebe & Rowe 2004).

4 ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΟΙ (MICROSATELLITES)

4.1 Γενικά

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, περίπου το 70 % του συνολικού DNA αποτελείται από το αποκαλούμενο DNA με μοναδική αλληλουχία (unique sequence DNA). Σε αυτό περιλαμβάνεται το DNA που κωδικοποιεί πρωτεΐνες, τα περισσότερα είδη του RNA και το DNA των ιντρονίων. Στο υπόλοιπο 30 % περιλαμβάνονται αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που επαναλαμβάνονται πολλές φορές στο γονιδίωμα. Το μεγαλύτερο μέρος αυτού του επαναλαμβανόμενου DNA δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες και διακρίνεται σε δυο είδη. Περίπου το ένα τρίτο αποτελείται από επαναληπτικές βραχείες αλληλουχίες που σχηματίζουν μια σειρά από συστοιχίες επαναλήψεων του DNA γνωστές ως **δορυφορικό DNA** (satellite DNA). Το δορυφορικό DNA δεν έχει κάποια γνωστή λειτουργία και συνήθως συγκεντρώνεται στα κεντρομερίδια και στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Στο δορυφορικό DNA υπάρχουν συνδυασμοί ζευγών νουκλεοτιδίων, οι οποίοι επαναλαμβάνονται και σχηματίζουν ομάδες γνωστές ως **μικροδορυφόρους** (microsatellites). Μέσα στο γένωμα μπορεί να υπάρχουν τυχαία κατανομημένοι, χιλιάδες ή εκατοντάδες χιλιάδες μικροδορυφόροι (Sunpuks 2000, Beebees & Rowe 2004).

Το μικροδορυφορικό DNA είναι ακολουθίες δύο έως τεσσάρων βάσεων που επαναλαμβάνονται σχηματίζοντας μικρά τεμάχια DNA κατεσπαρμένα σε πολλές περιοχές του χρωμοσώματος. Οι επαναλαμβανόμενες μονάδες είναι κυρίως δινουκλεοτίδια AT, και σπανιότερα τρι-, ή τετρανουκλεοτίδια, τα οποία μπορεί να επαναλαμβάνονται από 10 έως 100 φορές. Πολλά από τα επαναλαμβανόμενα τμήματα έχουν τη τάση να συγκεντρώνονται σε ένα συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο (locus). Στους διπλοειδείς οργανισμούς, όπως τα θηλαστικά, κάθε ένα άτομο πρέπει

να έχει δυο αντίγραφα του ίδιου μικροδορυφόρου (Γούναρης 2000, Goldstein & Schlotterer 1999, Beebe & Rowe 2004).

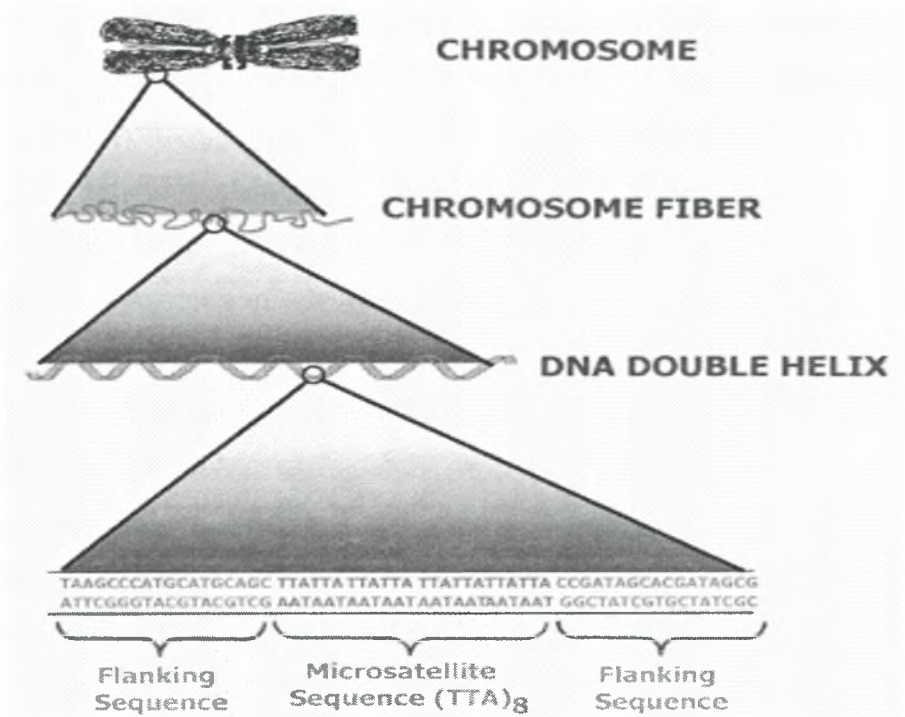
Οι πρώτοι μικροδορυφόροι που αναγνωρίστηκαν, ήταν επαναλαμβανόμενα δι-νουκλεοτίδια και συχνά αποκαλούνταν επαναλήψεις "Ka-Ka" ή "CACACACACA ...". Τέτοιου είδους μικροδορυφόροι απαντώνται πολύ συχνά στο ανθρώπινο γένωμα και παρουσιάζονται ανά μερικές χιλιάδες ζεύγη βάσεων. Η παραλλακτικότητα της δυναμικής ενός επαναλαμβανόμενου δι-νουκλεοτιδίου εξαρτάται συνήθως από το μέγεθός του. Δηλαδή, όταν ένα δι-νουκλεοτίδιο επαναλαμβάνεται περισσότερες από 10-15 φορές χωρίς διακοπές, έχει τάση για πολυμορφισμό. Μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων μέσα στο μικροδορυφόρο σημαίνει και μεγαλύτερο πολυμορφισμό (Kashi & Soller 1999, Schlotterer 2000, Goldstein & Schlotterer 1999).

Μέσα στο γονιδίωμα οι περισσότερες τοποθεσίες, ακόμη και οι μη κωδικοποιημένες, παρουσιάζουν τόσο πολλές ομοιότητες που είναι πολύ δύσκολο βάση αυτών να γίνει αξιόπιστος διαχωρισμός μεταξύ ατόμων. Τέτοιου είδους τοποθεσίες λόγω της αστάθειας και της τάσης που έχουν να μεταλλάσσονται σε διαφορετικού μεγέθους αλληλουχίες, χρησιμοποιούνται όλο και λιγότερο σε μελέτες εξέλιξης των ειδών. Όσον αφορά όμως τις αλληλουχίες των μικροδορυφόρων, ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων τμημάτων σε μια συγκεκριμένη τοποθεσία είναι ευμετάβλητος (ισχυρά πολυμορφικός) μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους. Για αυτό ακριβώς το λόγο οι αλληλουχίες των μικροδορυφόρων μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως γενετικό εργαλείο σε εργασίες που αφορούν την εύρεση γενετικού αποτυπώματος καθώς και σε test πατρότητας.

Η υψηλή παραλλακτικότητα των μικροδορυφόρων οφείλεται στο γεγονός ότι οι απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες προκαλούν πολύ συχνά απώλεια ή εισαγωγή συμπληρωματικών τμημάτων συγχέοντας το μηχανισμό αντιγραφής του DNA.

Σε ένα πληθυσμό είναι δυνατό να υπάρχουν πολλά αλληλόμορφα που προκύπτουν από ένα μικροδορυφόρο. Τα αλληλόμορφα αυτά διαφέρουν στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων τμημάτων του μικροδορυφόρου. Για παράδειγμα ένα αλληλόμορφο μπορεί να έχει 7 επαναλήψεις του δι-νουκλεοτιδίου CT και κάποιο άλλο να έχει 8. Σε ένα πληθυσμό είναι δυνατό να υπάρχουν 70 με 80 αλληλόμορφα σε μια γενετική τοποθεσία και το κάθε ένα να έχει διαφορετικό μήκος.

Ένα άτομο που είναι ομοζύγωτο, έχει τον ίδιο αριθμό επαναλαμβανόμενων τμημάτων και στα δυο χρωμοσώματα ενώ ένα ετεροζύγωτο έχει διαφορετικό αριθμό επαναλαμβανόμενων τμημάτων στα δυο χρωμοσώματα.



Εικόνα 7 Ανατομία ενός μικροδορυφόρου

Οι περιοχές του γενώματος που βρίσκονται γύρω από τον μικροδορυφόρο ονομάζονται πλευρικές (**flanking regions**) και έχουν την ίδια αλληλουχία ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα. Αν οι περιοχές αυτές είναι γνωστές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βάση για το σχεδιασμό εκκινητών για τη PCR ενίσχυση της περιοχής του μικροδορυφόρου. Επιπλέον οι περιοχές αυτές μπορούν να διατηρηθούν μεταξύ ατόμων του γένους και πολλές φορές ακόμα και μεταξύ οικογενειών. Παρακάτω παρουσιάζεται η αλληλουχία δυο ομόλογων χρωμοσωμάτων ενός διπλοειδούς οργανισμού (ένας κλώνος από κάθε χρωμόσωμα) (Kashi & Soller 1999, Schlotterer & Christian 2000).

✓ **Ομοζυγώτης:** Και οι δυο κλώνοι των χρωμοσωμάτων έχουν 7 επαναλήψεις CT.

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTTACTACGTGG...
...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTTACTACGTGG...

5' πλευρική περιοχή

μικροδορυφόρος

3' πλευρική περιοχή

✓ **Ετεροζυγώτης:** Ένας κλώνος έχει 7 επαναλήψεις ενώ ο άλλος έχει 8

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTTACTACGTGG...
...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTTACTACGTGG...

Όταν εξεταστεί ένας συγκεκριμένος μικροδορυφόρος σε πολλά άτομα π.χ. του *M. persicae* που προήλθαν από διαφορετικές περιοχές, είναι πιθανό να παρουσιαστεί, σε ορισμένα, μεγάλος βαθμός παραλλακτικότητας στην τοποθεσία του μικροδορυφόρου. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι πολύ καλό γιατί επιτρέπει στους επιστήμονες να χρησιμοποιήσουν τη συγκεκριμένη περιοχή του μικροδορυφόρου ως έναν δυνητικό δείκτη και επιπλέον να εκμεταλλευτούν την παραλλακτικότητα της περιοχής αυτής προκειμένου να διαχωρίσουν είδη, οικογένειες ή ακόμα και πληθυσμούς ζώων. Η παραλλακτικότητα που παρουσιάζει ένας μικροδορυφόρος οφείλεται στο διαφορετικό αριθμό νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν μια αλληλουχία. Έτσι κάθε περιοχή με διαφορετικό αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων, απαρτίζει ένα **αλληλόμορφο**. Τέλος η περιοχή που εμφανίζει παραλλακτικότητα ως προς ένα μικροδορυφόρο είναι γνωστή σαν **πολυμορφική περιοχή** (Beebe & Rowe 2004).

Οι μικροδορυφόροι στις γενετικές μελέτες χρησιμοποιούνται ως μοριακοί δείκτες. Αυτό σημαίνει ότι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές στις πλευρικές περιοχές του μικροδορυφόρου ενισχύουν μέσω αντίδρασης PCR τον μικροδορυφορικό τόπο. Τα προϊόντα της PCR εξετάζονται μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Στην πηκτή τα προϊόντα αυτά εμφανίζονται σαν ζώνες. Συνήθως, στην πηκτή διακρίνονται και κάποιες επιπλέον αχνές ζώνες που είναι ελαφρώς μεγαλύτερου μεγέθους από τις κανονικές. Αυτό συμβαίνει γιατί κατά τη διάρκεια της PCR δεν γίνεται σωστός διαχωρισμός και κάποια αντίγραφα αποκτούν ένα ή περισσότερα επαναλαμβανόμενα τμήματα και γίνονται μεγαλύτερα σε μήκος. Σε εξελιγμένα εργαστήρια υπάρχουν και μηχανήματα αλληλούχισης (sequencer) στα οποία μπορεί επίσης να γίνει η ανάλυση των ενισχυμένων προϊόντων (Allen & Budowle 1994, Beebe & Rowe 2004).

Οι μικροδορυφόροι βρίσκονται σε όλα τα φυτά και τα ζώα καθώς και σε πολλά είδη βακτηρίων. Κάποιοι μπορεί να βρίσκονται στην ίδια τοποθεσία του γονιδιώματος, όταν πρόκειται για ίδια ή πολύ στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους είδη. Αυτό σημαίνει ότι αν βρεθεί ένας κατάλληλος μικροδορυφόρος π.χ. για το *M. persicae*, μπορεί να γίνει αναγνώριση και διαχωρισμός ατόμων αυτού του είδους άσχετα με την τοποθεσία από την οποία προήλθαν οι συγκεκριμένες αφίδες (Beebe & Rowe 2004).

4.2 Οι μικροδορυφόροι ως γενετική μέθοδο

Οι μικροδορυφόροι, όπως ήδη αναφέρθηκε, παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα. Σε μια τοποθεσία του γονιδιώματος, ένα άτομο μπορεί να έχει 10 επαναλήψεις ενός μικροδορυφόρου ενώ ένα άλλο άτομο του ίδιου είδους να έχει 15 ή 20. Η εξήγηση αυτού του φαινομένου δίνεται μέσω της ιδιότητας που έχουν οι μικροδορυφόροι να αλλάζουν μορφή πάρα πολύ γρήγορα. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται κυρίως σε μεταλλάξεις που συμβαίνουν με την πάροδο του χρόνου. Έχει υπολογιστεί ότι οι μικροδορυφόροι μεταλλάσσονται 100 με 10.000 φορές, δηλαδή τόσο γρήγορα όσο διαρκεί η υποκατάσταση των ζευγών βάσεων σε μια αλληλουχία. Αυτή η ιδιότητα καθιστά τους μικροδορυφόρους χρήσιμο εργαλείο σε μελέτες εξέλιξης των ειδών, όταν αυτή έχει διαδραματιστεί σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (εκατοντάδες ή χιλιάδες χρόνια). Αντίθετα η υποκατάσταση των ζευγών βάσεων δίνει χρήσιμες πληροφορίες για την εξέλιξη των ειδών σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (εκατομμύρια χρόνια) (Beebe & Rowe 2004).

Οι μικροδορυφόροι, οι οποίοι καθορίζουν την παραλλακτικότητα σε κάθε τοποθεσία του γενώματος, χαρακτηρίστηκαν από τους επιστήμονες σαν νέα αλλοένζυμα. Συνεπώς χρησιμοποιούνται κυρίως σε εργασίες όπου παλιότερα χρησιμοποιούνταν τα αλλοένζυμα. Τέτοιου είδους εργασίες αφορούν π.χ. τη γονιδιακή ροή και τη γενετική δομή των πληθυσμών (Wilson et al. 2002), τη γενετική παραλλακτικότητα (Fuentes et al. 2004), το διαχωρισμό μεταξύ ειδών, όπως π.χ. η χρήση μικροδορυφόρων, για το διαχωρισμό του *Myzus antirrhinii* (Macchiati) (Hemiptera: Aphididae) από το *M. persicae* σε μια μελέτη που έγινε στην Αυστραλία το 2000 από τους Hales et al. (2000). Σε άλλη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν 15 μικροδορυφόροι προκειμένου να διαχωριστούν ομάδες του *M. persicae* και να μελετηθούν αναλογίες εμφάνισης αρσενικών και θηλυκών ατόμων (Sloane et al. 2001). Υπάρχουν όμως μόνο λίγες φυλογενετικές εργασίες στις οποίες χρησιμοποιούνται οι μικροδορυφόροι σαν μοριακοί δείκτες.

Οι Wilson et al. (2002) στην Αυστραλία, μελέτησαν τη γενετική δομή πληθυσμών της αφίδας *M. persicae*, συλλέγοντας πληθυσμούς του εντόμου από τον κύριο ξενιστή του, τη ροδακινιά *Prunus persicae* L. (Rosaceae). Το *M. persicae* βρίσκεται στην Αυστραλία από το 1893. Τα δείγματα συλλέχθηκαν την άνοιξη του 1998 από δυο περιοχές της ενδοχώρας και τρεις περιοχές της Τασμανίας. Οι ερευνητές εξέτασαν το βιολογικό κύκλο των αφίδων, τον καρυότυπό τους και τη γενετική δομή τους χρησιμοποιώντας 17 μικροδορυφόρους.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι πληθυσμοί διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ακόμη και αυτοί που προέρχονταν από κοντινές γεωγραφικές αποστάσεις (<50 km). Όλοι οι κλώνοι είχαν φυσιολογικό καρυότυπο εκτός από μια ομάδα κλώνων οι οποίοι μια εβδομάδα πριν συλλεχθούν δέχτηκαν την επίδραση του καρβαμιδικού εντομοκτόνου pirimicarb. Οι συγκεκριμένοι κλώνοι ήταν ετεροζυγώτες και παρουσίαζαν A1, 3 χρωμοσωμική μετατόπιση, φαινόμενο που στο συγκεκριμένο έντομο είναι πολύ στενά συνδεδεμένο με ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα.

Οι Fuentes et al. (2004) μελέτησαν τη γενετική παραλλακτικότητα και την ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα της αφίδας *M. persicae*, χρησιμοποιώντας πληθυσμούς του εντόμου που συλλέχθηκαν σε χωράφια καπνού στη Χιλής. Η συλλογή των εντόμων έγινε σε 35 χωράφια καπνού τα οποία κάλυπταν μια απόσταση 300 km. Ο χαρακτηρισμός των πληθυσμών που προέκυψαν από αυτές τις δειγματοληψίες έγινε με τη χρήση μικροδορυφόρων και της μεθόδου της σωματομετρίας. Όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν βρέθηκαν ανολοκυκλικά και παρουσίασαν μορφολογική παραλλακτικότητα σε ένα αναμενόμενο εύρος για το υποείδος *M. persicae nicotianae* που τρέφεται στο καπνό. Σημαντικό ήταν το εύρημα ότι όλοι οι κλώνοι που εξετάστηκαν ήταν ο ίδιος γενότυπος.

Υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες έγιναν παλιότερα με βιοχημικούς και μοριακούς δείκτες αλλά για επαλήθευση των αποτελεσμάτων επαναλήφθηκαν με τη πιο ακριβή μέθοδο των μικροδορυφόρων.

Κάποιες άλλες εργασίες αφορούν διαιδικές εφαρμογές των μικροδορυφόρων. Οι πρώτες μελέτες που έγιναν με μικροδορυφόρους περιορίστηκαν στην εξέταση ενός μόνο taxon, εκείνου για το οποίο είχαν σχεδιαστεί οι εκκινητές. Αυτό συνέβαινε γιατί επικρατούσε η αντίληψη ότι οι μικροδορυφόροι δεν μπορούσαν να ενισχύσουν τμήματα DNA ειδών διαφορετικών από αυτά για τα οποία είχαν σχεδιαστεί. Αργότερα όμως με κάποιες δημοσιευμένες εργασίες, αποδείχτηκε ότι κάποιοι εκκινητές SSR μπορούν να ενισχύσουν την ίδια περιοχή μεταξύ συγγενικών taxa. Αυτό το γεγονός κίνησε το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων να ασχοληθούν με φυλογενετικά θέματα καθώς και με την εύρεση γενετικών αποστάσεων και συσχετίσεων μεταξύ συγκεκριμένων ειδών (Kashi & Soller 1999, Schlotterer & Christian 2000).

Μια τέτοιου είδους μελέτη έγινε από τους Wilson et al. (2004). Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν 48 γνωστοί μικροδορυφόροι αφίδων στις ακόλουθες κατηγορίες: Aphidinae: Aphidini: *Aphis* και *Rhopalosiphum*, Aphidinae: Macrosiphini:

Acyrtosiphum, *Brevicoryne*, *Diuraphis*, *Illinoia*, *Macrosiphoniella*, *Macrosiphum*, *Metopeurum*, *Metopolophium*, *Myzus*, *Phorodon*, *Sitobion* και *Uroleucon* και Neucuenaphidinae: *Neucuenaphis*. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας έδειξαν ότι η διαειδική εφαρμογή γνωστών μικροδορυφόρων είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες γενετικής πληθυσμών καθώς και σε εξελικτικές μελέτες αφίδων.

4.2.1 Πλεονεκτήματα

Το μεγάλο πλεονέκτημα της μικροδορυφορικής ανάλυσης είναι ο μεγάλος πολυμορφισμός που παρουσιάζει. Η ικανότητα της μεθόδου να διαχωρίζει άτομα όταν εξετάζεται ένας συνδυασμός τοποθεσιών του γενώματος καθιστά την τεχνική πολύ χρήσιμη για μελέτες γονιδιακής ροής και αναλύσεων πατρότητας. Οι μικροδορυφόροι αξιολογούν μόνο μια τοποθεσία κάθε φορά έτσι συγκρίσεις των μικροδορυφόρων, όσον αφορά την ακρίβειά τους, πρέπει να γίνονται μόνο με μοριακές μεθόδους που αξιολογούν επίσης μια μόνο τοποθεσία του γονιδιώματος. Τέτοιου είδους τεχνικές όπως είναι τα RFLP και τα ισοένζυμα σαφώς και παρουσιάζουν πολύ μικρότερο ποσοστό πολυμορφισμού έναντι των μικροδορυφόρων (Robinson & Harris 1999).

Σε αντίθεση με τα AFLP, οι μικροδορυφόροι είναι συγκυρίαρχοι δείκτες και επομένως μπορούν πολύ εύκολα να αναγνωρίσουν τα ετεροζύγωτα άτομα. Αυτή η ικανότητα είναι πολύ σημαντική, γιατί όταν η αναγνώριση αυτών των ατόμων γίνεται στην F₁ γενιά καθιστά τις αναλύσεις που θα ακολουθήσουν πολύ πιο εύκολες. Η συγκυριαρχία των μικροδορυφόρων αυξάνει τη δραστηριότητα και την ακρίβεια των γενετικών χαρακτηριστικών ενός πληθυσμού, κάτι το οποίο δεν συμβαίνει με τη χρήση άλλων μοριακών δεικτών όπως τα AFLP και τα RAPD (Schlötterer & Pemberton 1994).

Ένα άλλο βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου, εφόσον βασίζεται στο DNA των οργανισμών, είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν νεκροί ιστοί. Μπορούν επομένως να αναλυθούν ακόμη και ιστοί που διατηρούνται σε ορισμένες συνθήκες για αρκετά χρόνια.. Έτσι, λοιπόν, η μικροδορυφόροι χρησιμοποιούνται ευρέως και σε φυλογενετικές μελέτες.

Τέλος, άλλα δυο μεγάλα πλεονεκτήματα της χρήσης των μικροδορυφόρων είναι ότι η γενοτύπηση είναι μια σχετικά οικονομική διαδικασία και επιπλέον ότι η διαειδική εφαρμογή τους τους καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμους μεταξύ συγγενικών taxa.

Δηλαδή, αν ένας μικροδορυφόρος αποκαλύπτει π.χ. 20 αλληλόμορφα σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γενόματος ενός είδους, μπορεί κάποιο από αυτά να τα εντοπίσει και σε ένα συγγενικό είδος.

4.2.2 Μειονεκτήματα

Τα προβλήματα που παρουσιάζει η χρήση των μικροδορυφόρων χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες.

(1).Πρακτικά προβλήματα. Στη περίπτωση που δεν υπάρχουν αποτελέσματα με τη χρήση συγκεκριμένων μικροδορυφόρων από προηγούμενες μελέτες, πρέπει να γίνει γενοτύπηση του οργανισμού που εξετάζεται, με σκοπό την εύρεση μικροδορυφόρων. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι γενοτύπησης οι περισσότερες από τις οποίες όμως είναι ιδιαίτερα πολύπλοκες και ακριβές. Επιπλέον, η διαδικασία αυτή μπορεί να καταλήξει σε έναν πολύ μικρό αριθμό μικροδορυφόρων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν (Kelley & Willis 1998).

Ένα ακόμη μειονέκτημα, που αφορά τη μικροδορυφορική ανάλυση με αυτόματο μηχάνημα αλληλούχισης (sequencer), είναι η διαφορά που παρουσιάζεται ορισμένες φορές στο μέγεθος των αλληλομόρφων. Δηλαδή υπάρχει διαφορά μεταξύ του μεγέθους που εκτιμάει το μηχάνημα και του μεγέθους που πραγματικά έχει ένα αλληλόμορφο. Για να μειωθούν τέτοιου είδους προβλήματα πρέπει πρώτα να καθορίζονται τα μεγέθη των αλληλομόρφων με αλληλούχιση και στη συνέχεια τα νούμερα αυτά να χρησιμοποιούνται ως όρια κατά τη διαδικασία ανάλυσης των αποτελεσμάτων σε πηκτή.

(2).Προβλήματα στην εξαγωγή αποτελεσμάτων

Το φαινόμενο κατά το οποίο δυο αλληλόμορφα είναι ταυτόσημα λόγω τυχαίου γεγονότος και όχι λόγω κοινής προέλευσης ονομάζεται Ομολογία/Ομοπλασία. Πρόκειται για το μεγαλύτερο πρόβλημα που αντιμετωπίζουν οι επιστήμονες όταν χρησιμοποιούν μικροδορυφόρους σε φυλογενετικές αναλύσεις και σε μελέτες πληθυσμών διότι, μπορεί να οδηγήσει σε υποτίμηση των παρατηρούμενων διαφορών μεταξύ των ατόμων και επομένως σε λάθος συμπεράσματα. Ο μόνος τρόπος για να εντοπιστεί η ομοπλασία είναι η εξέταση πολλών γενετικών τόπων (Goodman 1998).

Ένα άλλο πρόβλημα που παρουσιάζεται με την ομολογία, είναι κατά την ανάλυση σύνθετων επαναλαμβανόμενων τμημάτων. Συγκεκριμένα αν ένας μικροδορυφόρος έχει την αλληλουχία 5'-(CT)₁₀CA(CT)₈-3' και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης προκύψει ένα δεύτερο αλληλόμορφο μεγαλύτερο κατά δυο ζεύγη βάσεων,

χωρίς να γίνει αλληλούχιση, είναι αδύνατο να διαπιστωθεί ποιο ακριβώς τμήμα αυξήθηκε σε μέγεθος. Αν δηλαδή π.χ. το αλληλόμορφο έχει την αλληλουχία 5'-(CT)₁₁CA(CT)₈-3' ή 5'-(CT)₁₀CA(CT)₉-3'. Όταν εξετάζονται σύνθετοι μικροδορυφόροι αναμένεται μεγάλο ποσοστό μη ομόλογων τμημάτων. Αυτό λοιπόν που συνιστάται από τους επιστήμονες για να περιοριστούν τα λάθη κατά τη διαδικασία της γενοτύπισης, είναι η χρήση μικροδορυφόρων με απλά επαναλαμβανόμενα τμήματα.

Η πιο σημαντική ανακρίβεια που μπορεί να προκύψει από την ομολογία εντοπίζεται μέσα στην επαναλαμβανόμενη μονάδα. Υπάρχει δηλαδή πάντα η απορία για το αν δυο τμήματα που συν-μεταναστεύουν είναι όμοια λόγω προέλευσης ή απλά γιατί έτυχε λόγω μετάλλαξης. Δεν υπάρχει απλή απάντηση σε αυτό το θέμα και φαίνεται ότι δεν απασχολεί ιδιαίτερα τους επιστήμονες αν και θα έπρεπε διότι κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα.

Μηδενικά αλληλόμορφα (Null Alleles). Οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν στην περιοχή σύνδεσης του ενός ή και των δυο μικροδορυφόρων που χρησιμοποιούνται σαν εκκινήτες, είναι δυνατόν να παρεμποδίσουν το στάδιο της συγκόλλησης κατά τη διαδικασία της PCR (Callen et al. 1993). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την απώλεια των αναμενόμενων προϊόντων. Τέτοιου είδους προϊόντα ονομάζονται μηδενικά .

Αυτού του είδους τα αλληλόμορφα μπορεί να μην εμφανίζονται καθόλου ή να παρουσιάζονται ως αλληλόμορφα μικρότερου μεγέθους, με αποτέλεσμα να γίνεται λανθασμένη εξαγωγή αποτελεσμάτων

(3).Προβλήματα στην ανάλυση

Η παραλλακτικότητα των μικροδορυφόρων μπορεί να αναλυθεί φυλογενετικά με δυο τρόπους: 1) την παρουσία ή απουσία αλληλομόρφων και στη συνέχεια υπολογισμό της απόστασής τους ή χρησιμοποίηση μεθόδων υπολογισμού του μεγέθους τους και 2) τη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων σε μια γενετική τοποθεσία και χρήση μεθόδων για τον υπολογισμό της μεταξύ τους απόστασης.

Παρουσία/Απουσία. Καμία από τις μεθόδους που εμπλέκονται με την παρουσία ή απουσία αλληλομόρφων δεν χρησιμοποιείται στην εκτίμηση σχέσεων. Επίσης, οι μικροδορυφόροι έχουν επιπρόσθετες πηγές σφάλματος, όπως είναι η μη ομολογία των ζωνών τους καθώς και η παρουσία των άκυρων αλληλομόρφων (Murphy 1993).

Συχνότητα αλληλομόρφων. Ο υπολογισμός της συχνότητας εμφάνισης των αλληλομόρφων σε κάθε γενετική τοποθεσία δεν χρησιμοποιείται εκτενώς σε φυλογενετικές αναλύσεις, λόγω κυρίως των δυσκολιών που υπάρχουν στη κωδικοποίηση των δεδομένων. Η συχνότητα των αλληλομόρφων είναι ένα χαρακτηριστικό των μικροδορυφόρων που έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές.

4.3 Σχετικές μελέτες

Σύμφωνα με τα παραπάνω μπορεί να γίνει κατανοητό ότι η γενετική παραλλακτικότητα είναι άμεσα συνδεδεμένη με την εξέλιξη ενός οργανισμού. Οι οργανισμοί που απασχολούν την παρούσα διατριβή είναι οι αφίδες, οπότε είναι απαραίτητο να αναφερθούν κάποιες εργασίες που ασχολήθηκαν με τη γενετική παραλλακτικότητα σε σχέση με τις αφίδες.

Οι Wilson et al. (2003) δημοσίευσαν μια εργασία που ασχολήθηκε με την κληρονομική γενετική παραλλακτικότητα και τη δυνατότητα εξέλιξης των αφίδων σε μη σεξουαλικές μορφές. Ο βιολογικός κύκλος των αφίδων μπορεί να περιέχει: κυκλική παρθενογένεση, υποχρεωτική παρθενογένεση, υποχρεωτική παρθενογένεση με ταυτόχρονη παραγωγή αρσενικών ατόμων καθώς και μια ενδιάμεση στρατηγική όπου ένας γενότυπος διαχειμάζει αναπαραγόμενος με παρθενογένεση και ταυτόχρονα επενδύει σε σεξουαλικά αναπαραγόμενα ωά. Οι αφίδες που απασχόλησαν τη συγκεκριμένη μελέτη αναπαράγονταν εξ ολοκλήρου παρθενογενετικά. Στοιχεία συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για την εξέλιξη και την επιμονή των συγκεκριμένων γενοτύπων με το πέρασμα του χρόνου. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μια εξαιρετική συγκεντρωτική αναφορά των μελετών, που έχουν γίνει προκειμένου να αναγνωριστούν γενότυποι αφίδων που έχουν εξαπλωθεί γεωγραφικά και χρονικά. Επίσης, αποτελεί μια πολύ χρήσιμη πηγή που βοηθά στην κατανόηση της βιολογίας των αφίδων και στο ρόλο που παίζει η γενετική παραλλακτικότητα (Wilson et al., 2003).

Οι Guillemaud et al. (2003) εξέτασαν τη χωρική και χρονική γενετική παραλλακτικότητα σε πληθυσμούς του εντόμου *M. persicae* από διάφορες περιοχές της Γαλλίας με την ανάλυση **μικροδορυφορικού DNA**. Το συγκεκριμένο έντομο έχει πολύπλοκο βιολογικό κύκλο. Δηλαδή, μερικά άτομα αναπαράγονται με συνεχή παρθενογένεση ενώ κάποια άλλα αναπαράγονται σεξουαλικά μόνο μια φορά το χρόνο. Αυτό που φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο αυτή τη συμπεριφορά είναι η σχετική αφθονία της ροδακινιάς στις συγκεκριμένες περιοχές καθώς και οι κλιματικές

συνθήκες, εφόσον τα σεξουαλικά ωά είναι η μόνη μορφή που μπορεί να αντέξει την παγωνιά (Margaritopoulos et al. 2002, Vorburger et al. 2003). Η σεξουαλική αναπαραγωγή προϋποθέτει υποχρεωτική εναλλαγή ξενιστών, κάτι που μπορεί να καταλήξει σε διασπορά του εντόμου σε μεγάλες αποστάσεις. Αποδείχτηκε ότι ο τρόπος αναπαραγωγής επηρεάζει τη γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών του εντόμου. Οι αφίδες που αναπαράγονται με **κυκλική παρθενογένεση** (δηλαδή, έχουν μια σεξουαλική γενιά το φθινόπωρο) παρουσιάζουν μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα σε σχέση με αυτές που αναπαράγονται μόνο παρθενογενετικά. Επίσης οι ερευνητές διαπίστωσαν εποχική μείωση της γενετικής παραλλακτικότητας και εποχική γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών της αφίδας. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η επιλογή (καλλιεργητικές πρακτικές, χρήση εντομοκτόνων) αποτελεί σημαντικό παράγοντα διαμόρφωσης της γενετικής δομής των πληθυσμών του εντόμου (Guillemaud et al. 2003).

Οι Zitoudi et al. (2001) μελέτησαν τη γενετική παραλλακτικότητα πληθυσμών του *M. persicae* σε σχέση με τον ξενιστή και την κατηγορία του βιολογικού κύκλου. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκε η μέθοδος RAPD-PCR σε 96 κλώνους του εντόμου *M. persicae* που αντιπροσώπευαν επτά πληθυσμούς που συλλέχθηκαν σε διαφορετικούς ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας. Παρά το γεγονός ότι βρέθηκε παραλλακτικότητα μεταξύ των κλώνων, δεν εντοπίστηκε κάποιος συγκεκριμένος δείκτης RAPD, που να διαφοροποιεί τους πληθυσμούς. Ένα σημαντικό εύρημα αυτής της εργασίας ήταν, ότι οι αφίδες που συλλέχθηκαν από ροδακινιά και πιπεριά, που προέρχονταν από περιοχές μακριά από καλλιέργειες καπνού, έδειξαν γενετικές διαφορές σε σχέση με τους κλώνους που συλλέχθηκαν από φυτά καπνού. Επίσης, βρέθηκε σημαντική διαφορά μεταξύ ολοκυκλικών και μη-ολοκυκλικών (ανολοκυκλικοί, ανδροκυκλικοί και ενδιάμεσοι) πληθυσμών του εντόμου, που συλλέχθηκαν από καπνό, με τους πρώτους να παρουσιάζουν υψηλότερα επίπεδα ετεροζυγωτίας (Zitoudi et al. 2001).

5 MYZUS PERSICAE (SULZER)

Ταξινόμική θέση. Το είδος *Myzus persicae* (Sulzer) ανήκει στο Ζωικό Βασίλειο, στην κλάση: Insecta, υπόκλαση: Εξωπτερυγωτά, τάξη: Hemiptera, υπεριοικογένεια Aphidoidea, και οικογένεια Aphididae. Υπάρχουν περισσότερα από 30 συνώνυμα ονόματα του είδους (Remaudière & Remaudière 1997). Το κοινό όνομα του *M. persicae* είναι πράσινη αφίδα της ροδακινιάς.

Περιγραφή. Το άπτερο ενήλικο παρθενογενετικό θηλυκό του *M. persicae* έχει σώμα σχετικά λεπτό με μικρό ως μέτριο μέγεθος. Το μέγεθος στα άπτερα και πτερωτά θηλυκά κυμαίνεται από 1,2 έως 2,3 mm. Το άπτερο έχει ομοιόμορφο χρωματισμό με διάφορες αποχρώσεις του πράσινου και του κόκκινου (πράσινο, ανοικτό κιτρινοπράσινο, πρασινοκίτρινο, κίτρινο, κόκκινο ή ρόδινο). Τα πτερωτά θηλυκά είναι πράσινου χρώματος και φέρουν μια μαύρη περιοχή επί του νωτιαίου μέρους της κοιλιάς. Τα ενήλικα ωτόκα θηλυκά έχουν συνήθως πορφυρό κόκκινο χρώμα (πιο σκούρα απόχρωση στους κόκκινους κλώνους) και διακρίνεται ένα σκούρο τμήμα στη ραχιαία περιοχή της κοιλιάς. Τα αρσενικά είναι κίτρινου χρώματος. Στα θηλυτόκα των πράσινων κλώνων, τα ανήλικα στάδια έχουν πράσινη απόχρωση, που συνήθως προοδευτικά γίνεται ρόδινη. Στους κόκκινους ή ρόδινους κλώνους το χρώμα παραμένει το ίδιο. Διάφορες μορφές της *M. persicae* φαίνονται στην Εικόνα 12.

Ξενιστές. Είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος και προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών σε όλες τις ηπείρους. Από τα καλλιεργούμενα προσβάλλει είδη των οικογενειών Rosaceae, Solanaceae, Malvaceae, Compositae, Chenopodiaceae, Umbelliferae, Papilionaceae, Cruciferae. Μερικές από τις καλλιέργειες που προσβάλλει είναι: καπνός, πατάτα, τομάτα, μαρούλι, καρότο, κουκιά, τεύτλα, σπανάκι, λάχανο κ.α. Τα χειμερινά αυγά γεννιούνται στη ροδακινιά *Prunus. persica*. (Blackman & Eastop 2000). Σε μελέτες που έγιναν σε πληθυσμούς της αφίδας από περιοχές της Ελλάδας, βρέθηκε ότι η φυλή που αποικίζει τον καπνό βρίσκεται εκεί ύστερα από μετανάστευση από τη ροδακινιά (Blackman & Spence, 1992).

Γεωγραφική εξάπλωση. Πιθανώς προέρχεται από την Ασία, όπως και ο πρωτεύων ξενιστής του, η ροδακινιά. Σήμερα έχει εξαπλωθεί σε όλες τις ηπείρους.

Βιολογία. Έχει περισσότερες από πέντε γενεές το έτος. Σε περιοχές με σχετικά ψυχρό χειμώνα το είδος διαχειμάζει ως χειμερινό ωό στο φλοιό των κύριων ξενιστών (ροδακινιάς ή άλλων πυρηνοκάρπων). Τα χειμερινά ωά, συνήθως 4-6 ανά θηλυκό,

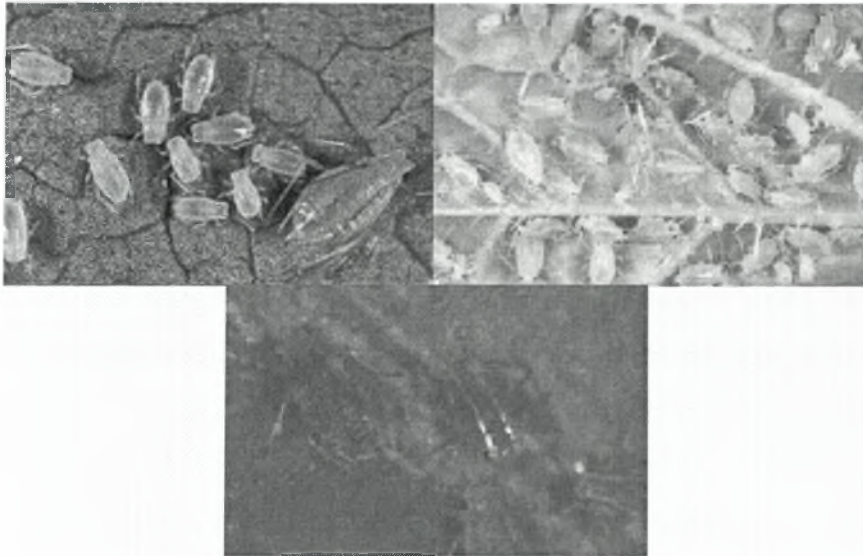
βρίσκονται στους οφθαλμούς ή σε εσοχές αδρών μερών του φλοιού. Στο τέλος του χειμώνα με αρχές ανοίξεως τα ωά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά τα λεγόμενα θεμελιωτικά. Ακολουθεί μικρός αριθμός παρθενογενετικών γενεών στη ροδακινιά και έπειτα πτερωτά άτομα μεταναστεύουν σε ποώδη φυτά (δευτερεύοντες ξενιστές), όπου η μία παρθενογενετική γενιά διαδέχεται την άλλη. Το φθινόπωρο παράγονται στα ποώδη φυτά πτερωτά θηλυτόκα και αρσενικά, τα οποία μεταναστεύουν στον πρωτεύοντα ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα γεννούν τα ωοτόκα, τα οποία εναποθέτουν τα χειμερινά ωά, μετά από σύζευξη με τα αρσενικά. Σε περιοχές με σχετικά ζεστό χειμώνα το έντομο αναπαράγεται παρθενογενετικά όλες τις εποχές του έτους. Επίσης υπάρχουν γενότυποι που χρησιμοποιούν και τις δυο στρατηγικές διαχείμασης. Το φθινόπωρο οι ανδροκυκλικοί κλώνοι παράγουν παρθενογενετικές μορφές, που θα διαχειμάσουν σε αυτοφυή φυτά ή χειμερινές καλλιέργειες και αρσενικά που συμμετέχουν στη σεξουαλική φάση του είδους (Müller 1958, van Emden *et al.* 1969, Blackman 1971, 1974). Οι ενδιάμεσοι κλώνοι γεννούν την ίδια εποχή πολλά άπτερα και πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά και λίγα αρσενικά και «ενδιάμεσα» πτερωτά. Τα «ενδιάμεσα» πτερωτά παράγουν κυρίως παρθενογενετικές μορφές και αριθμό ωοτόκων θηλυκών (Blackman 1971, 1972).

Το *M. persicae* αποτελεί ένα κλασικό παράδειγμα ετερόοικου είδους αφίδας. Στο δευτερεύοντα ξενιστή που είναι ο καπνός καθώς και άλλα ποώδη φυτά, κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου όπου μειώνεται το μήκος της ημέρας, υπάρχουν άτομα που είναι ολοκυκλικά άπτερα και ζωοτόκα. Τα άτομα αυτά παράγουν θηλυτόκα και αρσενικά τα οποία με τη σειρά τους μεταναστεύουν στο κύριο ξενιστή που είναι η ροδακινιά *P. persica*. Στη ροδακινιά, τα θηλυτόκα γεννούν ωοτόκα τα οποία ύστερα από σύζευξη με αρσενικά άτομα παράγουν τα διαχειμάζοντα ωά (Van Emden *et al.*, 1969).

Ο χρωμοσωμικός αριθμός του είδους είναι $n=12$. Έχει βρεθεί μια A1,3 χρωμοσωμική μετατόπιση που συνδέεται με το E4 μηχανισμό ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα βασιζόμενο στην εστεράση (Blackman & Takada 1975). Η χρωμοσωμική μετατόπιση παρουσιάζει ευρεία διάδοση σε όλο τον κόσμο (Blackman *et al.* 1978) και εμφανίζεται κυρίως στην κόκκινη μορφή του είδους ενώ στην πράσινη εμφανίζεται περιστασιακά (Blackman 1987). Επίσης ο E4 μηχανισμός ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, βασιζόμενος στην εστεράση, συνδέεται με τον ανολοκυκλικό τρόπο αναπαραγωγής ενώ ο EF4, όμοιας δράσης μηχανισμός που παρατηρείται στο είδος, συνδέεται με τον ολοκυκλικό τρόπο αναπαραγωγής. Ωστόσο,

πρόσφατα στην Ελλάδα έχουν βρεθεί κλώνοι που παρουσιάζουν και τους δυο μηχανισμούς ανθεκτικότητας (Blackman et al., 1999, Margaritopoulos et al. 2005).

Το είδος είναι ανθεκτικό στο κρύο και μπορεί να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 5 °C και 30 °C. Στους 25 °C τα θηλυκά ζουν κατά μέσο όρο 25 ημέρες και γεννούν 60 νύμφες (Rivnay 1962).



Εικόνα 8 Πράσινη, κιτρίνη, κόκκινη και πτερωτή μορφή του *M. persicae*

Ζημιές. Προσβάλλει κατά προτίμηση τις κορυφές τρυφερών βλαστών και τρυφερά φύλλα, που συστρέφονται από την προσβολή. Επίσης, τα μελιτώδη απεκκρίματα του ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς. Εκτός από την αξιόλογη άμεση ζημιά που προκαλεί στα φυτά, θεωρείται ο πιο σοβαρός φορέας ιών, αφού μπορεί να μεταδώσει αποτελεσματικά περισσότερους από 100 ιούς φυτών (Kennedy et al. 1962). Μερικοί από τους έμμοτους ιούς που μεταδίδει είναι ο ιός του ήπιου κιτρινίσματος των τεύτλων (BMY), της παραμόρφωσης των νεύρων του καπνού (TVD), του καρουλιάσματος των φύλλων του μπιζελιού (PLR) και του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας (PLRV) (Blackman & Eastop 2000). Επίσης, το είδος μεταδίδει αποτελεσματικά και πολλούς μη έμμοτους ιούς. Μερικοί από τους οποίους είναι: ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της κοινής κολοκυθιάς (ZYMV), ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), ο ιός της κίτρινης στιγματώσης της κολοκυθιάς (ZYFV), ο ιός του Υ της πατάτας (PVY), ο ιός του Α της πατάτας (PVA), ο ιός του μωσαϊκού της μηδικής (AMV) (Brunt et al. 1996)

Ο βιολογικός κύκλος του *M. persicae* παρουσιάζει πολυμορφισμό. Εκτός από την περίπτωση του ολοκυκλικού βιολογικού κύκλου, έχουν περιγραφεί ακόμη τρεις κατηγορίες οι οποίοι σχετίζονται άμεσα με τη φωτοπερίοδο:

- a. οι ανολοκυκλικοί,
- b. οι ανδροκυκλικοί και
- c. οι ενδιάμεσοι.

Οι ανολοκυκλικοί κλώνοι δεν μπορούν να παράγουν σεξουαλικές μορφές και διαχειμάζουν σε ζιζάνια ή σε χειμερινές καλλιέργειες, ως παρθενογενετικά θηλυκά. Οι ανδροκυκλικοί κλώνοι, όταν εκτίθενται σε συνθήκες μικρής ημέρας, παράγουν παρθενογενετικές μορφές και αρσενικά τα οποία μπορούν να συζευχθούν με ωτόκα άτομα που προέρχονται από ολοκυκλικούς ή ενδιάμεσους κλώνους. Οι ενδιάμεσοι γενότυποι παράγουν πολλά άπτερα και παρθενογενετικά πτερωτά, μερικά αρσενικά και πτερωτά θηλυκά τα οποία γεννούν τόσο παρθενογενετικά άτομα όσο και ωτόκα (Blackman, 1971, 1972).

Η παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε στο βιολογικό κύκλο εξηγήθηκε σύμφωνα με τις διαφορές που υπάρχουν στη θερμοκρασία μεταξύ των περιοχών. Έτσι, σε εύκρατες περιοχές μπορούν να συνυπάρξουν κλώνοι με διαφορετικές στρατηγικές αναπαραγωγής και επιπλέον η συχνότητα εμφάνισης ολοκυκλικών και ανολοκυκλικών πληθυσμών κατά τη διάρκεια της άνοιξης εξαρτάται από τη δριμύτητα του προηγούμενου χειμώνα (Blackman, 1974). Περιοριστικός παράγοντας στην εμφάνιση ανολοκυκλικών κλώνων αποτελεί η απουσία κατάλληλων χειμερινών καλλιεργειών και ζιζανίων. Ενώ, υπάρχει δυνατότητα οι ολοκυκλικοί πληθυσμοί να μειωθούν λόγω της σπανιότητας των κύριων ξενιστών τους. (Blackman, 1974).

Οι Margaritopoulos et al. (2002) μελέτησαν τις αντιδράσεις στη φωτοπερίοδο 2997 κλώνων του *M. Persicae*, οι οποίοι συλλέχθηκαν από τον κύριο αλλά και από δευτερεύοντες ξενιστές σε περιοχές της Ελλάδας κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του φθινοπώρου, με σκοπό να διαπιστωθεί η ύπαρξη παραλλακτικότητας στον βιολογικό κύκλο. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα διαπιστώθηκε ότι η σχετική αφθονία του πρωτεύοντα ξενιστή, είναι σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη γεωγραφική κατανομή των ολοκυκλικών γενοτύπων. Επιπλέον μελετήθηκαν οι σχέσεις μεταξύ αφίδων και διαφορετικών κατηγοριών βιολογικού κύκλου. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι υπάρχει ροή γονιδίων μεταξύ των ολοκυκλικών και των ανολοκυκλικών γενοτύπων μέσω των λίγων σεξουαλικών ατόμων που παράγουν περιστασιακά οι ανολοκυκλικοί.

5.1 *Myzus nicotianae* Blackman.

Ο Blackman το 1987, με τη βοήθεια μορφομετρικών μεθόδων που εφάρμοσε σε άτομα του *M. persicae* τα οποία προερχόταν από διαφορετικούς ξενιστές, κατάφερε να διαχωρίσει τους πληθυσμούς που τρέφονται στο καπνό, *Nicotiana tabacum* L. (Solanaceae), από εκείνους που τρέφονται σε διαφορετικά είδη φυτών. Η μορφή της αφίδας που τρέφεται στο καπνό χαρακτηρίστηκε ως νέο είδος και της δόθηκε το όνομα *Myzus nicotianae* Blackman (Blackman 1987).

Σε περαιτέρω μελέτες, με τη χρήση μοριακών τεχνικών, αποδείχτηκε ότι οι αφίδες που τρέφονται στο καπνό δεν αποτελούν ξεχωριστό είδος σε σχέση με άλλους πληθυσμούς του *M. persicae* (Field et al. 1994, Margaritopoulos et al. 1998.).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα πρόσφατων μελετών, με μικροδορυφορική ανάλυση DNA σε άτομα του *M. persicae* που συλλέχθηκαν από ροδακινιά, καπνό και άλλους ξενιστές σε περιοχές της Ελλάδας και της Ιταλίας (Blackman et al. 2001; Blackman et al. submitted, Margaritopoulos et al. submitted) καθώς και ανάλυση με τη χρήση μοριακών δεικτών RAPD σε κλώνους που προήλθαν από καπνό και άλλα φυτά ξενιστές σε περιοχές της Ελλάδας (Margaritopoulos et al. 1998, Zitoudi et al. 2001) επαληθεύτηκε η ύπαρξη μιας ξεχωριστής φυλής του *M. persicae* που τρέφεται στον καπνό. Σε αυτό το συμπέρασμα έχουν καταλήξει και διάφορες μορφομετρικές μελέτες (Margaritopoulos et al. 2000, 2003). Πρόσφατα, οι πληθυσμοί που τρέφονται στον καπνό έχουν χαρακτηριστεί ως ξεχωριστό υποείδος το *Myzus persicae nicotianae* Blackman (Margaritopoulos et al. 2003, Eastop & Blackman, 2005). Ο βιολογικός κύκλος του *M. persicae nicotianae* που τρέφεται στο καπνό φαίνεται να είναι πολυμορφικός. Σε πολλές περιοχές ανά τον κόσμο, όπου καλλιεργείται ο καπνός, έχει αναφερθεί ότι αφίδες που τρέφονται σε αυτόν, δεν παρουσιάζουν σεξουαλική αναπαραγωγή (Blackman, 1987). Οι μοναδικές αναφορές που έγιναν για εμφάνιση ολοκυκλικών και ανδροκυκλικών πληθυσμών του *M. persicae* που τρέφονται στο καπνό, ήταν στη Κεντρική Ασία και στην Ιαπωνία (Takada 1986).

Ο διαφορετικός τρόπος διαχείμασης σε συνδιασμό με τη δυνατότητα προσαρμογής σε ποικίλες κλιματικές συνθήκες, προσφέρει στις αφίδες ένα βιολογικό πλεονέκτημα όσον αφορά την εξάπλωση και την επιβίωσή τους. Η γνώση του βιολογικού κύκλου των αφίδων κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να εφαρμοστεί ένα σωστό πρόγραμμα ολοκληρωμένης καταπολέμησης για την προστασία των καλλιεργειών.

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αφίδες αποτελούν ιδανικά μοντέλα μελέτης της εξελικτικής σχέσης μεταξύ φυτών και εντόμων. Υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις στη διεθνή βιβλιογραφία, που αποδεικνύουν βιότυπους, φυλές αλλά και υποείδη αφίδων προσαρμοσμένα σε έναν ή λίγους ξενιστές (Blackman 1990).

Η παραλλακτικότητα του βιολογικού κύκλου (ικανότητα για σεξουαλική αναπαραγωγή ή συνεχής απομικτική παρθενογένεση) των αφίδων είναι ένα σημαντικό στοιχείο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε όλες τις μελέτες γενετικής πληθυσμών καθώς και για να γίνει κατανοητή η σχέση των αφίδων με τα φυτά ξενιστές. Ο πρωταρχικός λόγος για τον οποίο πρέπει να συμβαίνει αυτό, είναι ότι η μέθοδος αναπαραγωγής καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο παράγεται και οργανώνεται η γενετική παραλλακτικότητα μέσα σε έναν πληθυσμό, κάτι που μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες στην εξελικτική ανάπτυξη γνωρισμάτων που συνδέονται με την προσαρμογή του εντόμου στο φυτό ξενιστή. Έχουν διατυπωθεί αντικρουόμενες θεωρίες στο κατά πόσο η κυκλική ή η υποχρεωτική παρθενογένεση προάγουν την προσαρμογή σε ξενιστή (Lynch 1984, Hales et al. 1997). Παρόλα αυτά, πρόσφατες εργασίες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μικροδορυφόροι ως μοριακοί δείκτες έδειξαν ότι ο τρόπος αναπαραγωγής επηρεάζει σημαντικά τη γενετική δομή των πληθυσμών πολλών ειδών αφίδων όπως οι: *Rhopalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae) (Delmotte et al. 2002) και *M. persicae* (Vorburger et al. 2003, Guillemaud et al. 2003, Margaritopoulos et al. submitted).

Η αφίδα *M. persicae*, που αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος (Blackman & Eastop 2000). Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις γενετικής παραλλακτικότητας σε σχέση με το φυτό ξενιστή που επιλέγει. Για αρκετό καιρό υπήρχε η υποψία ότι οι πληθυσμοί που αποικίζουν τον καπνό *Nicotiana tabaccum* L. (Solanaceae), είναι διαφορετικοί από εκείνους που αποικίζουν άλλα είδη φυτών (Müller 1958). Η άποψη αυτή επιβεβαιώθηκε έπειτα από μορφομετρικές μελέτες (Blackman 1987), που διαδοχικά έδειξαν ότι η μορφή της αφίδας που τρέφεται στον καπνό με το πέρασμα του χρόνου διατηρεί τη χαρακτηριστική της μορφολογία ακόμα και σε περιοχές (Ελλάδα και Ιαπωνία) όπου υπάρχουν αμφισεξουαλικές γενιές λόγω του κύριου ξενιστή που είναι η ροδακινιά *P. persica* (Margaritopoulos et al. 2000; 2003).

Η μελέτη και η ανάλυση κλωνικών σειρών του *M. persicae*, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες στο ίδιο φυτό ξενιστή απέδειξε ότι οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών που αποικίζουν τον καπνό και αυτών που τρέφονται σε άλλους ποώδεις ξενιστές έχουν γενετική βάση. Η προσαρμογή πληθυσμών της αφίδας στον καπνό έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απόδοσή τους σε άλλα φυτά ξενιστές (Nikolakakis et al. 2003). Βρέθηκε επίσης, επιλογή κατά των μεταναστευτικών ατόμων η οποία οδήγησε στην ανάπτυξη μηχανισμού αναγνώρισης του σωστού ξενιστή από τα πτερωτά μεταναστευτικά θηλυκά. (Margaritopoulos et al. 2005, Troncoso et al. 2005). Έτσι η μορφή του *M. persicae* που τρέφεται στον καπνό, χαρακτηρίστηκε ως υποείδος και του δόθηκε το όνομα *Myzus persicae nicotianae* (Blackman) (Margaritopoulos et al., 2003; Eastop & Blackman 2005). Παρόλα αυτά, μοριακές μελέτες σε πληθυσμούς του *M. persicae* από καπνό και άλλους ξενιστές, δεν κατάφεραν να αναδείξουν γενετικούς δείκτες ικανούς να διακρίνουν τα δυο taxa, ίσως γιατί δεν χρησιμοποιήθηκαν ακριβείς μοριακοί δείκτες (Margaritopoulos et al. 1998, Zitoudi et al. 2001). Στις παραπάνω μελέτες βέβαια για τη σύγκριση μεταξύ *persicae* και *nicotianae* δεν χρησιμοποιήθηκαν ως μοριακοί δείκτες οι μικροδορυφόροι, οι οποίοι είναι ισχυρά πολυμορφικοί κατάλληλοι για μελέτες γενετικής πληθυσμών. Σε μικροδορυφορική ανάλυση πληθυσμών από την Αυστραλία δεν υπήρχε το υποείδος *nicotianae* καθώς προφανώς δεν υπάρχει στη συγκεκριμένη χώρα (Wilson et al. 2002; Vorburger et al. 2003).

Σε πρόσφατη μελέτη οι Blackman et al. (submitted) χρησιμοποίησαν μικροδορυφόρους προκειμένου να εξετάσουν την προέλευση κοινών γενοτύπων (αυτών δηλαδή που βρέθηκαν περισσότερο από μια φορά και/ή σε περισσότερους από ένα πληθυσμό και είναι απίθανο να δημιουργήθηκαν από την εποχιακή σεξουαλική αναπαραγωγή στη ροδακινιά) σε σχέση με το φυτό ξενιστή (ροδακινιά, καπνός και άλλα φυτά) και την παραλλακτικότητα του βιολογικού κύκλου σε περιοχές της Ελλάδας και της Νότιας Ιταλίας. Μετά την ανάλυση των δεδομένων βρέθηκε ότι οι κοινοί γενότυποι έφταναν το 49% και όπως ήταν αναμενόμενο η προέλευσή τους ήταν από ανολοκυκλικούς κλώνους, δηλαδή εκείνους που αναπαράγονται συνεχώς παρθενογενετικά. Οι περισσότεροι από τους κοινούς γενότυπους βρέθηκαν σε περιοχές όπου καλλιεργείται καπνός και συλλέχθηκαν από καπνό και άλλα φυτά ενώ κάποιοι άλλοι βρέθηκαν σε περιοχές όπου δεν καλλιεργείται καπνός και συλλέχθηκαν αποκλειστικά από ζιζάνια. Προκειμένου να κατανοηθεί η εξέλιξη της διαδικασίας ειδίκευσης στον ξενιστή, που υπάρχει στην

ομάδα της αφίδας *M. persicae*, καθώς και η έκταση της γενετικής διαφοροποίησης και της γενετικής ροής μεταξύ πληθυσμών που τρέφονται στο καπνό και εκείνων που δεν τον προτιμάνε, είναι απαραίτητο να επικεντρωθεί το ενδιαφέρον σε γενότυπους που συμμετείχαν σε σεξουαλική αναπαραγωγή.

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της *M. persicae* είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πολλές ομάδες εντομοκτόνων. Η πίεση επιλογής από τα εντομοκτόνα και η δομή της γενετικής πληθυσμών του *M. persicae* είναι πιθανόν να μεταβάλλονται στο χώρο και στο χρόνο, κάτι που μπορεί να οδηγήσει στην παραλλακτικότητα των επιπέδων ανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου. Συγκεκριμένα, όταν ένα μικρό ποσοστό γενοτύπων του κύριου πληθυσμού μπορέσει να εγκατασταθεί με επιτυχία σε μια καινούρια γεωγραφική περιοχή, τα χαρακτηριστικά της ανθεκτικότητας αυτού του πληθυσμού είναι πιθανό να επηρεαστούν από τη διαθέσιμη γενετική παραλλακτικότητα των μεταναστευτικών ατόμων (Fuentes et al. 2004).

2. ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο βιολογικός κύκλος καθώς και η γενετική παραλλακτικότητα στην αφίδα *M. persicae*. Αρχικά έγινε συλλογή των δειγμάτων από αρκετές περιοχές της Ελλάδος όπου καλλιεργείται καπνός και ροδακινιά, τα οποία μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και εκεί μελετήθηκε ο βιολογικός τους κύκλος. Συγκεκριμένα για τη κατηγορία βιολογικού κύκλου εξετάστηκαν 74 κλωνικές σειρές που προήλθαν από ροδακινιά και 110 που συλλέχθηκαν από καπνό. Στη συνέχεια μελετήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα σε 7 πληθυσμούς (4 από Ελλάδα, 2 από Σερβία και 1 από Ζιμπάμπουε) του *M. persicae* με τη χρήση μικροδορυφόρων. Συνολικά εξετάστηκαν 137 κλωνικές σειρές με τρεις μικροδορυφορικούς τόπους.

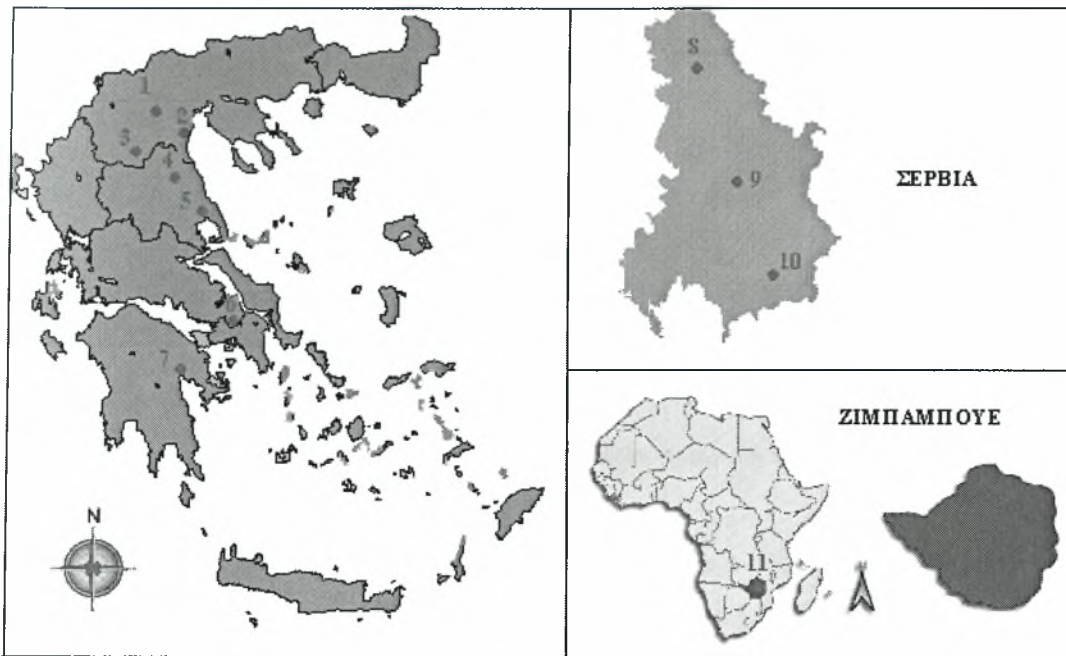
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 Δειγματοληψίες αφίδων

Οι δειγματοληψίες έγιναν σε οπωρώνες ροδακινιάς και σε αγρούς καπνοκαλλιέργειας σε περιοχές της Νότιας, Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας τα έτη 2003 και 2004. Κάθε δείγμα αποτελούταν από 2-3 φύλλα και συλλέχθηκε από ένα δέντρο ή φυτό καπνού. Στους οπωρώνες ροδακινιάς τα δείγματα συλλέχθηκαν κάθε 2-3 γραμμές και κάθε 2-3 δέντρα επί της γραμμής. Τα δείγματα από τον καπνό συλλέχθηκαν κάθε 3-4 φυτά ανά γραμμή σε αποστάσεις 3-4 γραμμών. Κάθε δείγμα τοποθετούταν σε ειδικό αεροστεγές σακουλάκι δειγματοληψίας διογκωμένο με αέρα μαζί με απορροφητικό χαρτί για την απορρόφηση της υγρασίας. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία με φορητά ψυγεία μικρού μεγέθους που περιείχαν παγοκύστες για την καλύτερη διατήρηση των δειγμάτων. Στο εργαστήριο δημιουργήθηκαν κλωνικές αποικίες με την τοποθέτηση ενός άπτερου παρθενογενετικού θηλυκού από κάθε δείγμα σε ειδικό κουτί εκτροφής αφίδων τύπου Blackman (1971). Με τον ίδιο τρόπο έγινε και η συλλογή των δειγμάτων από περιοχές της Σερβίας το έτος 2004, μόνο που από κάθε δείγμα 10 άπτερα θηλυκά τοποθετήθηκαν σε περιέκτες (erppendorf) στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για μοριακή ανάλυση, χωρίς να δημιουργηθούν κλωνικές αποικίες. Τέλος, για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν και κάποια άτομα από τη Ζιμπάμπουε που ήταν αποθηκευμένα στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, από το έτος 2002. Οι περιοχές προέλευσης των αφίδων φαίνονται στην Εικόνα 8.

3.2 Έλεγχος βιολογικού κύκλου

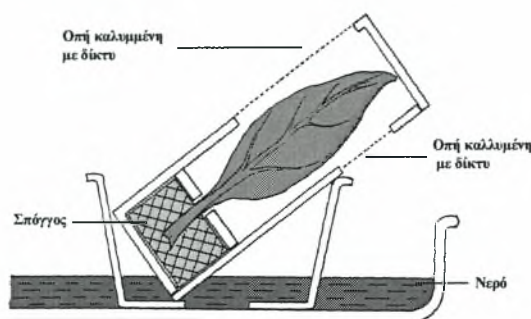
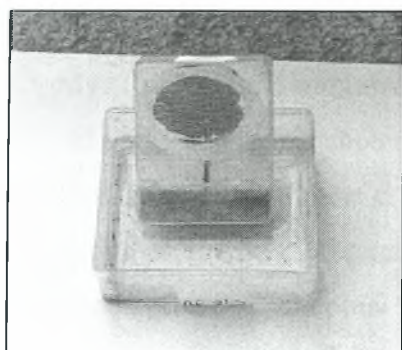
Οι δειγματοληψίες για τη συλλογή αφίδων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του βιολογικού κύκλου, πραγματοποιήθηκαν σε οπωρώνες ροδακινιάς της Βόρειας Ελλάδας (Μελίκη, Κατερίνη, Κρύα Βρύση) και της Μαγνησίας (Λεχώνια) καθώς και σε καπνοκαλλιέργειες της Βόρειας, Κεντρικής (Καρδίτσα) και Νότιας Ελλάδας (Ναύπλιο, Αμφίκλεια). Συνολικά εξετάστηκαν 199 κλώνοι. Οι πειραματικοί κλώνοι πριν την έναρξη της μελέτης του βιολογικού κύκλου διατηρήθηκαν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας LD σε βιοκλιματικό θάλαμο με φωτοπερίοδο L16:D8 (ώρες φωτός:ώρες σκότους, L=light – D=dark), θερμοκρασία $17 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ και σχετική υγρασία $55 \pm 5\%$.



Εικόνα 1. Περιοχές όπου έγιναν οι δειγματοληψίες. 1: Β. Ελλάδα-Μελίκη, 2: Β. Ελλάδα-Κατερίνη, 3: Β. Ελλάδα-Κρύα Βρύση, 4: Κ. Ελλάδα-Καρδίτσα, 5: Μαγνησία-Λεχώνια, 6: Ν. Ελλάδα-Αμφίκλεια, 7: Ν. Ελλάδα-Ναύπλιο, 8: Βόρεια Σερβία , 9: Κεντρική Σερβία, 10: Νότια Σερβία , 11: Ζιμπάμπουε.

Για τη διατήρηση των κλώνων χρησιμοποιήθηκαν ειδικά κουτιά εκτροφής αφίδων (Blackman 1971) διαστάσεων 7,7 cm x 4,5 cm x 2 cm, στη βάση των οποίων υπήρχε τεμάχιο από σφουγγάρι. Σε αυτό τοποθετήθηκε φύλλο πατάτας *Solanum tuberosum* (Solanaceae) ποικιλίας Sprunta πάνω στο οποίο τρέφονταν οι αφίδες. Τα κουτιά εκτροφής ήταν τοποθετημένα σε δίσκο με μικρή ποσότητα νερού για τη διαβροχή του σπόγγου και σε μικρή κλίση έτσι ώστε το φύλλο να βρίσκεται σε φυσική θέση (Εικόνα 9). Το νερό επίσης λειτουργεί ως φραγμός για την απομόνωση των κουτιών και την αποφυγή τυχόν μόλυνσης από περιπλανώμενες αφίδες.

Η αντικατάσταση των φύλλων γινόταν κάθε 3 ημέρες με ταυτόχρονη μεταφορά 15-20 περίπου ατόμων για τη διατήρηση δυναμικής αποικίας. Με αυτό τον τρόπο η θρεπτική κατάσταση των φύλλων διατηρούταν σε υψηλά επίπεδα, χωρίς να δημιουργείται πρόβλημα στη θρέψη και τον πολλαπλασιασμό των αφίδων. Μετά από 2-3 γενιές εκτροφής των κλώνων σε LD ελέγχθηκε η κατηγορία βιολογικού κύκλου. Ο έλεγχος έγινε εκτρέφοντας τις αφίδες για τρεις γενιές σε συνθήκες μικρής μέρας SD (L10:D14) στους $17 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ και σχετική υγρασία $55 \pm 5 \%$.



Εικόνα 2.. Κουτί εκτροφής αφίδων τύπου Blackman.

Ένα άπτερο παρθενογενετικό θηλυκό μεταφέρθηκε από την αποικία που ήταν σε συνθήκες μεγάλης ημέρας σε συνθήκες SD. Μετά από μία ημέρα απομακρύνθηκαν οι μητέρες (G0) και κρατήθηκαν περίπου πέντε απόγονοί τους (G1 γενιά). Έπειτα εξετάστηκε η μορφή των 60 πρώτων απογόνων (G2 γενιά) των G1 θηλυκών από τους οποίους χαρακτηρίστηκε ο βιολογικός κύκλος των κλώνων (Margaritoroulos et al. 2002).

Αναγνωρίστηκαν τρεις κατηγορίες πτερωτών θηλυκών από τις μορφές των απογόνων τους, που μορφολογικά είναι όμοια. Τα θηλυτόκα γέννησαν σχεδόν αποκλειστικά ωοτόκα θηλυκά, ενώ τα πτερωτά παρθενογενετικά παρήγαγαν παρθενογενετικές μορφές. Η τρίτη κατηγορία πτερωτών ήταν τα ενδιάμεσα που γέννησαν παρθενογενετικές μορφές και λίγα ωοτόκα. Οι ολοκυκλικοί κλώνοι στη δεύτερη γενιά σε SD παράγουν κυρίως θηλυτόκα, που γεννούν ωοτόκα (τρίτη γενιά). Αντίθετα, οι ανολοκυκλικοί κλώνοι στη δεύτερη γενιά παράγουν κυρίως άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά και αριθμό πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών. Βρέθηκαν και κλώνοι που χαρακτηρίστηκαν ως ενδιάμεσοι καθώς στη δεύτερη γενιά σε SD γέννησαν κυρίως άπτερα και πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά, λίγα αρσενικά και πτερωτά θηλυκά, που γέννησαν κυρίως παρθενογενετικές μορφές και λίγα ωοτόκα θηλυκά. Τα πτερωτά αυτά αποτελούν μια ενδιάμεση μορφή μεταξύ των θηλυτόκων των ολοκυκλικών κλώνων και των πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών των ανολοκυκλικών κλώνων.

3.3 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA

Για την μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκαν τρεις πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί τόποι (Myz2, Myz25 και Myz35) σε 137 κλωνικές

σειρές του *M. persicae* που προέρχονταν από 7 διαφορετικούς πληθυσμούς (Πίνακας 2). Οι Myz2 και Myz25 απομονώθηκαν και κατασκευάστηκαν για πρώτη φορά από τον G. Malarky (Μουσείο Φυσικής Ιστορίας, Λονδίνο, Blackman et al. submitted) ενώ ο Myz35 από τους Sloane et al (2001). Οι συγκεκριμένοι μικροδορυφόροι έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες γενετικής πληθυσμών του *M. persicae*, στις οποίες αποδείχτηκε ότι μπορούν να αναγνωρίσουν κλωνικούς γενότυπους με μεγάλη ακρίβεια (Wilson et al 2002, Sloane et al 2001, Fuentes et al. 2004, Blackman et al. submitted, Margaritopoulos et al. submitted). Η αλληλουχία των μικροδορυφόρων (εκκινητών) παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Μετά τη δημιουργία κλωνικών σειρών στο εργαστήριο, συλλέχθηκαν περίπου 10 άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά από κάθε κλώνο, τοποθετήθηκαν σε περιέκτη (ependorf) και στη συνέχεια σε καταψύκτη στους -20 °C. Ακολούθησε απομόνωση DNA χρησιμοποιώντας μόνο μια αφίδα από κάθε κλώνο εφαρμόζοντας τη μέθοδο των Sunnucks & Hales (1996). Σε ορισμένες αφίδες εφαρμόστηκε με επιτυχία και η μέθοδος απομόνωσης DNA των Martinez-Torres et al. (1997). Τα ακριβή πρωτόκολλα των απομονώσεων δίνονται στο Παράρτημα (σελ. 78-79).

Πίνακας 1. Αλληλουχία εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για το πολλαπλασιασμό τριών μικροδορυφορικών γενετικών τόπων στη παρούσα διατριβή.

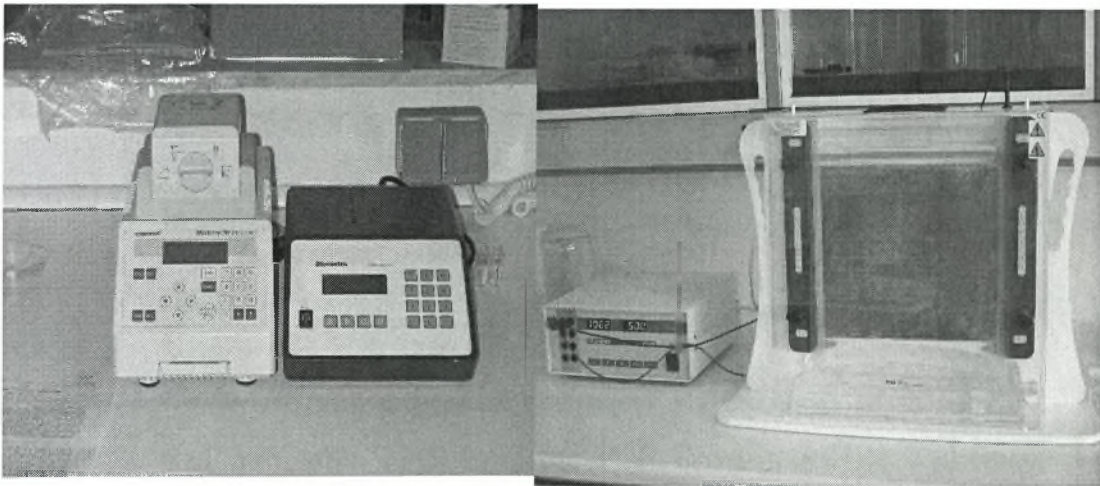
Εκκινητές	Αλληλουχία
Myz 2	Forw. 5'-TGGCGAGAGAGAAAGACCTGC-3' Rev. 5'-TCGGAAGACAGAGACATCGAGA-3'
Myz 25	Forw. 5'-AACCCATCTCACTCGTCAGCC-3' Rev. 5'-GAATCTGGAGAGCGGTTAATGC-3'
Myz 35	Forw. 5'-GGCAATAAAGATTAGCATG-3' Rev. 5'-TGTGTGTATAGATAGGATTTGTG-3'

Η ενίσχυση των μικροδορυφορικών τόπων έγινε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Ετοιμάστηκαν αντιδράσεις των 20 µl που περιείχαν 1 µl DNA (50-100 ng), 0,6 U *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech, Heraklion, Greece), πρότυπο διάλυμα απαλλαγμένο από ιόντα Mg⁺⁺, 25 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs και 1 µM από κάθε εκκινητή. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε συσκευή PCR

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* 54
(Hemiptera: Aphididae) με μοριακές μεθόδους

eppendorf (Mastercycler personal) (Εικόνα 3), που περιελάμβανε διαφορετικές συνθήκες για κάθε εκκινητή. Συγκεκριμένα, για τον Myz 2 εφαρμόστηκε το εξής πρόγραμμα: Ένας κύκλος που περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 2 min, 40 κύκλοι που περιείχαν: αποδιάταξη στους 94 °C για 40 sec, συγκόλληση των εκκινητών στους 52 °C για 45 sec, επέκταση στους 72 °C για 45 sec και 1 κύκλος στους 72 °C για 4 min που αποτέλεσε την τελική επέκταση. Στους άλλους δυο εκκινητές εφαρμόστηκε το ίδιο πρόγραμμα με κάποιες μετατροπές. Στην περίπτωση του Myz 25 άλλαξε η θερμοκρασία συγκόλλησης από 52 °C σε 55 °C, ενώ στην περίπτωση του Myz 35 άλλαξε ο αριθμός των κύκλων από 40 σε 30. Το πολλαπλασιαζόμενο DNA, μέχρι να χρησιμοποιηθεί παρέμεινε στους 4 °C.

Η αναγνώριση των αλληλομόρφων έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% (τα συστατικά παρασκευής της παρατίθενται στο Παράρτημα σελ 81-82). Παράλληλα με τη διαδικασία παρασκευής του διαλύματος της πολυακρυλαμίδης, έγινε και η προετοιμασία του υποδοχέα της συσκευής κάθετης αλληλούχισης στον οποίο ένχυση του διαλύματος, λίγο πριν στερεοποιηθεί. Ο υποδοχέας αποτελείται από δυο υάλινες πλάκες διαστάσεων 35X40 cm.



Εικόνα 3. Αριστερά η συσκευή PCR, eppendorf ,Δεξιά συσκευή ηλεκτροφόρησης σε λειτουργία. (Mastercycler personal).

Στην υάλινη πλάκα όπου θα κολλήσει η πηκτή, τοποθετείται με ένα απαλό χαρτομάντιλο επάνω στο τζάμι 1 ml διαλύματος που περιέχει 950 μl αιθανόλη 100%, 50 μl οξικό οξύ και 3 μl Bind Silane (3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate minimum 98 %, 25 ml, Sigma - Aldrich). Στην άλλη υάλινη πλάκα τοποθετείται με τον ίδιο τρόπο 1 ml της ουσίας Sigmacote (Sigma – Aldrich, 25 ml, Lot: 103K4360)

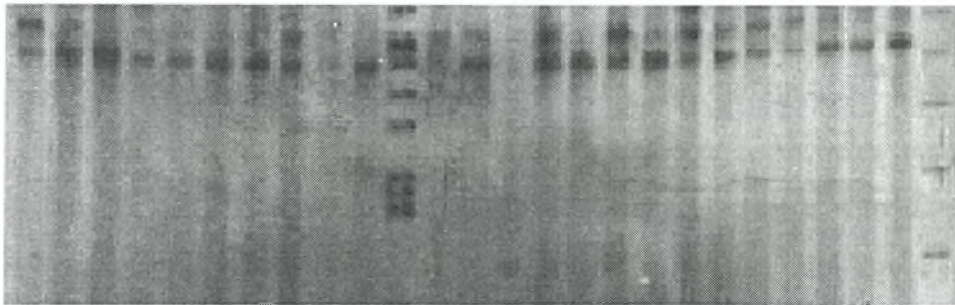
Πίνακας 2. Στοιχεία των ατόμων (N) *Myzus persicae* που χρησιμοποιήθηκαν στη γενετική ανάλυση

Περιοχή	Ημερομηνία Συλλογής	Ξενιστής	Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν <u>Microsatellites</u>
<u>Μαγνησία</u>		Ροδακινιά	
(CEGP)	2003		-
	2004		21
Λεχώνια			
Λεχώνια			
<u>B. Ελλάδα</u>		Ροδακινιά	33
(NGP)	2003		13
	2004		20
Μελίκη			
Μελίκη			
K. Σερβία (SERP)	2004	Ροδακινιά	10
<u>K. Ελλάδα</u>		Καπνός	33
(CGT)	2003		17
	2004		16
Καρδίτσα			
Καρδίτσα			
<u>B. Ελλάδα</u>		Καπνός	
(NGT)	2004		15
	2004		-
Μελίκη	2004		-
Κατερίνη			
Κρύα Βρύση			
<u>N. Ελλάδα</u>		Καπνός	
(SGT)	2004		-
	2004		-
Αμφίκλεια			
Ναύπλιο			
B. Σερβία (SERT)	2004	Καπνός	10
<u>Ζιμπάμπουε</u>	2002	Καπνός	15
(ZIMT)			

. ένα είδος σιλικόνης που αποτρέπει την πηκτή να κολλήσει πάνω στην υάλινη πλάκα. Σε 6 μl από κάθε αντίδραση της PCR έγινε προσθήκη 2 μl διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) και το μίγμα τοποθετήθηκε στους -20 °C για 3 λεπτά, αφού προηγουμένως υπέστη αποδιάταξη στους 95 °C για 5 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμίδης 8 %. Έγινε ηλεκτροφόρηση στα 1.500 V (Εικόνα 3) μέσα σε διάλυμα TBE 1X για ~3 ώρες. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η διαδικασία της χρώσης της πηκτής με μια μέθοδο που είναι βασισμένη στη χρήση νιτρικού αργύρου (AgNO₃).

Συνοπτικά, η πηκτή σταθεροποιήθηκε με την τοποθέτησή του σε διάλυμα οξικού οξέος 10 % για 20 λεπτά, ακολούθησε πλύσιμο με νερό διπλής απόσταξης και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο διάλυμα χρώσης που περιείχε AgNO₃. Το χρώμα της

πηκτής και τα αλληλόμορφα με τη μορφή ζωνών, εμφανίστηκαν όταν αυτό τοποθετήθηκε σε διάλυμα ανθρακικού νατρίου/ φορμαλδεΰδης/ θειοσουλφιδίου του νατρίου (30 gr/L NaCO₃, 1.5 ml/L φορμαλδεΰδη 37 % και 200 μl/L θειοσουλφιδίου του νατρίου 10 mg/ml). Η αντίδραση τερματίστηκε με τη χρήση διαλύματος οξικού οξέος 10 % και η πηκτή ξεπλύθηκε με νερό διπλής απόσταξης. Στη συνέχεια στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε η διαδικασία αξιολόγησης του μεγέθους των αλληλομόρφων. Η εμφάνιση της πηκτής μετά από το τέλος της διαδικασίας παρουσιάζεται στην Εικόνα 4. Η εκτίμηση των αλληλομόρφων έγινε με τη βοήθεια της κλίμακας που παρέχει ένας μάρτυρας, ιδανικός για τον υπολογισμό μεγέθους αλληλομόρφων, που ανταποκρίνεται στην αλληλουχία του φορέα pGEM-3Zf(+) (Promega, USA). Αναλυτικά τα πρωτόκολλα της χρώσης και των διαλυμάτων φαίνονται στο Παράρτημα.σελ 80-83.



Εικόνα 4. Πηκτή πολυακρυλαμίδης μετά από το τέλος της χρώσης (οι μαύρες ζώνες είναι τα αλληλόμορφα).

4. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

4.1 Συχνότητες αλληλομόρφων, ισορροπία Hardy-Weinberg και ανισορροπία σύνδεσης

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα αντίγραφο από κάθε γενότυπο σε κάθε πληθυσμό. Αυτό αποτελεί κοινή πρακτική στην ανάλυση δεδομένων όταν χρησιμοποιούνται μικροδορυφόροι ως μοριακοί δείκτες.

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων, ο μέσος όρος των αλληλομόρφων που βρέθηκαν σε κάθε έναν από τους γενετικούς τόπους και πληθυσμούς που εξετάστηκαν καθώς και η ετεροζυγωτία υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος GENEPOP έκδοση 3.4 (Raymond & Rousset, 1995a; <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop/>). Η τυχόν απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg εξετάστηκε με το ακριβές test (exact Hardy-Weinberg test) χωριστά για κάθε γενετικό τόπο. Για την εκτίμηση της ακριβούς τιμής της πιθανότητας P του

συγκεκριμένου test χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή μέθοδος του Markov και επιπλέον εφαρμόστηκε ένα γενικό (global) test για όλους τους γενετικούς τόπους που εξετάστηκαν (Raymond & Rousset 1995b). Η ανάλυση ανεξαρτησίας των μικροδορυφορικών τόπων έγινε με τη χρήση test πιθανοτήτων για την εύρεση γενετικής ανισοροπίας καθώς και με τη χρήση της αλυσιδωτής μεθόδου του Markov.

4.2 Ανάλυση μεταξύ των πληθυσμών

Η γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών που εξετάστηκαν εξακριβώθηκε με βάση τις τιμές του συντελεστή παρέκκλισης F_{ST} , που υπολογίστηκαν για όλους τους γενετικούς τόπους (Weir & Cockerman 1984). Οι συγκρίσεις μεταξύ πληθυσμών έγινε με τη χρήση του προγράμματος Arlequin 2.0 (Schneider et al., 2000). Το σφάλμα που μπορεί να υπήρξε κατά τον υπολογισμό των τιμών F_{ST} μεταξύ των δειγμάτων, που βασίστηκε στην υπόθεση ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, ελαχιστοποιήθηκε με τη διαδικασία μεταφοράς απλοτύπων μεταξύ των πληθυσμών. Η τιμή της πιθανότητας P του παραπάνω test, είναι η αναλογία των 100.000 μεταθέσεων απλοτύπων οι οποίες οδήγησαν σε μια τιμή του F_{ST} πολύ υψηλότερη από την παρατηρούμενη. Επίσης, τα δεδομένα αναλύθηκαν με την Ανάλυση Μοριακής Παραλλακτικότητας (AMOVA, Excoffier et al. 1992) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Arlequin 2.0.

4.3 Ανάλυση γενετικής απόστασης

Προκειμένου να εξακριβωθούν οι γενετικές σχέσεις μεταξύ των πληθυσμών που εξετάστηκαν χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα POPULATIONS έκδοση 1.1.28 (<http://www.cnrs-gif.fr/pge/bioinfo>). Μέσω του συγκεκριμένου προγράμματος, κατασκευάστηκε ένα δενδρόγραμμα UPGMA (Unweight Pair Group Average) το οποίο βασίζεται στη γενετική απόσταση ‘shared allele distance’ (DAS) των Chakraborty & Jin (1993). Η συγκεκριμένη γενετική απόσταση υπολογίζει τον αριθμό των διαφορετικών αλληλομόρφων που υπάρχουν μεταξύ πολυγονιδιακών γενοτύπων. Χρησιμοποιήθηκε επίσης η γενετική απόσταση (D_a) των Nei et al. (1984). Πραγματοποιήθηκαν 1000 επαναλήψεις με ανασυνδυασμό των γενετικών τόπων και οι τιμές των ορίων εμπιστοσύνης (bootstrap) εμφανίζονται ως ποσοστά των επαναλήψεων σε κάθε κλάδο των δενδρογραμμάτων.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Βιολογικός κύκλος

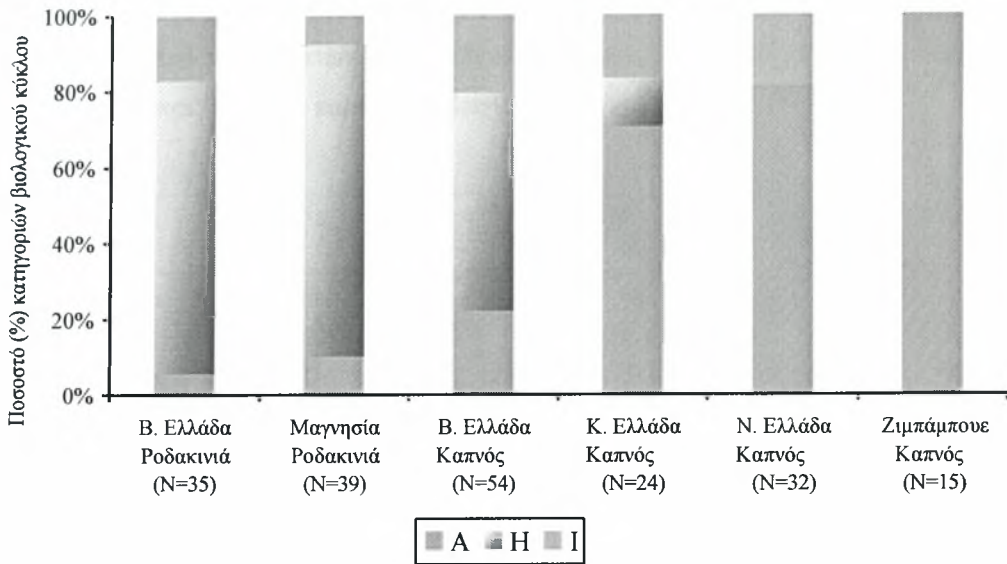
Οι κλώνοι των αφίδων που συλλέχθηκαν από ροδακινιά σε περιοχές της Μαγνησίας (Λεχώνια, Βελεστίνο) και της Β. Ελλάδας (Μελίκη), βρέθηκαν ολοκυκλικοί στο μεγαλύτερο ποσοστό τους. Το μεγαλύτερο ποσοστό βρέθηκε στη Μαγνησία με 82 % και ακολούθησε η Β. Ελλάδα με 77 %. Σε μικρά ποσοστά βρέθηκαν ενδιάμεσοι και ανολοκυκλικοί κλώνοι (Σχήμα 1).

Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται στις περιοχές της Β. Ελλάδας, όπου έγινε η δειγματοληψία των αφίδων, είναι ότι σε πολύ κοντινές αποστάσεις με τους οπωρώνες της ροδακινιάς υπάρχουν καπνοκαλλιέργειες. Έτσι, λοιπόν, στις αφίδες που συλλέχθηκαν από καπνό στις συγκεκριμένες περιοχές και εξετάστηκε ο βιολογικός τους κύκλος, βρέθηκε μεγάλο ποσοστό ολοκυκλικών κλώνων. Συγκεκριμένα, το ποσοστό ξεπέρασε το 57 % σε σχέση με τους άλλους δυο τύπους (ανολοκυκλικούς και ενδιάμεσους) που το ποσοστό τους ήταν 22 % και 20 %, αντίστοιχα.

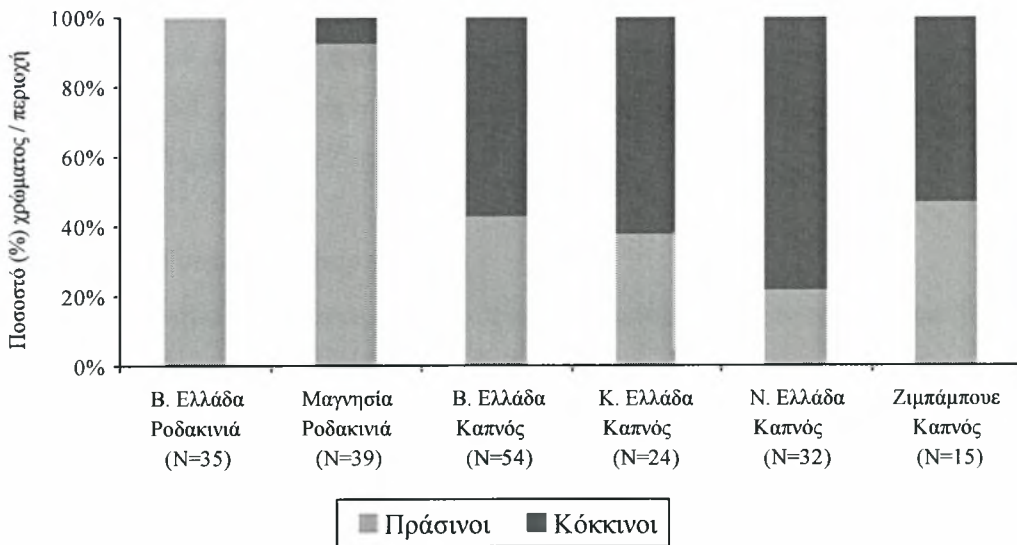
Στους κλώνους που συλλέχθηκαν από καπνό σε περιοχές της Κεντρικής (Καρδίτσα) και της Νότιας (Ναύπλιο, Αμφίκλεια) Ελλάδας, όπου περιορίζεται κατά πολύ η καλλιέργεια της ροδακινιάς, τα αποτελέσματα ήταν εντελώς διαφορετικά. Δηλαδή, αυξήθηκε το ποσοστό των ανολοκυκλικών κλώνων και μειώθηκε πολύ το ποσοστό των ολοκυκλικών. Συγκεκριμένα στην Κ. Ελλάδα περισσότερο από 70 % των κλώνων που εξετάστηκαν ήταν ανολοκυκλικοί, ενώ 17 % ενδιάμεσοι και 13 % ολοκυκλικοί. Στη Ν. Ελλάδα, το ποσοστό των ανολοκυκλικών κλώνων έφτασε το 82 % ενώ δεν βρέθηκαν ολοκυκλικοί γενότυποι. Παρατηρήθηκαν ενδιάμεσοι γενότυποι σε ποσοστό 18 %. Όλοι οι κλώνοι από τη Ζιμπάμπουε ήταν ανολοκυκλικοί.

Σχετικά με το χρώμα των αφίδων οι περισσότεροι κόκκινοι κλώνοι συλλέχθηκαν από καπνό στις περιοχές της Νότιας (78 %) και της Κεντρικής (63 %) Ελλάδας. Στις ροδακινιά οι κλώνοι ήταν κυρίως πράσινου χρώματος τόσο στη Β. Ελλάδα (100 %) όσο και στη Μαγνησία (92 %). Στην Ελλάδα η γεωγραφική παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε στο χρώμα των κλώνων ακολουθεί αυτή του βιολογικού κύκλου. Δηλαδή, σε περιοχές, όπως η Β. Ελλάδα και η Μαγνησία, όπου βρέθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά ολοκυκλικών κλώνων, παρατηρήθηκαν και τα μεγαλύτερα ποσοστά πράσινου χρώματος (Σχήμα 2).

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* 59
(Hemiptera: Aphididae) με μοριακές μεθόδους



Σχήμα 1. Ποσοστό κατηγοριών βιολογικού κύκλου πληθυσμών του *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν το έτος 2004. (A: ανολοκυκλικοί, H: ολοκυκλικοί, I: Ενδιάμεσοι)



Σχήμα 2. Κατανομή πράσινων και κόκκινων κλώνων *Myzus persicae* ανάλογα με τη περιοχή και τον ξενιστή.

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* 60
(Hemiptera: Aphididae) με μοριακές μεθόδους

Πίνακας 3. Αριθμός κλώνων (N_C) που εξετάστηκαν με τρεις μικροδορυφόρους. N_G = αριθμός διαφορετικών γενοτύπων. C = κοινοί γενότυποι, M = πολλαπλοί γενότυποι, U = μοναδικοί γενότυποι. Τιμές σε παρένθεση δείχνουν ποσοστά (%).

Περιοχή	Ξενιστής	N_C	N_G	N_C ανά κατηγορία			N_G ανά κατηγορία			
				C	M	U	C	M	U	M+U
CEGP ^d	Ροδακινιά	21	21 (100) ^a	5 (23,8) ^b	-	16 (76,2)	5 (23,8) ^c	-	16 (76,2)	16 (76,2)
CGT	Καπνός	33	23 (70)	17 (51,5)	7 (21,2)	9 (27,3)	11 (47,8)	3 (20,0)	9 (39,1)	12 (39,1)
NGP	Ροδακινιά	34	34 (100)	11 (32,4)	1 (2,9)	22 (64,7)	11 (32,4)	1 (2,9)	22 (64,7)	23 (67,6)
NGT	Καπνός	15	13 (90)	7 (46,6)	4 (26,7)	4 (26,7)	6 (46,2)	3 (20,0)	4 (30,8)	7 (50,8)
SERP	Ροδακινιά	10	10 (100)	5 (50)	-	5 (50,0)	5 (50,0)	-	5 (50,0)	5 (50)
SERT	Καπνός	10	9 (90)	4 (40)	-	7 (70,0)	2 (22,2)	-	7 (77,8)	7 (77,8)
ZIMT	Καπνός	15	7 (50)	2 (13,3)	10 (66,7)	3 (20,)	1 (14,3)	3 (20,0)	3 (42,9)	6 (62,9)

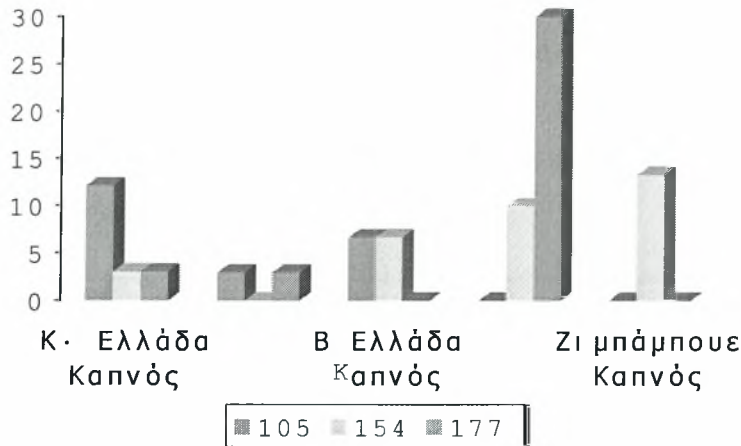
^aΠοσοστό % διαφορετικών γενοτύπων. ^bΠοσοστό % κλώνων ανά κατηγορία γενοτύπων.

^cΠοσοστό % των τριών κατηγοριών γενοτύπων. ^dCEGP, NGP, SERP = δείγματα που συλλέχθηκαν από ροδακινιά από τη Μαγνησία, τη Β. Ελλάδα και την Κ. Σερβία, αντίστοιχα. CGT, NGT, SERT, ZIMT = δείγματα που συλλέχθηκαν από καπνό από την Κ. Ελλάδα, τη Β. Ελλάδα, τη Β. Σερβία και τη Ζιμπάμπουε.

5.2 Ανάλυση μικροδορυφόρων

Στον Πίνακα 3 φαίνεται ο αριθμός των διαφορετικών γενοτύπων που βρέθηκαν σε κάθε πληθυσμό και ο αριθμός των κλωνικών σειρών ανά κατηγορία γενοτύπου (κοινός, πολλαπλός, μοναδικός). Συνολικά από τις 138 κλωνικές σειρές που εξετάστηκαν το 55,1 % ήταν μοναδικοί γενότυποι (= προϊόν σεξουαλικής αναπαραγωγής). Επίσης, βρέθηκαν 18 κοινοί γενότυποι (= γενότυποι που βρέθηκαν σε περισσότερους από ένα πληθυσμούς) που αποτελούν το 40% των κλωνικών σειρών που εξετάστηκαν. Το υπόλοιπο 4,9 % των εξετασθέντων κλωνικών σειρών αποτελείται από πολλαπλούς γενότυπους (= γενότυποι που συλλέχθηκαν περισσότερες από μια φορά σε έναν μόνο πληθυσμό). Βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των περιοχών στον αριθμό των κλωνικών σειρών που ανήκουν στην κατηγορία των μοναδικών γενοτύπων ($X_6^2 = 14,9$, $P < 0,02$). Το υψηλότερο ποσοστό

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* 61
(Hemiptera:Aphididae) με μοριακές μεθόδους



Σχήμα 3. Συχνότητα (%) εμφάνισης των τριών πολυπληθέστερων κοινών γενοτύπων σε διάφορους πληθυσμούς.

μοναδικών γενοτύπων βρέθηκε στους πληθυσμούς από ροδακινιά. Αν προστεθούν και οι πολλαπλοί γενότυποι, υψηλό ποσοστό (μοναδικοί + πολλαπλοί) παρατηρήθηκε επίσης στον καπνό πλησίον των ροδακινιών στη Β. Ελλάδα.

Από τους 18 κοινούς γενότυπους οι 3 πολυπληθέστεροι βρέθηκαν σε συχνότητες 2,9 (γενότυπος 177), 3,6 (γενότυπος 154) και 4,3 % (γενότυπος 105). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η γεωγραφική κατανομή των τριών πολυπληθέστερων κοινών γενοτύπων (Σχήμα 3). Η γενοτύποι αυτοί έχουν μεγάλη γεωγραφική εξάπλωση. Ιδιαίτερα ο γενότυπος 154 συλλέχθηκε τόσο στην Ελλάδα όσο και στη Σερβία και τη Ζιμπάμπουε.

Στον Πίνακα 4 φαίνονται οι συχνότητες των αλληλομόρφων για τους τρεις γονιδιακούς τόπους στους 7 πληθυσμούς του *M. persicae* που εξετάστηκαν. Ο αριθμός των αλληλομόρφων κυμάνθηκε από 2-7 μεταξύ των πληθυσμών και των γονιδιακών τόπων που εξετάστηκαν. Ο μέσος αριθμός αλληλομόρφων κυμάνθηκε από 3,0 (Ζιμπάμπουε) ως 5,33 (Κ. Ελλάδα-Καπνός, Β. Ελλάδα-Ροδακινιά). Δεν βρέθηκε κάποιο αλληλόμορφο που να διακρίνει τους πληθυσμούς του *M. persicae* που εξετάστηκαν.

Στον Πίνακα 5 φαίνεται η απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg στους εξετασθέντες πληθυσμούς. Γενικά, τα αποτελέσματα δείχνουν ότι οι πληθυσμοί που εξετάστηκαν αποκλίνουν από την ισορροπία H-W. Το στατιστικό τεστ που αναλύει κάθε γονιδιακό τόπο και πληθυσμό ξεχωριστά έδειξε 12 περιπτώσεις από τις 21 με

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* 62
(Hemiptera:Aphididae) με μοριακές μεθόδους

σημαντική απόκλιση από την H-W ισορροπία. Στις 11 περιπτώσεις η απόκλιση συνοδεύεται από έλλειψη ετεροζυγωτίας (θετική τιμή του συντελεστή ομομιξίας F_{IS}).

Πίνακας 4. Συχνότητες αλληλομόρφων, παρατηρούμενη και αναμενόμενη ετεροζυγωτία σε επτά πληθυσμούς του *Myzus persicae*.

Γονιδιακός τύπος Αλληλόμορφο	CEGP* n=21	CGT n=23	NGP n=34	NGT n=13	SERP n=10	SERT n=10	ZIMT n=7
myz2							
1	0,690	0,565	0,618	0,692	0,450	0,550	0,500
2	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000
3	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,000	0,000
4	0,143	0,304	0,279	0,269	0,150	0,400	0,500
5	0,000	0,043	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
6	0,000	0,065	0,029	0,038	0,000	0,000	0,000
7	0,143	0,000	0,000	0,000	0,150	0,000	0,000
8	0,024	0,022	0,074	0,000	0,200	0,000	0,000
Π.Ε.	0,428	0,782	0,558	0,538	0,700	0,900	1,000
Α.Ε.	0,495	0,589	0,541	0,461	0,750	0,544	0,500
Α.Α.	4	5	4	3	5	3	2
myz25							
1	0,381	0,261	0,265	0,385	0,600	0,150	0,786
2	0,190	0,065	0,132	0,000	0,000	0,200	0,000
3	0,429	0,587	0,500	0,462	0,400	0,650	0,214
4	0,000	0,043	0,088	0,154	0,000	0,000	0,000
5	0,000	0,043	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000
Π.Ε.	0,285	0,260	0,441	0,153	0,600	0,300	0,142
Α.Ε.	0,659	0,599	0,667	0,660	0,500	0,555	0,380
Α.Α.	3	5	5	3	2	3	2
myz35							
1	0,119	0,326	0,309	0,423	0,000	0,000	0,000
2	0,143	0,196	0,132	0,115	0,050	0,050	0,071
3	0,119	0,130	0,191	0,231	0,350	0,350	0,286
4	0,119	0,130	0,059	0,038	0,200	0,000	0,357
5	0,095	0,000	0,103	0,000	0,200	0,000	0,214
6	0,167	0,043	0,059	0,000	0,000	0,100	0,071
7	0,238	0,174	0,147	0,192	0,200	0,500	0,000
Π.Ε.	0,380	0,739	0,441	0,538	0,300	0,200	0,285
Α.Ε.	0,876	0,808	0,829	0,753	0,822	0,672	0,833
Α.Α.	7	6	7	5	5	4	5
Όλοι οι γονιδιακοί τύποι							
Π.Ε.	0,365	0,594	0,480	0,410	0,533	0,467	0,476
Α.Ε.	0,669	0,664	0,677	0,616	0,683	0,584	0,564
Α.Α.	4,67	5,33	5,33	3,67	4,00	3,33	3,00

N= αριθμός γενοτύπων. Π.Ε. = Παρατηρούμενη Ετεροζυγωτία. Α.Ε. = Αναμενόμενη Ετεροζυγωτία. Α.Α. = Αριθμός Αλληλομόρφων. Για επεξήγηση των κωδικών βλέπε Πίνακα 4.

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* 63
(Hemiptera:Aphididae) με μοριακές μεθόδους

Το στατιστικό τεστ που εμπλέκει όλους τους γονιδιακούς τόπους έδειξε σημαντική έλλειψη ετεροζυγωτίας και στους 7 πληθυσμούς που εξετάστηκαν.

Επίσης, δεν βρέθηκε ανισορροπία σύνδεσης (Linkage disequilibrium) στους 21 συνδυασμούς που προκύπτουν μεταξύ των 3 γονιδιακών τόπων και των 7 πληθυσμών που εξετάστηκαν.

Πίνακας 5. Πιθανότητα απόκλισης από την ισορροπία Hardy-Weinberg και τιμές του συντελεστή F_{IS} για επτά πληθυσμούς του *Myzus persicae*.

Περιοχή*	Ξενιστής	N	myz2	myz25	myz35	Όλοι οι γονιδιακοί τόποι
CEGP	Ροδακινιά	21	+0,135	+0,567	+0,565	+0,460
$P_{Het. Deficit}/P_{Het. Excess}$			NS/NS	0,001/NS	0,001/NS	0,001/NS
CGT	Καπνός	23	-0,327	+0,565	+0,086	+0,108
$P_{Het. Deficit}/P_{Het. Excess}$			NS/0,02	0,001/NS	NS/NS	0,001/NS
NGP	Ροδακινιά	34	-0,031	+0,339	+0,468	+0,293
$P_{Het. Deficit}/P_{Het. Excess}$			NS/NS	0,001/NS	0,001/NS	0,001/NS
NGT	Καπνός	13	-0,167	+0,767	+0,285	+0,344
$P_{Het. Deficit}/P_{Het. Excess}$			NS/NS	0,001/NS	NS/NS	0,001/NS
SERP	Ροδακινιά	10	+0,067	-0,200	+0,635	+0,228
$P_{Het. Deficit}/P_{Het. Excess}$			NS/NS	NS/NS	0,001/NS	0,007/NS
SERT	Καπνός	10	-0,653	+0,460	+0,702	+0,210
$P_{Het. Deficit}/P_{Het. Excess}$			NS/0,03	NS/NS	0,001/NS	0,004/NS
ZIMT	Καπνός	7	-1,000	+0,625	+0,657	+0,167
$P_{Het. Deficit}/P_{Het. Excess}$			NS/0,04	NS/NS	0,002/NS	0,03/NS

*Για επεξήγηση των κωδικών βλέπε Πίνακα 4. N = αριθμός γενοτύπων που εξετάστηκαν από κάθε περιοχή. $P_{Het. Deficit} + P_{Het. Excess}$ = πιθανότητα για περίσσεια και έλλειψη ετεροζυγωτίας αντίστοιχα

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης F_{ST} έδειξαν σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών του *M. persicae* που εξετάστηκαν. Υψηλές και σημαντικές τιμές F_{ST} (κυρίως 0,05 - 0,13) βρέθηκαν στην πλειονότητα των συγκρίσεων μεταξύ των Ελληνικών και των ξενικών (Σερβία, Ζιμπάμπουε) πληθυσμών. Η υψηλότερη τιμή (0,20) παρατηρήθηκε μεταξύ των πληθυσμών από καπνό από τη Β. Σερβία και τη Ζιμπάμπουε (Πίνακας 5). Η Ανάλυση Μοριακής Παραλλακτικότητας (AMOVA) έδειξε υψηλότερη παραλλακτικότητα εντός (95.7 %) παρά μεταξύ (4.3 %) των πληθυσμών (Πίνακας 7). Σε κάθε περίπτωση η παραλλακτικότητα ήταν σημαντική. Η τιμή του ολικού συντελεστή F_{ST} ήταν μέτρια αλλά υψηλά σημαντική ($P < 0.001$) (Πίνακας 6).

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* 64
(Hemiptera:Aphididae) με μοριακές μεθόδους

Πίνακας 6. Γενετική διαφοροποίηση μεταξύ πληθυσμών του *Myzus persicae*. Στο παρακάτω πίνακα, δίνονται οι τιμές των συντελεστών γενετικής παρέκκλισης F_{ST} για όλους τους γονιδιακούς τόπους και πληθυσμούς.

	CEGP*	CGT	NGP	NGT	SERP	SERT	ZIMT
CEGP	-						
CGT	0,027 NS	-					
NGP	0,016 NS	-0,006 NS	-				
NGT	0,032 NS	-0,003 NS	-0,006 NS	-			
SERP	0,036 NS	0,077 **	0,061 **	0,073 *	-		
SERT	0,059 *	0,054 *	0,052 *	0,086 *	0,103 **	-	
ZIMT	0,100 *	0,128 **	0,114 ***	0,125 *	0,026 NS	0,201 **	-

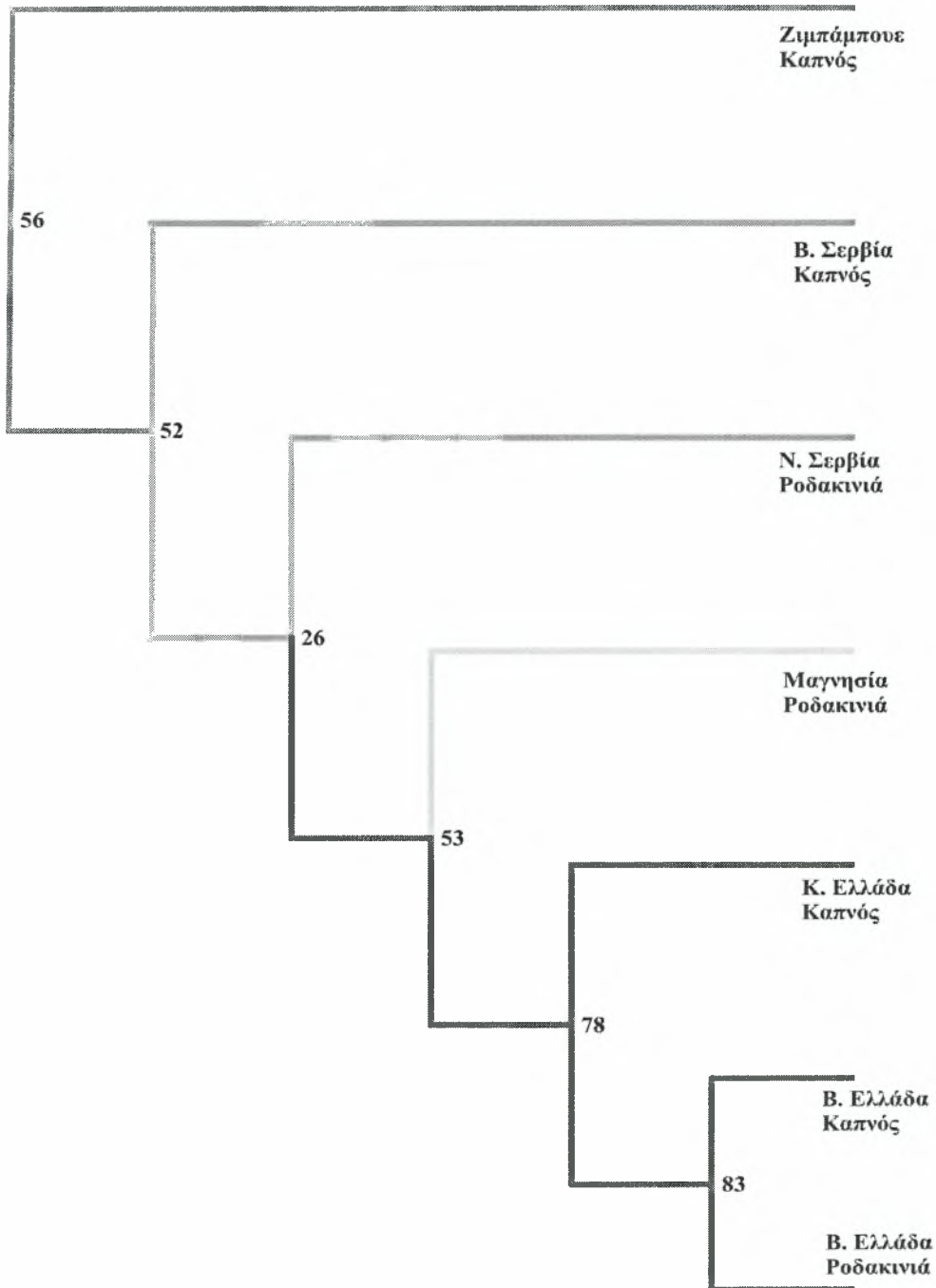
*Για επεξήγηση των κωδικών βλέπε Πίνακα 4. NS = non significant ($P > 0.05$), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

Πίνακας 7. Αποτελέσματα Ανάλυσης Μοριακής Παραλλακτικότητας (AMOVA) και ολικός συντελεστής γενετικής παρέκκλισης F_{ST} .

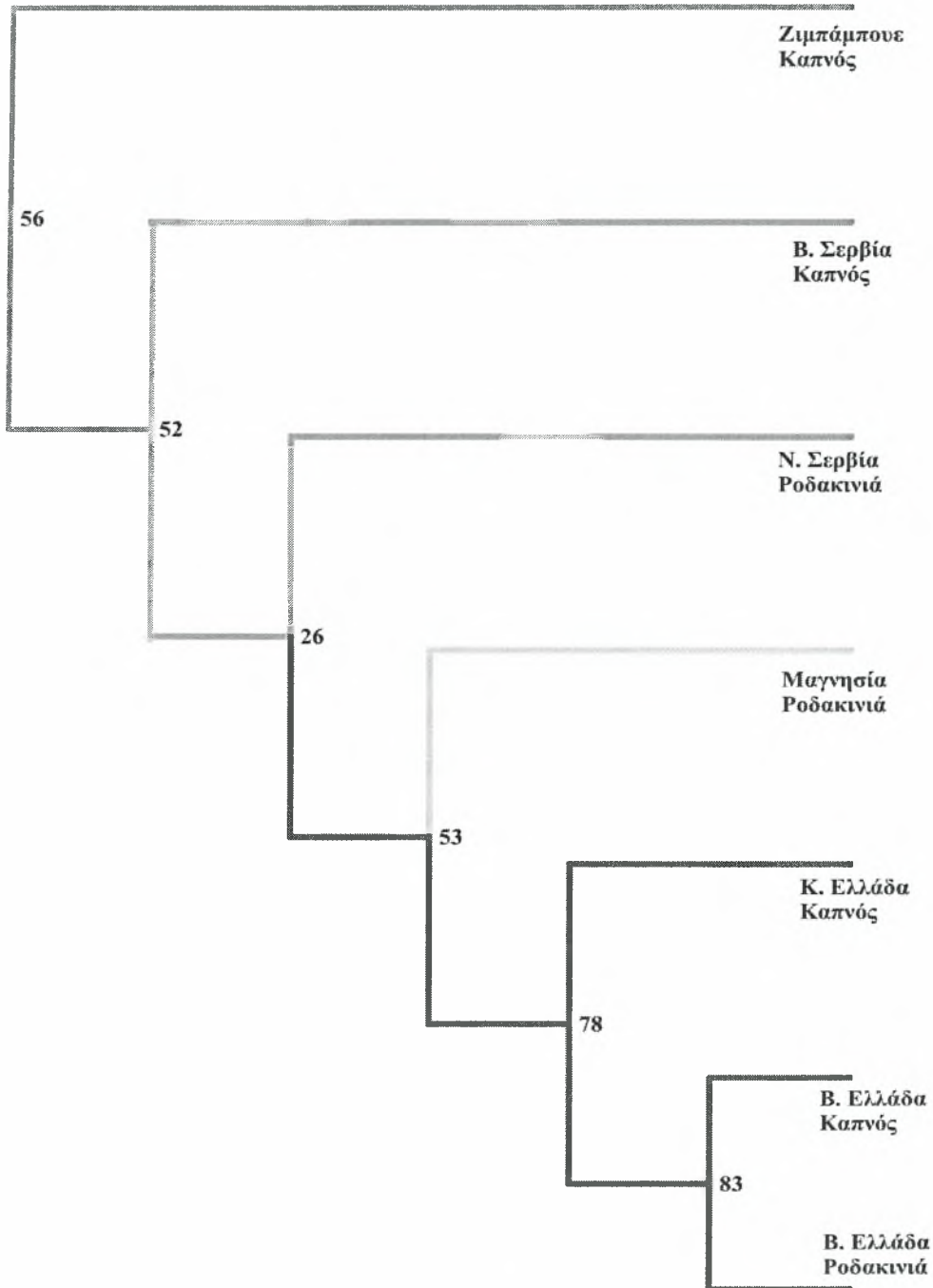
Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	Άθροισμα τετραγώνων	Στοιχεία Παραλλακτικότητα	Παραλλακτικότητα %
Μεταξύ πληθυσμών	6	14.3	0.0437*	4.27
Εντός πληθυσμού	229	224.2	0.9792*	95.73
Σύνολο	235	238.5	1.0228*	
Ολικός συντελεστής F_{ST}		0,0427*		

B.E. = Βαθμοί Ελευθερίας, * $P < 0.001$

Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η UPGMA ανάλυση βασιζόμενη στις γενετικές αποστάσεις των Chakraborty & Jin (1993) και των Nei et al. (1983) (Σχήματα 4α, 4β). Οι ξενικοί πληθυσμοί τοποθετήθηκαν εκτός της ομάδας των Ελληνικών. Μεταξύ των Ελληνικών πληθυσμών υπήρξε επιπλέον διαφοροποίηση. Ο πληθυσμός από τη Μαγνησία, όπου δεν καλλιεργείται καπνός διαφοροποιήθηκε από αυτούς που συλλέχθηκαν από περιοχές (Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα) όπου καλλιεργείται, ανεξάρτητα από τον ξενιστή συλλογής (ροδακινιά ή καπνός). Επίσης, ο πληθυσμός από καπνό από τη Β. Σερβία διαφοροποιήθηκε από αυτόν από ροδακινιά από τη Κ. Σερβία όπου δεν καλλιεργείται καπνός.



Σχήμα 4α. UPGMA δενδρόγραμμα βασισμένο στις γενετικές αποστάσεις: (A): των Chakraborty & Jin (1993) (DAS) μεταξύ των επτά πληθυσμών *Myzus persicae* που εξετάστηκαν: Μαγνησία-ροδακινιά (N = 21), Β. Ελλάδα-Ροδακινιά (N = 34), Β. Ελλάδα-Καπνός (N = 13), Κ. Ελλάδα-Καπνός (N = 23), Β. Σερβία-Καπνός (N = 10), Ν. Σερβία-Ροδακινιά (N = 10) και από Ζιμπάμπουε-Καπνός (N = 7).



Σχήμα 4β. UPGMA δενδρόγραμμα βασισμένο στις γενετικές αποστάσεις: των Nei et al. (1983) (Da) μεταξύ των επτά πληθυσμών *Myzus persicae* που εξετάστηκαν: Μαγνησία-ροδακινιά (N = 21), Β. Ελλάδα-Ροδακινιά (N = 34), Β. Ελλάδα-Καπνός (N = 13), Κ. Ελλάδα-Καπνός (N = 23), Β. Σερβία-Καπνός (N = 10), Ν. Σερβία-Ροδακινιά (N = 10) και από Ζιμπάμπουε-Καπνός (N = 7).

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής ανέδειξαν σημαντική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών του *M. persicae* τόσο σε βιολογικά όσο και σε γενετικά χαρακτηριστικά, όπως αυτά εξετάστηκαν με την καταγραφή της κατηγορίας βιολογικού κύκλου και την ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA

6.1 Κατηγορία βιολογικού κύκλου.

Ο βιολογικός κύκλος μελετήθηκε στους Ελληνικούς πληθυσμούς και σε αυτούς από την Ζιμπάμπουε. Στη χώρα της Ν. Αφρικής δεν βρέθηκε σεξουαλική αναπαραγωγή. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι σε περιοχές της γης με υψηλή θερμοκρασία δεν ευδοκούν ολοκυκλικοί γενότυποι (δηλαδή αυτοί που έχουν μια σεξουαλική γενιά το χρόνο στον πρωτεύοντα ξενιστή, τη ροδακινιά, όπου παράγουν το διαχειμάζον ωό). Επίσης, στη συγκεκριμένη περιοχή λόγω του ήπιου χειμώνα είναι πιθανώς εφικτή η συνεχής παρθενογενετική αναπαραγωγή όλο το χρόνο σε ποώδεις ξενιστές (Blackman 1974). Όπως ήταν αναμενόμενο, η πλειονότητα των κλώνων από ροδακινιά στην Ελλάδα ήταν ολοκυκλικοί, δηλαδή προήλθαν από το διαχειμάζον ωό, προϊόν σεξουαλικής αναπαραγωγής που έλαβε χώρα το προηγούμενο Φθινόπωρο. Στον καπνό υψηλό ποσοστό ολοκυκλικών κλώνων βρέθηκε στη Β. Ελλάδα, όπου καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά. Οι ολοκυκλικοί κλώνοι από τη ροδακινιά μεταναστεύουν στο τέλος της άνοιξης-αρχές καλοκαιριού στις πλησίον καπνοκαλλιέργειες. Αντίθετα, στην Κ. Ελλάδα, όπου δεν καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά (μόνο σποραδικοί οπωρώνες συναντώνται), το πλείστο των κλώνων από καπνό ήταν μη-ολοκυκλικοί, δηλαδή μπορούν και αναπαράγονται όλο το χρόνο παρθενογενετικά. Επίσης, βρέθηκε κάποια συσχέτιση χρώματος και κατηγορίας βιολογικού κύκλου, με περισσότερους πράσινους κλώνους να επενδύουν στη σεξουαλική αναπαραγωγή από ότι οι κόκκινοι. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προγενέστερη μελέτη όπου εξετάστηκε η παραλλακτικότητα στη στρατηγική αναπαραγωγής σε πληθυσμούς από διάφορους ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας (Margaritopoulos et al. 2002).

6.2 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA

Η ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA ανέδειξε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών της αφίδας που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Τόσο η ανάλυση F_{ST} όσο και αυτή που βασίστηκε στις γενετικές αποστάσεις των Chakraborty & Jin (1993) (shared allele distance, DAS) και των Nei et al. (1983) (Da) διαχώρισε τους Ελληνικούς πληθυσμούς από αυτούς της Σερβίας και της Ζιμπάμπουε. Οι τιμές F_{ST} που υπολογίστηκαν μεταξύ των ελληνικών και των ξενικών πληθυσμών (κυρίως 0,05 - 0,13) είναι από τις μεγαλύτερες που έχουν καταγραφεί σε μελέτες γενετικής παραλλακτικότητας αφίδων με τη χρήση μικροδορυφόρων [$<0,05$ σε πληθυσμούς από το Ηνωμένο Βασίλειο (Llewellyn et al. 2003), *R. padi*: 0.02 και 0.03 σε σεξουαλικούς και μη-σεξουαλικούς πληθυσμούς από τη Γαλλία, (Delmotte et al. 2002)]. Οι λόγοι της παρατηρούμενης γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών από τις διαφορετικές χώρες δεν είναι επί του παρόντος γνωστοί. Η φυσική επιλογή είναι ένας παράγοντας, καθώς διαφορετικοί γενοτύποι προσαρμόζονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Στο *M. persicae* η απουσία ή η παρουσία της ροδακινιάς είναι υπεύθυνη για τη γεωγραφική κατανομή αυτών των γενοτύπων, όπως έδειξαν επίσης προγενέστερες μελέτες με πληθυσμούς από την Ελλάδα και τη νότια Ιταλία (Margaritopoulos et al. 2002, Blackman et al. submitted). Ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα είναι η διαφοροποίηση του πληθυσμού από τη Μαγνησία, περιοχή όπου δεν καλλιεργείται καπνός, από αυτούς από περιοχές της Ελλάδας όπου καλλιεργείται καπνός. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο καπνός αποικίζεται από το υποείδος *M. persicae nicotianae* ενώ στην περιοχή της Μαγνησίας επικρατεί το taxon *M. persicae* s.str. που αποικίζει άλλους δευτερεύοντες ξενιστές (Margaritopoulos et al. 2000). Η γενετική αυτή διαφοροποίηση έχει τεκμηριωθεί αρκετά καλά σε προγενέστερη μελέτη όπου αναλύθηκαν πληθυσμοί από την Ελλάδα με 5 μικροδορυφορικούς τόπους (Margaritopoulos et al. submitted). Τα στοιχεία της παρούσας εργασίας δίνουν ενδείξεις ότι ανάλογη περίπτωση μπορεί να ισχύει και στους πληθυσμούς της Σερβίας. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να τεκμηριωθεί αυτή η υπόθεση.

Ενδιαφέρον παρουσίασε η γεωγραφική εξάπλωση ορισμένων κοινών γενοτύπων. Συγκεκριμένα ο ίδιος γενότυπος βρέθηκε στην Ελλάδα, στη Σερβία και στη Ζιμπάμπουε. Ακόμη παρατηρήθηκε εξάπλωση του ίδιου γενοτύπου σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας ή και στη Σερβία. Το φαινόμενο αυτό είναι σχετικά συχνό τόσο στο ίδιο όσο και σε άλλα είδη αφίδων, όπως έχουν δείξει

διάφορες μελέτες την τελευταία δεκαετία που βασίζονται στην ανάλυση DNA (Sunnucks et al. 1996, Vorburger et al. 2003, Fuentes-Contreras et al. 2004, Margaritopoulos et al. submitted). Τα συγκριτικά πλεονεκτήματα των ευρέως εξαπλωμένων γενοτύπων που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία αποτελούν αντικείμενο περαιτέρω έρευνας. Παρόλη τη γεωγραφική εξάπλωση ορισμένων κοινών γενοτύπων του *M. persicae*, τα αποτελέσματα, ιδιαίτερα της ανάλυσης F_{ST} (σημαντική γενετική παρέκκλιση), έδειξαν ότι το συγκεκριμένο είδος δεν είναι αρκετά μεταναστευτικό. Στο συμπέρασμα αυτό κατέληξαν οι Margaritopoulos et al. (submitted) όπου βρήκαν υψηλή γενετική διαφοροποίηση ακόμη και μεταξύ πληθυσμών που απέχουν μόλις 100 km. Τα συμπεράσματα ότι η προσαρμογή σε συγκεκριμένο ξενιστή και η κατηγορία βιολογικού κύκλου είναι σημαντικοί παράγοντες επιλογής, φαίνεται ότι πιθανώς ισχύουν και για τους Ευρωπαϊκούς πληθυσμούς που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Η μικρή μεταναστευτική ικανότητα του είδους έχει διαπιστωθεί και σε πληθυσμούς από τη Γαλλία (Guillemaud et al. 2003) και την Αυστραλία με την ανάλυση μικροδορυφορικού DNA (Vorburger et al. 2003).

Ένα άλλο σημείο προς συζήτηση είναι η έλλειψη ετεροζυγωτίας που παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς που εξετάστηκαν ανεξάρτητα από την περιοχή προέλευσης ή την επικρατούσα στρατηγική αναπαραγωγής. Από ορισμένους ερευνητές έχει προταθεί η άποψη ότι πληθυσμοί που αποτελούνται από μη-σεξουαλικούς γενότυπους αφίδων με μακρά εξελικτική ιστορία (αρχαίοι γενότυποι) παρουσιάζουν περίσσεια ετεροζυγωτίας (Delmotte et al. 2002). Η περίσσεια ομοζυγωτίας που παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς με μεγάλο ποσοστό μη σεξουαλικών γενοτύπων (Κ. Ελλάδα, Ζιμπάμπουε) μπορεί να εξηγηθεί μέσω μιας πρόσφατης δημιουργίας των μη-σεξουαλικών γενοτύπων. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω διασταύρωσης των μη-σεξουαλικών γενοτύπων (ορισμένοι παράγουν λίγα έμφυλα άτομα) με τους ολοκυκλικούς γενότυπους. Προγενέστερη μελέτη της παραλλακτικότητας του βιολογικού κύκλου στην Ελλάδα (Margaritopoulos et al. 2002) έδειξε ότι μέχρι το 33% των κλώνων, που συλλέχθηκαν στον πρωτεύοντα ξενιστή, τη ροδακινιά, δεν ήταν ολοκυκλικοί (= έχουν σεξουαλική φάση το φθινόπωρο). Αυτό υποδηλώνει τη μετάδοση της ανολοκυκλικότητας μέσω της σεξουαλικής αναπαραγωγής. Δυστυχώς, δεν ήταν δυνατό να μελετηθεί ο βιολογικός κύκλος των δειγμάτων από καπνό από τη Σερβία για να εξηγηθεί πληρέστερα το φαινόμενο της έλλειψης ετεροζυγωτίας. Η παρούσα εργασία έδειξε έλλειψη

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* 70
(Hemiptera:Aphididae) με μοριακές μεθόδους

ετεροζυγωτίας ακόμη και στα δείγματα που συλλέχθηκαν από ροδακινιά (Β. Ελλάδα, Μαγνησία, Κ. Σερβία), όπου οι κλώνοι που εξετάστηκαν είναι προϊόντα σεξουαλικής αναπαραγωγής. Αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη αφίδων (Delmotte et al. 2002) αλλά και σε πληθυσμούς του *M. persicae* στη Γαλλία (Guillemaud et al. 2003), την Αυστραλία και σε προγενέστερη μελέτη Ελληνικών πληθυσμών (Margaritopoulos et al. submitted). Διάφορες θεωρίες έχουν διατυπωθεί για αυτό το φαινόμενο (Delmotte et al. 2002), π.χ. μηδενικό αλληλόμορφο, ομομιξία και επιλογή. Περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για να αποδειχθεί κατά πόσο εμπλέκονται η επιλογή ή η ομομιξία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Allen, R. C. & Budowle, B.** (1994) Gel Electrophoresis of Proteins and Nucleic Acids: Selected Techniques. W. de Gruyter, Berlin.
- Beebee, T. C. & Rowe G.** (2004) *An introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press, UK.
- Blackman, R. L.** (1971) Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Bulletin of Entomological Research* **60**, 533-546.
- Blackman, R. L.** (1972) The inheritance of life-cycle differences in *Myzus persicae* (Sulz.) (Hem., Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* **62**, 281-294.
- Blackman, R. L.** (1974) Life cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hom., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bulletin of Entomological Research* **63**, 595-607.
- Blackman, R. L.** (1978) Early development of the parthenogenetic egg in three species of aphids (Hemiptera: Aphididae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **7**, 33-44.
- Blackman, R. L.** (1980) Chromosomes and parthenogenesis in aphids. pp. 133-148. *In*: Blackman, R. L., Hewitt, G. M. & Ashburner M. (Eds), *Insect Cytogenetics*. 10th Symposium of the Royal Entomological Society of London, Blackwell, Oxford.
- Blackman, R. L.** (1987) Morphological discrimination of a tobacco feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), and a key to New World *Myzus* (Nectarosiphon) species. *Bulletin of Entomological Research* **77**, 713-730.
- Blackman, R. L.** (1990) Specificity in aphid/plant genetic interactions, with particular attention to the role of the alate colonizer. pp. 251-274. *In* Campbell R. K. & Eikenbary R. D. (Eds) *Aphid-Plant Genotype Interactions*. Elsevier, New York.
- Blackman, R. L. & Eastop, V. F.** (2000) *Aphids of the World's Crops: An Identification and Information Guide*. Second edition. John Wiley & Sons Publications, London.
- Blackman, R. L. & H. Takada** (1975) A naturally occurring chromosomal translocation in *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Entomology* **50**, 147-156.

- Blackman, R.L. & Spence, J.M.** (1992) Electrophoretic distinction between the peach-potato aphid, *Myzus persicae* and the tobacco aphid, *Myzus nicotianiae* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* **82**, 161-165.
- Blackman, R. L., J. M. Spence, L. M. Field & Devonshire, A. L.** (1999) Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (*FE4*) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Heredity* **82**, 180-186.
- Blackman, R., Malarky, G., Margaritopoulos, J., Kephalogianni, T., Tsitsipis, J. & Wilson, A.** (2001) Tobacco aphid, or not tobacco aphid - that is the question! p. 71, *Sixth International Symposium on Aphids 'Aphids in a New Millennium'*, 3-7 September 2001, Rennes, France.
- Blackman, R.L., Malarky, G., Margaritopoulos, J.T. & Tsitsipis, J.A** (submitted) Genetic structure of populations of *Myzus persicae* in Greece, in relation to life cycle and host plant. *Bulletin of Entomological Research*.
- Brunt A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. & Watson, L.** (1996) *Viruses of plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Cab International.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R.I., Mulley, J. C., Sutherland, G. R.** (1993) Incidence and origin of "Null" alleles in the (AC)n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* **52**, 922-927.
- Chakraborty, R. & Jin, L.** (1993) A unified approach to the study of hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. pp. 153-175. In Pena, D. J., Chakraborty, R., Epplen, J. T. & Jeffreys, A. J. S. (Eds) *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Birkhauser, Basel, Switzerland.
- Darwin, C.** (1872) *The origin of species*.
- Delmotte, F., Leterme, N., Bonhomme, J., Rispe, C. & Simon, J-C.** (2001) Multiple routes to asexuality in an aphid specie *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **268**, 2291-2299.
- Delmotte, F. Leterme, N., Gauthier, J.-P., Rispe, C. & Simon, J.-C.** (2002) Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**, 711-723.

- Devonshire, A., Denholm, I. & Foster, S.** (1999) Insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* στα εντομοκτόνα. pp. 87-94. *In* Denholm, I. & Ioannidis, P.M. (Eds.) *Combating Insecticide Resistance*. AgroTypos SA, Athens.
- Dixon, A. F. G.** (1966) The effect of the population density and nutritive status of the host on the summer reproductive activity of the sycamore aphid, *Drepanosiphum platanoides* (Suchr.). *Journal of Animal Ecology* **35**, 105-112.
- Dixon, A. F. G.** (1998) *Aphid Ecology*. Second Edition. Chapman and Hall, London, U.K.
- Eastop, V. F.** (1977) Worldwide importance of aphids as virus vectors. *In*: K. F. Harris and K. Maramorosch (eds.), *Aphids as Virus Vectors*, pp. 3-62. London, Academic Press.
- Eastop, V. F. & Blackman, R. L.** (2005) Some new synonyms in Aphididae (Hemiptera). *Zootaxa* **1089**, 1-36.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M.** (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479-491.
- Field, L. M., Javed, N., Stribley, M. F. & Devonshire, A. L.** (1994) The peachpotato aphid *Myzus persicae* and the tobacco aphid *Myzus nicotianae* have the same esterase-based mechanisms of insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* **3**, 143-148.
- Field, L. & Blackman, R.** (2003) Insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer): chromosome location and epigenetic effects on esterase gene expression in clonal lineages. *Biological Journal of the Linnean Society* **79**, 107-113.
- Fuentes-Contreras, E., Figueroa, C. C., Reyes, M., Briones, L. M. & Niemeyer, H. M.** (2004) Genetic diversity and insecticide resistance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations from tobacco in Chile: evidence of a single predominant clone, *Bulletin of Entomological Research* **94**, 11-18.
- Futuyma, D. J.** (1997) *Evolutionary Biology*. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Φανουράκης Ν.**(2002) Γενετική Βελτίωση Φυτών, Βασικές Αρχές. Τ.Ε.Ι Ηρακλείου. pp. 32-34, 271-277.
- Goldstein, D. & Schlotterer, C.** (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford.

- Goodman & Simon J.** (1998) Patterns of extensive genetic differentiation and variation among European harbor seals (*Phoca vitulina vitulina*) revealed using microsatellite DNA polymorphisms. *Molecular Biology and Evolution* **15**,104-118.
- Guillemaud, T., Mieuzet, L., & Simon, J-C.** (2003) Spatial and temporal genetic variability in French populations of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Heredity* **91**,143-152.
- Guillemaud, T., Brun, A., Anthony, N., Sauge, M. I., Boll , R., Delorme , R., Fournier, D., Lapchin, L., & Vanlerberghe-Masutti, F.** (2003) Incidence of insecticide resistance alleles in sexually-reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) from southern France. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 289-297.
- Γούναρης, Ι.**(2000) Μοριακή Γενετική. Γεωπονικό Τμήμα Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. pp. 65.
- Hales, D. F., Tomiuk, J., Wöhrmann, K. & Sunnucks, P.** (1997) Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: a review. *European Journal of Entomology* **94**, 1-55.
- Hales, D., Wilson, A. C. C., Spence, J. M. & Blackman, R. L.** (2000) Confirmation that *Myzus antirrhinii* (Macchiati) (Hemiptera: Aphididae) occurs in Australia, using morphometrics, microsatellite typing and analysis of novel karyotypes by fluorescence in situ hybridization. *Australian journal of Entomology* **39**, 123-129.
- Heie, O. E.** (1980) *The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. II. The Family Drepanosiphidae.* Scandinavian Science Press, Klampenborg.
- Hille, R. & Lambers, D.** (1953) Contribution to a monograph of the Aphididae of Europe. *V. Temminckia* **9**, 1-176.
- Illharco, F. A & A. van Harten.** (1987) Systematics. pp. 51-76. In Minks A. K. & P. Harrewijn (Eds) *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control*, **2A**, Elsevier, Amsterdam.
- Istock, C. A.** (1967) The evolution of complex life history phenomena: an ecological perspective. *Evolution* **21**, 211-234.
- Kashi, Y. & Soller, M.** (1999) Functional Roles of Microsatellites and Minisatellites. In Goldstein & Schlotterer (Eds) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press.
- Kelley, A. J. & Willis, J. H.** (1998) Polymorphic microsatellite loci in *Mimulus guttatus* and related species. *Molecular Ecology* **7**, 769-774.

- Kennedy, J. S., Day, M. F. & Eastop, V. F.** (1962) *A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses*. Commonwealth Institute of Entomology, London.
- Kundu, R. & Dixon, A. F. G.** (1995) Evolution of complex life cycles. *Journal of Animal Ecology* **64**, 245-255.
- Lees, A. D.** (1966) The Control of polymorphism in aphids. *Advances Insect Physiology* **3**, 207-277.
- Margaritopoulos, J. T., Mamuris, Z. & Tsitsipis, J. A.** (1998) Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Hemiptera: Aphididae) by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique. *Annals of the Entomological Society of America* **91**, 602-607.
- Margaritopoulos, J. T., Tsitsipis, J. A., Zintzaras, E. & Blackman, R. L.** (2000) Host-correlated morphological variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations in Greece. *Bulletin of Entomological Research* **90**, 233-244.
- Margaritopoulos, J. T., Tsitsipis, J. A., Goudoudaki S. & Blackman, R. L.** (2002) Life cycle variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in Greece. *Bulletin of Entomological Research* **92**, 309-319.
- Margaritopoulos, J. T., Blackman, R. L., Tsitsipis, J. A. & Sannino, L.** (2003) Coexistence of different host-adapted forms of *Myzus persicae* in the region of Caserta in South Italy. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 131-135.
- Margaritopoulos, J. T., Tsourapas, C., Tzortzi, M., Kanavaki, O. M. & Tsitsipis, J. A.** (2005) Host selection by winged colonisers within the *Myzus persicae* group: a contribution towards understanding host specialization. *Ecological Entomology* **30**, 406-418.
- Margaritopoulos, J. T., Malarky, G., Tsitsipis, J. A. & Blackman, R. L.** (submitted) Microsatellite DNA and behavioural studies provide evidence of host-mediated speciation processes in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Evolutionary Biology*.
- Miyazaki, M.** (1987) Morphology of Aphids. pp. 1-25. In Minks A.K. & Harrewijn, P. (eds.), *Aphids Their Biology, Natural Enemies and Control*, **2A**. Elsevier, Amsterdam.
- Moran, N. A.** (1990) Aphid life cycles: two evolutionary steps. *American Naturalist*. **136**, 135-138.

- Mordvilko, A. K.** (1928) The evolution of cycles and the origin of heteroecy (migrations) in plant-lice. *Annals and Magazine Natural History (Series 10)* **2**, 570-582.
- Müller, F. P.** (1958) Bionomische Rassen der Grünen Pflanzschnecke *Myzus persicae* (Sulz.). *Archiv der Freunde der Naturgeschichte in Mecklenburg* **4**, 200-233.
- Mullis, K.** (1983) General nature of genetic code for proteins. *Nature* **192**, 1227-1232.
- Murphy, R. W.** (1993) The phylogenetic analysis of allozyme data: invalidity of coding alleles by presence/absence and recommended procedures. *Biochemical Systematics and Ecology* **21**, 25-38.
- Nei, M., Tajima, F., Tateno, Y.** (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* **19**, 153-170.
- Nikolakakis, N. N., Margaritopoulos, J. T. & Tsitsipis, J. A.** (2003) Performance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) clones on different host-plants and their host preference. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 235-242.
- Price, P. W.** (1984) *Insect Ecology*. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Raymond, M. & Rousset, F.** (1995a) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Raymond, M. & Rousset, F.** (1995b) An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280-1283.
- Remaudière, G. & H. L. G. Stroyan.** (1984) Un *Tamalia* nouveau de Californie (USA). Discussion sur les Tamaliinae subfm. nov. (Hom. Aphididae). *Annales de la Société Entomologique de la France (Nouvelle Serie)* **20**, 93-103.
- Remaudière, G. & Remaudière, M.** (1997) *Catalogue of the World's Aphididae (Hemiptera, Aphidoidea)*. INRA, Paris.
- Rivnay, E.** (1962) *Field Crop Pests in the Near East*. W. Junk, Den Haag.
- Robinson, J. P. & Harris, S. A.** (1999) *Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective*, Department of Plant Sciences. University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, Great Britain.
- Schlötterer, C. & Pemberton, J.** (1994) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. pp. 203-214. In Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G.P. & DeSalle, R. (Eds). *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland,

- Schneider, S, Roessli, D. & Excoffier, L.** (2000) *Arelquin. A software for population genetic data analysis*, Version 2.0. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Shaposhnikov, G. K.** (1981) *Population and Species in Aphids and the Need for a Universal Species Concept*. Special Publication, Research Branch, Agriculture Canada.
- Shaposhnikov, G. C.** (1987) Evolution of aphids in relation to evolution of plants. pp. 409-414. In Minks, A. K. & Harrewijn, P. (Eds), *Aphids their Biology, Natural Enemies and Control 2A*. Elsevier, Amsterdam.
- Slade, N. A. & Wassersung, R. J.** (1975) On the evolution of complex life cycles. *Evolution* **29**, 568-571.
- Sloane, M., Sunnucks, P. & Wilson, A.** (2001) Microsatellite isolation, linkage group identification and determination of recombination frequency in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Genetical Research Cambridge* **77**, 251-260.
- Sunnucks, P., England, P. E., Taylor, A. C. & Hales, D. F.** (1996) Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic *Sitobion* aphids in Australia. *Genetics* **144**, 747-756.
- Sunnucks, P.** (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Evolution* **5**, 199-203.
- Takada, H.** (1986) Genotype composition and insecticide resistance of Japanese population of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **102**, 19-38.
- Toda, S., Komazaki, S., Tomita, T. & Kono, Y.** (2004) Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology* **13**, 549-553.
- Troncoso, A. J., Vargas, R. R., Tapia, D. H., Olivares-Donoso, R. & Niemeyer, H. M.** (2005) Host selection by the generalist aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and its subspecies specialized on tobacco, after being reared on the same host. *Bulletin of Entomological Research* **95**, 23-28.
- Tsitsipis, J. A., Lykouressis, D., Katis, N., Avgelis, A. D., Gargalianou, J., Papapanayotou, A. & Kokinis, G. M.** (1997) Aphid species diversity demonstrated by suction trap captures in different areas in Greece. pp. 495-501. In

- Nieto J.M. Nafria & Dixon, A. F. G. (Eds.), *Aphids in natural and managed ecosystems*. Universidad de León (Secretariado de publicaciones), León (Spain).
- Van Emden, H. F., Eastop, V. F, Hughes, R. D. & Way, M. J.** (1969) The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Revue of Entomology* **14**, 197-270.
- Vorburger, C., Lancaster, M. & Sunnucks, P.** (2003) Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two ‘superclones’ in Victoria, Australia. *Molecular Ecology* **12**, 3493-3504.
- Weed, C. L.** (1896) The hibernation of aphids. *Psyche* **7**, 351-362.
- Wilbur, H. M.** (1980) Complex life cycles. *Annual Review of Ecological Systems* **11**, 67-93.
- Wilson, A. C. C., Sunnucks, P., Blackman, R. L. & Hales, D. F.** (2002) Microsatellite variation on cyclically parthenogenetic populations of *Myzus persicae* in south-eastern Australia. *Heredity* **88**, 258-266.
- Wilson, A. C. C., Sunnucks, & Hales, D. F** (2003) Heritable genetic variation and potential for adaptive evolution in asexual aphids (Aphidoidea). *Biological journal of the Linnean Society* **79**, 115-135.
- Wilson, A. C. C., Massonnet, B., Simon, J. C., Prunier-Letrme, N., Dolatti, L., Llewellyn, K. S., Figueroa, C. C., Ramirez, C.C., Blackman, R.L., Estoup, A. & Sunnucks, P.** (2004) Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment ant application. *Molecular Ecology Notes* **4**, 104-109.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C.** (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wong, M. L. & Medrano, J. F.** (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**, 75-85.
- Wright, S.** (1931) Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* **16**, 97-158.
- Χατζόπουλος, Π.** (2001) *Βιοτεχνολογία Φυτών*. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.
- 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.

<http://en.wikipedia.org/wiki/Evolution>

www.ent.vt.edu

www.inra.fr

Μελέτη της γενετικής πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* 79
(Hemiptera:Aphididae) με μοριακές μεθόδους

UMcMcSPi Mf

1. ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Απομόνωση DNA (Sunnucks & Hales, 1996)

- (1) Τοποθετείται μια αφίδα σε κάθε περιέκτη που περιέχει 300 µl διαλύματος TEN (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 2 mM EDTA, pH 8.0)/ 2% SDS (σε αναλογία 9:1) και 30 µl πρωτεΐνάσης K (20 mg/ml). Ακολουθεί ομογενοποίηση του μίγματος.
- (2) Επώαση του μίγματος στους 55 °C για 3 ώρες.
- (3) Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 100 µl NaCl 5M σε κάθε δείγμα.
- (4) Ακολουθεί έντονη ανακίνηση (vortex) των δειγμάτων για 15-30 sec και αμέσως μετά τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για 5 min στις 14.000 στροφές (τέτοιου είδους ανακίνηση σπάζει τα τμήματα του DNA σε κομμάτια μικρότερα των 10-20 kb).
- (5) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριους περιέκτες, όπου γίνεται προσθήκη 1 ml κρύας αιθανόλης 100%. Το μίγμα αναμειγνύεται με απαλή αναστροφή του περιέκτη.
- (6) Γίνεται τοποθέτηση των δειγμάτων στο πάγο ή στους -20 °C για 5 min και ακολουθεί φυγοκέντρωση στους 4 °C για 15 min.
- (7) Το υπερκείμενο αφαιρείται και ο περιέκτης αφήνεται να στεγνώσει για μερικά δευτερόλεπτα σε απορροφητικό χαρτί τύπου Whatman. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70 %.
- (8) Τα δείγματα τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για 3 min στις 13.000 στροφές
- (9) Επαναλαμβάνονται τα βήματα 7 και 8.
- (10) Το υπερκείμενο αφαιρείται με πιπέτα ακριβείας και οι περιέκτες αφήνονται να στεγνώσουν σε απορροφητικό χαρτί.
- (11) Το DNA πρέπει να βρίσκεται στο κάτω μέρος του περιέκτη με τη μορφή μικρής, άσπρης, κηλίδας. Οι περιέκτες αφήνονται σκεπασμένοι με αλουμινόχαρτο (αλλά με ανοιχτό καπάκι), σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 min.
- (12) Μόλις διαπιστωθεί ότι ο περιέκτης είναι τελείως στεγνός, γίνεται προσθήκη 40 µl υπερκάθαρου H₂O.
- (13) Το DNA διαλύεται, με επώαση των δειγμάτων στους 37 °C για 30 min.

(14) Αν το DNA χρησιμοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα, αποθηκεύεται στους 4 °C. Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε διάστημα 1-6 μήνες συντηρείται στους -21 °C και για πολύ μεγαλύτερο φυλάσσεται στους -70 °C.

1.2 Απομόνωση DNA (Martinez-Torres et al. 1997)

(1) Σε κάθε περιέκτη χωρητικότητας 1,5 ml, που περιέχει 160 µl διαλύματος 1 (10 mM Tris, 60 mM NaCl, 5% σουκρόζη και 10 mM EDTA p.H 7.8), τοποθετείται μια αφίδα και γίνεται ομογενοποίησή της.

(2) Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 200µl διαλύματος 2 (300mM Tris: 1.25% SDS, 5% σουκρόζη και 10 mM EDTA p.H 9.0).

(3) Τα δείγματα τοποθετούνται στο φούρνο, επώαση στους 65 °C για 30 min.

(4) Ακολουθεί προσθήκη 60 µl Sodium acetate 3M και το μίγμα τοποθετείται στους -20 °C για 20 min.

(5) Γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 min στις 14.000 στροφές.

(6) Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο περιέκτη που περιέχει 420 µl ισοπροπανόλης.

(7) Οι περιέκτες αφήνονται κλειστοί σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min.

(8) Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και ο περιέκτης αφήνεται για μερικά δευτερόλεπτα να στεγνώσει σε διηθητικό χαρτί.

(9) Προσθήκη στον περιέκτη 1 ml αιθανόλης 70 % και φυγοκέντρηση για 5 min.

(10) Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και ο περιέκτης αφήνεται για μερικά δευτερόλεπτα να στεγνώσει σε διηθητικό χαρτί.

(11) Το DNA πρέπει να βρίσκεται στο κάτω μέρος του περιέκτη με τη μορφή μικρής, άσπρης, κηλίδας. Οι περιέκτες αφήνονται σκεπασμένοι με αλουμινόχαρτο (αλλά με ανοιχτό καπάκι), σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 min.

(12) Μόλις διαπιστωθεί ότι ο περιέκτης είναι τελείως στεγνός, γίνεται προσθήκη 40 µl υπερκάθαρου H₂O.

(13) Το DNA διαλύεται, με επώαση των δειγμάτων στους 37 °C για 30 min.

(14) Αν το DNA χρησιμοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα, αποθηκεύεται στους 4°C. Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε διάστημα 1-6 μήνες συντηρείται στους -21°C και για πολύ μεγαλύτερο φυλάσσεται στους -70 °C.

1.3 Χρώση με Νιτρικό άργυρο (AgNO_3)(Promega®)

(A) Προετοιμασία των διαλυμάτων

Διάλυμα σταθεροποίησης και τερματισμού: (10 % οξικό οξύ): Σε 900 ml νερού διπλής απόσταξης προσθέτονται 100 ml οξικού οξέος

Διάλυμα χρώσης: Σε 1 L νερό διπλής απόσταξης γίνεται προσθήκη 1 gr AgNO_3 και 1.5 ml φορμαλδεΰδη 37 %.

Διάλυμα ανάπτυξης: Σε 2 L νερό διπλής απόσταξης που έχει τοποθετηθεί σε ψυγείο ώστε να αποκτήσει θερμοκρασία 10 °C, διαλύονται 60 gr NaCO_3 . Αμέσως πριν από τη χρήση, γίνεται προσθήκη 3 ml φορμαλδεΰδη 37 % και 400ml διαλύματος θειοσουλφιδίου του νατρίου (10 mg/ml).

(B) Διαδικασία της χρώσης

(1) **Διαχωρισμός των υάλινων πλακών:** Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης, γίνεται ο διαχωρισμός των τζαμιών με πολύ προσεκτικό τρόπο. Η πηκτή πρέπει να είναι σταθεροποιημένη στο τζάμι που επεξεργάστηκε με το διάλυμα του Bind Silane.

(2) **Σταθεροποίηση της πηκτής:** Η πηκτή τοποθετείται σε ένα πλαστικό δίσκο, καλύπτεται με το διάλυμα σταθεροποίησης και τοποθετείται σε μηχανήμα ανάδευσης για περίπου 20 min. Το χρονικό διάστημα αυτού του σταδίου μπορεί να ποικίλει γιατί η πηκτή πρέπει να παραμείνει στο συγκεκριμένο διάλυμα μέχρι η μπλε γραμμή που υπάρχει από τη χρωστική να εξαφανιστεί.

(3) **Ξέπλυμα της πηκτής:** Μετά το τέλος του παραπάνω σταδίου, το διάλυμα σταθεροποίησης φυλάσσεται για να χρησιμοποιηθεί στο τέλος της διαδικασίας και η πηκτή τοποθετείται στο πλαστικό δίσκο όπου καλύπτεται με 1 L νερό διπλής απόσταξης. Ο δίσκος με το περιεχόμενό του αναδεύονται για 2 min. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται 3 φορές και κάθε φορά η πηκτή αφαιρείται από το δίσκο το περιεχόμενο του οποίου απορρίπτεται.

(4) **Βάψιμο της πηκτής:** Η πηκτή μεταφέρεται σε καινούριο πλαστικό δίσκο, ο οποίος περιέχει το διάλυμα βαφής και αναδεύεται για 30 min.

(5) **Τελική πλύση της πηκτής:** Μόλις τελειώσει το στάδιο της βαφής, η πηκτή τοποθετείται σε ένα νέο πλαστικό δίσκο που περιέχει 1 L νερό διπλής απόσταξης και

αναδεύεται ελαφρώς. Μέσα σε χρονικό διάστημα 5-10 sec* η πηκτή μεταφέρεται σε πλαστικό δίσκο που περιέχει 1 L από το διάλυμα ανάπτυξης και αναδεύεται μέχρι να εμφανιστεί η πρώτη ζώνη. Τότε η πηκτή αφαιρείται από το δίσκο, απορρίπτεται το διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε και τοποθετείται για ανάδευση με το υπόλοιπο 1 L του διαλύματος ανάπτυξης, μέχρι να εμφανιστούν οι ζώνες από όλα τα προϊόντα της PCR που χρησιμοποιήθηκαν.

* Ο χρόνος μεταφοράς από το νερό στα διάλυμα ανάπτυξης είναι πολύ σημαντικός και πρέπει να τηρείται αυστηρά, γιατί διαφορετικά τα αποτελέσματα θα είναι λανθασμένα. Για παράδειγμα αν ο χρόνος είναι μεγαλύτερος από το επιτρεπόμενο, είναι πιθανό οι ζώνες των αλληλομόρφων να εμφανιστούν με μειωμένη ένταση ή να μην εμφανιστούν καθόλου.

(6) Τερματισμός της αντίδρασης: Μόλις η πηκτή βαφεί σε ικανοποιητικό βαθμό, η αντίδραση τερματίζεται με τη προσθήκη 1 L του διαλύματος σταθεροποίησης που έχει φυλαχτεί από το στάδιο 2. Το διάλυμα σταθεροποίησης αναδεύεται μαζί με την πηκτή για 2-3 min.

(7) Ξέπλυμα της πηκτής: Η πηκτή ξεπλένεται δυο φορές σε δίσκο που περιέχει 1 L νερό διπλής απόσταξης και η κάθε φορά διαρκεί 2 min.

(8) Στέγνωμα της πηκτής: Μετά το τέλος της διαδικασίας η πηκτή αφήνεται να στεγνώσει με τον αέρα, σε θερμοκρασία περιβάλλοντος ώστε να γίνει η διάγνωση των αποτελεσμάτων.

2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

2.1 Παρασκευή πηκτής Αγαρόζης (50 ml)

- Σε κωνική φιάλη τοποθετούνται 50 ml διαλύματος TAE και 1 gr αγαρόζης
- Το μίγμα τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα όπου αναδεύεται με προσθήκη θέρμανσης, μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές.
- Αφού αφηθεί το διάλυμα για λίγο σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί προσθήκη 1 ml βρωμιούχου αιθιδίου.
- Το διάλυμα αναδεύεται και τοποθετείται στη συσκευή δημιουργίας της πηκτής.
- Το διάλυμα αφήνεται στη συσκευή μέχρι να στερεοποιηθεί (περίπου 30 min).

2.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

Για τη παρασκευή 75 ml διαλύματος πολυακρυλαμίδης 8% ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία:

- Σε 20 ml H₂O διπλής απόσταξης (dd) γίνεται προσθήκη:
 - ✓ 31,5 gr ουρίας
 - ✓ 3,75 ml διάλυμα TBE 20X
 - ✓ 5,78 gr Ακρυλαμίδης
 - ✓ 0,2 gr Bis-Acrylamide
- Με τη βοήθεια θέρμανσης το παραπάνω μίγμα αναδεύεται ώσπου να ομοιογενοποιηθεί και να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια το διάλυμα συμπληρώνεται μέχρι τα 75 ml με H₂O dd.

*** Αμέσως πριν από τη χρήση, προσθέτουμε στο διάλυμα:

- (1) 37,5 μl TEMED
- (2) 200 μl Ammonium Persulfate (APS) 20%

Τα παραπάνω διαλύματα επιτρέπουν τον πολυμερισμό της ακρυλαμίδης. Οπότε μετά την προσθήκη τους γίνεται μια σύντομη ανάδευση του μίγματος και ακολουθεί γρήγορη τοποθέτηση του διαλύματος στη συσκευή δημιουργίας της πηκτής.

Ο χρόνος σε αυτό το στάδιο είναι πολύ κρίσιμος. Αν υπάρξει καθυστέρηση στη τοποθέτηση του διαλύματος υπάρχει κίνδυνος η πηκτή να στερεοποιηθεί εκτός συσκευής και να χρειαστεί το διάλυμα να παρασκευαστεί εκ νέου.

2.3 Διάλυμα TBE 20X

Το διάλυμα TBE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη προετοιμασία πηκτής και ηλεκτροφόρησης πολυακρυλαμίδης.

Σε φιάλη του ενός λίτρου γίνεται προσθήκη:

121 gr Tris – Base (Merck/1.08382.0500)

61,7 gr Boric Acid (Βορικό οξύ)

80 ml EDTA 0,5 M pH 8

Προσθέτουμε ύδωρ μέχρι να συμπληρωθεί το 1 λίτρο

Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου

2.4 Διάλυμα TAE 50X

Το TAE είναι ένα ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιείται για τη προετοιμασία πηκτής και ηλεκτροφόρηση αγαρόζης.

Σε φιάλη του ενός λίτρου γίνεται προσθήκη:

242 gr Tris - Base(Merck/1.08382.0500)

57 gr Acetic Acid (Sigma/E - 7889)

100 ml EDTA

2.5 Διάλυμα EDTA 0.5 M (pH: 8)

- Σε 800 ml ύδατος γίνεται προσθήκη 186,1 gr EDTA και το διάλυμα τοποθετείται σε μαγνητικό αναδευτήρα.
- Κατά τη διάρκεια της ανάδευσης γίνεται ταυτόχρονη προσθήκη NaOH και μετράται συνεχώς το pH του διαλύματος μέχρι να φτάσει τη τιμή 8. Η ποσότητα του NaOH ποικίλει αλλά συνήθως ξεπερνάει τα 20 gr.
- Το EDTA δεν διαλύεται αν το pH δεν φτάσει τη τιμή 8.
- Εάν απαιτείται, μετά τη διάλυση το pH μπορεί να ρυθμιστεί σε άλλη τιμή.
- Το διάλυμα αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο και φυλάσσεται σε θερμοκρασία δωματίου.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000085730