



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**

**ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΦΥΣΙΚΩΝ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ
ΔΑΚΟΥ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ, *Bactrocera oleae*, ΑΠΟ ΤΟ ΙΡΑΝ ΜΕ
ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΙΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ.**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΙΣΤΙΝΑ

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΜΑΤΘΙΟΠΟΥΛΟΣ
ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

ΛΑΡΙΣΑ 2013

Γενετική ανάλυση φυσικών πληθυσμών δάκου της ελιάς, *Bactrocera oleae*, από το Ιράν με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών.

Genetic analysis of olive fly, *Bactrocera oleae*, populations in Iran using microsatellite markers.

Τριμελής εξεταστική επιτροπή

Μαθιόπουλος Κωνσταντίνος

**Καθηγητής
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Σαραφίδου Θεολογία

**Λέκτορας
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Τσουμάνη Κωνσταντίνα

**Πανεπιστημιακή υπότροφος
ανάθεσης διδακτικού έργου.
Τμήμα Βιοχημείας και
Βιοτεχνολογίας
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας**

Ευχαριστίες

Με το πέρας της πτυχιακής αυτής εργασίας θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτον από όλους τον καθηγητή μου, και επιβλέποντα της πτυχιακής μου κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο για την ανάθεση του θέματος της εργασίας μου, καθώς επίσης και για την συνεχή καθοδήγηση και την μεγάλη βοήθεια που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια της.

Ακόμα ευχαριστώ τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, την λέκτορα Σεραφείδου Θεολογία και την διδάσκουσα ΠΔ407/80 Τσουμάνη Κωνσταντίνα για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την διόρθωση και βελτιστοποίηση της έντυπης εικόνας της πτυχιακής μου εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδάκτορικό ερευνητή του Πανεπιστημίου Δυτικής Ελλάδας, κ. Αυγουστίνο Αντώνιο, για το ενδιαφέρον του, την καθοδήγηση του και τις απλόχερες γνώσεις που μου προσέφερε για την καλύτερη κατανόηση και διεκπεραίωση της εργασίας αυτής. Απαραίτητο θεωρώ, να ευχαριστήσω την κα. Γρηγορίου Μαρία-Ελένη, υποψήφια διδάκτορα του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας για την απεριόριστη στήριξη (τόσο στο εργαστηριακό τμήμα της πτυχιακής αυτής εργασίας, όσο και στην συγγραφή της) και για τις πολύτιμες συμβουλές της. Μαριλενάκι μου σε ευχαριστώ για όλα!

Δεν μπορώ να παραλείψω τους φίλους μου και την οικογένεια μου για την βοήθεια που μου έδωσαν σε κάθε δύσκολη στιγμή της φοιτητικής μου σταδιοδρομίας. Τέλος την παρούσα εργασία, την αφιερώνω με όλη μου την καρδιά σε δύο ξεχωριστά άτομα που αν και δεν είναι πια μαζί μου, οι συμβουλές και η αγάπη τους πάντα θα οδηγούν τα βήματά μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρουσία της ελιάς στο Ιράν χρονολογείται από αρχαιοτάτων χρόνων, καθώς αρχαίοι θρησκευτικοί ύμνοι την εξυμνούν εδώ και τρεις χιλιάδες χρόνια. Σήμερα, με περισσότερα από 100 000 εκτάρια καλλιεργήσιμης ελιάς, το Ιράν θεωρείται μια από τις αναπτυσσόμενες ελαιοπαραγωγικές χώρες στον κόσμο. Το κυριότερο παράσιτο των καλλιεργούμενων ελιών αποτελεί ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, και η εξάπλωσή του ακολουθεί στενά την έκταση της καλλιέργειας της ελιάς. Ενώ η παρουσία της ελιάς στο Ιράν αρχίζει από τόσο παλιά, οι πρώτες αναφορές για την εμφάνιση του δάκου στη χώρα έγιναν σχετικά πρόσφατα, τον Ιούλιο του 2004. Για να διερευνηθεί αν αυτό οφείλεται σε ραγδαία αύξηση ενός ήδη υπάρχοντος πληθυσμού ή αν αποτελεί φαινόμενο εισβολής του δάκου από άλλες περιοχές συλλέχθηκαν άτομα *B. oleae* από τέσσερις διαφορετικές περιοχές του Ιράν και αναλύθηκαν με βάση τους πολυμορφισμούς οχτώ διαφορετικών μικροδορυφορικών δεικτών. Οι δείκτες αυτοί έχουν ήδη χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση ενδημικών πληθυσμών δάκου γύρω από τη Μεσογειακή λεκάνη, αλλά και για τη μελέτη της εισβολής του εντόμου στην Καλιφόρνια. Τέτοιες αναλύσεις μπορούν να συνεισφέρουν ουσιαστικά στον επιτυχή σχεδιασμό στρατηγικών ελέγχου με σκοπό την αποφυγή μελλοντικών εισβολών, καθώς λεπτομερή γνώση της βιολογίας, της γεωγραφικής δομής και της γεωγραφικής ποικιλότητας ενός είδους, είναι στοιχεία απαραίτητα για την ορθή και αποτελεσματική εφαρμογή τους.

ABSTRACT

The early history of the olive tree in Iran is shrouded in uncertainty but the olive is mentioned in ancient Iranian religious hymns dating back to three thousand years ago. Today Iran has more than 100,000 hectares of olive crop area and it is one of the world's olive growing countries. The major insect pest of the olive fruit is *Bactrocera oleae* and its expansion is exclusively restricted to the cultivation zone of the olive tree. Although olive tree has a long history in Iran, olive fly was identified for the first time in alarming numbers just recently, in July 2004. Therefore, it is very important to analyze whether it regards a new invasion or an increase of a pre-existing population. For this reason field-collected flies from four different provinces were analyzed on the basis of microsatellite polymorphisms in eight different loci. These markers were previously used for the analysis of endemic olive fly populations around the Mediterranean basin and the analysis of the invasion of *B. oleae* in California. We chose to focus on microsatellite markers due to their higher analytic capacity, as compared to other available molecular markers. Such analyses can contribute to better planning of control strategies to avoid future infestations, as a detailed knowledge of the biology, genetic structure and geographical variability of a given species is a prerequisite to establishing control measures such as quarantine, phytosanitary control and eradication.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

1.	Εισαγωγή	6
1.1.	Ο δάκος της ελιάς	6
1.1.1.	Περιγραφή του εντόμου.	6
1.1.2.	Ο κύκλος ζωής του εντόμου.	7
1.1.3.	Δάκος και ελαιόδεντρο – Ιστορική αναδρομή στην καλλιέργεια της ελιάς στο Ιράν.	8
1.1.4.	Συνέπειες της προσβολής του δάκου στην ελαιοπαραγωγή.	11
1.2.	Πληθυσμιακή ανάλυση.	11
1.2.1.	Βιολογική εισβολή.	11
1.2.2.	Γενετική ανάλυση φυσικών πληθυσμών	12
1.2.3.	Εργαλεία γενετικής και πληθυσμιακής ανάλυσης.	12
1.3.	Μικροδορυφόροι.	16
1.3.1.	Οι μικροδορυφόροι ως εργαλεία φυλογενετικών αναλύσεων φυσικών πληθυσμών.	17
1.3.2.	Χρήση μικροδορυφορικών δεικτών σε φυλογενετικές αναλύσεις φυσικών πληθυσμών δάκου.	18
1.4.	Σκοπός	19
2.	Υλικά και Μέθοδοι.	20
2.1.	Πληθυσμοί εντόμων.	20
2.2.	Μικροδορυφορικοί δείκτες.	20
2.3.	Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.	21
2.4.	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης.	22
2.5.	Ηλεκτροφόρηση.	23
2.6.	Ανάλυση τμημάτων ενίσχυσης.	24
2.7.	Χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής - Επεξεργασία αποτελεσμάτων αλληλούχισης.	24
3.	Αποτελέσματα.	26
3.1.	Απομόνωση DNA και ενίσχυση μικροδορυφορικών δεικτών.	26
3.2.	Ανάλυση μεγέθους PCR προϊόντων μέσω του προγράμματος PeakScanner	26
3.3.	Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τα προγράμματα Popgene 1.31, GeneAlex 6.5, Structure.	28
4	Συζήτηση.	31
5	Παραρτήματα.	33
6	Βιβλιογραφία.	41

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Ο δάκος της ελιάς.

1.1.1 Περιγραφή του εντόμου.

Ο δάκος της ελιάς (επιστημονική ονομασία *Bactrocera oleae*) είναι ένα ολομετάβολο έντομο που ανήκει στην οικογένεια *Tephritidae*. Η οικογένεια *Tephritidae* περιλαμβάνει είδη μεγάλης οικονομικής σημασίας, πολλά από τα οποία αποτελούν κάποια από τα κυριότερα γεωργικά παράσιτα. Το είδος *B. oleae* αποτελεί το κυριότερο παράσιτο του ελαιόκαρπου (Εικόνα 1).



Εικόνα 1 Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*)

Η συστηματική κατάταξη του *Bactrocera oleae* δίνεται στον παρακάτω πίνακα:

Ομοταξία:	Έντομα
Τάξη:	Diptera
Οικογένεια:	Tephritidae
Υποοικογένεια:	Dacinae
Φυλή:	Dacini
Γένος:	Bactrocera
Είδος:	<i>Bactrocera oleae</i>

Πίνακας 1:Συστηματική κατάταξη του εντόμου *Bactrocera oleae*.

Ο δάκος είναι ο σημαντικότερος εχθρός του ελαιόκαρπου αφού, με την απόθεση των αυγών του στον καρπό της ελιάς, προκαλεί μείωση της συγκομιδής κατά 30% υποβαθμίζοντας τόσο την ποιότητα και τη γεύση του επιτραπέζιου ελαίου όσο και την ποιότητα και ποσότητα των επιτραπέζιων ελιών (Mazomenos, 1989).

Η εξάπλωση του δάκου της ελιάς είναι κατά άρρηκτο τρόπο συνδεδεμένη με τις περιοχές καλλιέργειας της ελιάς και για αυτό απαντάται σε όλες τις μεσογειακές χώρες. Πράγματι η προνύμφη το εντόμου τρέφεται αποκλειστικά (μονοφάγο έντομο) από τον ελαιόκαρπο της καλλιεργούμενης ελιάς (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*) και της άγριας ελιάς (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*). Ανατολικά η εξάπλωση της ελιάς εκτείνεται ως την Ινδία και δυτικά ως τις Κανάριες νήσους. Τα τελευταία χρόνια η καλλιέργεια της ελιάς έχει παρατηρηθεί και σε άλλες περιοχές, όπως στη Βόρεια και Κεντρική Αμερική (Καλιφόρνια, Αριζόνα, Μεξικό και Ελ Σαλβαδόρ), στη Νότια Αμερική (Αργεντινή, Χιλή, Περού, Ουρουγουάη), στην κεντρική Ασία (Κίνα) και την Αυστραλία. Ο δάκος της ελιάς έχει εισβάλλει σε όλες αυτές τις περιοχές πλην της Αυστραλίας.

1.1.2 Ο κύκλος ζωής του εντόμου

Με την άνοδο της θερμοκρασίας (τέλος Απριλίου με αρχές Μαΐου), δραστηριοποιείται η 1η γενεά του εντόμου, δηλαδή παρατηρείται μια σταδιακή εκκόλαψη των ακμαίων του δάκου. Τα ακμαία αυτά, τρεφόμενα από μελιτώδη εκκρίματα των δένδρων, διατηρούνται στη ζωή για αρκετό χρονικό διάστημα (μέχρι 2 μήνες) και είναι δυνατόν, αν βρουν κατάλληλες συνθήκες, να ωαποθέσουν.

Την άνοιξη (αρχές έως μέσα Ιουλίου) εμφανίζεται η 2η γενεά του δάκου. Τα θηλυκά ωοτοκούν σε νέους πράσινους καρπούς (Εικόνα 2). Το θηλυκό γεννά περίπου 12 αυγά την ημέρα (με τον ισχυρό ωσθέτη του, κατευθείαν στη σάρκα του καρπού). Αν ο καρπός δεν είναι δεκτικός, τότε η εξέλιξη του εντόμου ανακόπτεται. Οι εκκολαπτόμενες προνύμφες τρέφονται από την ανώριμη σάρκα, ανοίγοντας ακανόνιστες, επιμήκεις στοές σε βάθος μέσα στο καρπό (Εικόνα 3). Όταν η προνύμφη ολοκληρώσει την ανάπτυξή της, μετακινείται προς την επιφάνεια του καρπού, όπου διευρύνει τη στοά και προετοιμάζει την έξοδό της ως τέλειο έντομο ανοίγοντας χαρακτηριστική οπή, την οπή εξόδου. Στη συνέχεια νυμφώνεται και μετά από λίγες ημέρες εξέρχεται ως τέλειο έντομο από την οπή εξόδου.



Εικόνα 2 Στίγματα που δημιουργεί ο ωαποθέτης στον καρπό της ελιάς. Οι προσβεβλημένοι καρποί φέρουν μικρές τριγωνικές κηλίδες που δεν φαίνονται με την πρώτη ματιά



Εικόνα 3 Διαδρομές που σχηματίζει η προνύμφη τρεφόμενη από τον καρπό

Στο νύγμα του δάκου αναπτύσσονται παθογόνοι οργανισμοί (π.χ. *Macrophoma dalmatica*), που προκαλούν σήψη και πτώση του καρπού (Εικόνα 4).



Εικόνα 4 Καταστροφή της ποιότητας του καρπού από τη προνύμφη και επακόλουθες μολύνσεις.

Τον Αύγουστο και τον Σεπτέμβριο εμφανίζεται η 3η και 4η γενεά αντίστοιχα. Με όψιμο καλοκαίρι μπορεί να ακολουθήσει και 5η γενεά (φθινοπωρινή). Στις φθινοπωρινές προσβολές, όταν ο καρπός έχει αυξηθεί σε μέγεθος και ο πληθυσμός του εντόμου είναι μεγάλος, παρατηρούνται στον ίδιο καρπό περισσότερα από ένα νύγματα. Οι προνύμφες των φθινοπωρινών γενεών εξέρχονται από τους καρπούς και νυμφώνονται στο έδαφος. Το χειμώνα ο δάκος βρίσκεται ως νύμφη στο έδαφος ή ως προνύμφη σε προσβεβλημένο καρπό επάνω στο δένδρο. Οι επικρατούσες καιρικές συνθήκες επηρεάζουν σημαντικά τη διάρκεια ανάπτυξης του δάκου στον καρπό. Το καλοκαίρι για παράδειγμα, χρειάζονται 5-7 ημέρες για την εκκόλαψη του ωού, 12-15 ημέρες για τα προνυμφικά στάδια και 7-10 ημέρες για την νύμφη μέχρι την εμφάνιση του τέλειου εντόμου (Αυγουστίνος Α., Διδακτορική διατριβή, 2005).

1.1.3 Δάκος και ελαιόδεντρο-Ιστορική αναδρομή στην καλλιέργεια της ελιάς στο Ιράν (Διαδικτυακή πηγή 2¹).

Προέλευση δάκου: Η γεωγραφική κατανομή πολλών συγγενικών ειδών του γένους *Bactrocera* στην περιοχή της Ινδίας αποτελεί σοβαρή ένδειξη ότι το σημείο όπου διασταυρώνονται γεωγραφικά η Μέση Ανατολή με τη νότια και κεντρική Ασία αποτελεί πιθανότατα την περιοχή προέλευσης του είδους (σημείο όπου πρωτοεμφανίστηκε το συγκεκριμένο έντομο) (Goulielmos et al., 2003). Παρόλο που κάθε προσπάθεια εντοπισμού του γεωγραφικού κέντρου εξάπλωσης ενός είδους είναι δύσκολη, μελέτη του Nardi και των συνεργατών του που δημοσιεύθηκε το 2005 ενισχύει την προαναφερθείσα άποψη, αφού περιγράφει τους Πακιστανικούς πληθυσμούς ως τους πλέον γενετικά διαφοροποιημένους σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους που αναλύονται σταδιακά ανά τον κόσμο.

Το ελαιόδεντρο διαδραματίζει σημαντικότερο ρόλο στην ζωή των ανθρώπων, κυρίως της Μεσογείου. Επηρεάζει, πέρα από τις διατροφικές τους συνήθειες, την οικονομία του εκάστοτε κράτους, καθώς και την κοινωνικοπολιτική ζωή και καθημερινότητα του. Η χρήση των προϊόντων του καρπού της ελιάς μόνο μονόπλευρη δεν μπορεί να χαρακτηριστεί καθώς χρησιμοποιείται και διατίθεται ποικιλοτρόπως στις διαφορετικές μορφές της οικονομίας μιας χώρας (στη διατροφή, ως καύσιμο για κεριά, ως φαρμακευτικό σκεύασμα και αρωματικό, και για το μαγείρεμα).

Η καλλιέργεια της ελιάς ξεκίνησε πριν από 6.000 χρόνια στη μεσογειακή ακτή της Συρίας και της Παλαιστίνης. Πρόσφατες μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η μετατόπιση των επικρατών ποικιλιών προέκυψε από την Ανατολή στη Δύση. Ωστόσο το γεγονός αυτό δεν απέκλεισε μια πρωτότυπη προσπάθεια παραγωγής στις δυτικές χώρες.

Η ελιά στο Ιράν καλλιεργούταν από το 3000 π.Χ. Κατά το 10ο και τον 11ο αιώνα, τα ελαιόδεντρα καλλιεργούνταν στις περιοχές: Nišāpur, Gorgan, Deylam, Rāmhormuz, Arrajān και Φαρς. Αυτή η κατανομή της καλλιέργειας της ελιάς πιθανώς αντανάκλα την

¹ Στο συγκεκριμένο διαδικτυακό άρθρο γίνεται μια ανασκόπηση παλαιότερων βιβλιογραφικών στοιχείων περί του θέματος που αναλύεται στο συγκεκριμένο υποκεφάλαιο.

κατάσταση που υπήρχε στην προ-ισλαμική Περσία. Οι ελιές τρώγονταν ως καρπός, τουλάχιστον στην περιοχή της Κασπίας. Κατά την περίοδο των Σαφαβιδών, η καλλιέργεια της ελιάς αυξήθηκε στα σύνορα της Αραβίας, και του Māzandarān, κοντά στην Κασπία Θάλασσα. Γύρω στο 1740, είχαν επίσης αρχίσει να φύονται κοντά στο Ardabil. Θεωρείται ότι στους Ευρωπαίους δεν άρεσε πολύ το περσικό είδος Safavid, γιατί όταν προσφέρονταν προς πώληση ήταν γεμάτο άμμο και σάπιους καρπούς. Αυτό οφείλεται πιθανώς στο γεγονός ότι οι ελιές και το λάδι χρησιμοποιούνταν σπάνια στο Ιράν εκείνη την εποχή. Στη Γεωργία και την Αρμενία το λάδι ελιάς ήταν πάρα πολύ ακριβό.

Τον 19^ο αιώνα τα ελαιόδενδρα στο Ιράν κυρίως καλλιεργούνταν στις επαρχίες της Κασπίας, παρόλο που είχαν επίσης ξεκινήσει να καλλιεργούνται ή να φύονται άγρια σε άλλα μέρη της Περσίας. Το 1817, η Φρειδερίκη von Freygang παρατήρησε ότι η αγριελιά εξαπλώθηκε από τις ακτές της Κασπίας στο ποτάμι Τέρεκ. Οι Αρμένιοι και οι Τάρταροι έτρωγαν τον καρπό αυτού του δέντρου, και εξήγαγαν το χυμό από αυτό που το ονόμαζαν Tolkan. Το δέντρο εντοπίζεται και στο νότο. Το 1840, ο Baron de Bode παρατήρησε ότι στις όχθες του ποταμού Hendiān, κοντά στο Behbahān, καθώς και κοντά στην πόλη της Zaytun υπήρχαν ελαιόδεντρα. Η ελιά ήταν επίσης γνωστή στο Μπαλουχιστάν, όπου συχνά καλλιεργούνταν γύρω από ιερά. Υπήρξαν επίσης κάποια καλύτερα είδη ελιάς κοντά Bušehr και Κερμάν (Fayzābād) και Tarom (Zanjan).

Ωστόσο, τα ελαιόδεντρα ήταν κυρίως συγκεντρωμένα κατά τη διαδρομή από την περιοχή Rast-Manjil ως την περιοχή Rudbār-Sefidrud (στη συμβολή του Šāhrud και του Qezel-Uzen, ως τα σύνορά τους, από Manjil μέχρι Rahmatābād), όπου βρέθηκαν ολόκληρα δάση ελιάς. Στην Rudbār μόνο, στη δεκαετία του 1840, υπήρχαν 150.000 ελαιόδεντρα, ενώ ο Churchill υπολόγισε το συνολικό αριθμό των δένδρων σε 130.000 το 1896. Τόνισε, επίσης, ότι ελιές καλλιεργούνται στην περιοχή της Genjeh, πιο κοντά Resht, και Taroum προς το νότο. Στη δεξιά όχθη του Sefid τα κύρια χωριά είναι Kilishter, Viaieh Rezehgah, Geldian, Harzevil και Mengil, καθώς και περίπου ακόμη 20 λιγότερο σημαντικά χωριά.

Κατά τη διάρκεια του 19ου αιώνα, τρεις ποικιλίες ελαιόδεντρων καλλιεργούνταν: η zaytune zard, η οποία παράγει μόνο βρώσιμες επιτραπέζιες ελιές, και άλλα δύο που καλλιεργούνταν μόνο για την παραγωγή λαδιού. Αυτή η προτίμηση για μη βρώσιμες ελιές έχει να κάνει με το γεγονός ότι οι Πέρσες δεν χρησιμοποιούσαν το ελαιόλαδο και δεν ήξεραν πώς να το προετοιμάσουν σωστά. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιήθηκε μόνο για την παραγωγή ενός λιπαρού σαπουνιού και για φωτιστικό λάδι. Μέρος των καρπών αλατίζονταν και διατηρούνταν σε ξύδι από τους Αρμένιους με σκοπό την εξαγωγή τους στον Καύκασο. Σύμφωνα με τον Bohler, το ελαιόλαδο ήταν τόσο βρώμικο που μπορούσε να χρησιμοποιηθεί μόνο ως καύσιμο φωτισμού.

Στη δεκαετία του 1890, περίπου 43 χωριά στην περιοχή Rudbār, μεταξύ Rostamābād, Manjil, Tarom και Rahmatābād, συμμετείχαν στην καλλιέργεια της ελιάς. Τα ελαιόδεντρα δεν καλλιεργούνταν άριστα με αποτέλεσμα να είχαν χαμηλή ετήσια απόδοση (£ 6.000.000). Η αγορά και η διύλιση όλων των ελιών στο βόρειο Ιράν, από το Μάιο του 1890 και για περίοδο 25 ετών παραχωρήθηκε στους Κούση και Θεοφίλακτο, Έλληνες επιχειρηματίες οι οποίοι ήταν επίσης ενεργοί στη βιομηχανία ξυλείας. Έχτισαν ένα εργοστάσιο στο Rudbār το 1895 και αφού πρώτα έκαναν έρευνα στην Ευρώπη σχετικά με την ελαιοτρίβηση και τη διύλιση για την παραγωγή ελαιόλαδου, αποφάσισαν να χρησιμοποιήσουν τη Μασσαλία ως τόπο ελαιοτρίβισης, αν και το μεγαλύτερο μέρος των μηχανημάτων προήλθε από τη Μεγάλη Βρετανία.

Στο πρώτο μισό του 20ού αιώνα, οι ελιές συνέχισαν να είναι ένα προϊόν οριακής γεωργικής και οικονομικής σημασίας. Η παραγωγή τους δεν αναφέρθηκε καν σε βιβλία που ασχολούνται με τον αγροτικό τομέα του Ιράν. Συνέχισαν να καλλιεργούνται αποκλειστικά στην Manjil και Rudbār (συνοικίες της Elburz) με μέση παραγωγή 2.500 τόνους περίπου το 1940. Κατά το δεύτερο ήμισυ του 20ού αιώνα, οι ελιές και το λάδι τους έγιναν αποδεκτά από τους Ιρανούς καταναλωτές ως βρώσιμα φρούτα και ως φυτικό έλαιο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στο μαγείρεμα και ως εκ τούτου η καλλιέργειά τους έλαβε μεγαλύτερη εμπορική προσοχή. Παρά το γεγονός ότι κατά τη διάρκεια των τελευταίων 20 ετών στην παραγωγή το μερίδιο του Ιράν έχει σχεδόν διπλασιαστεί, το Ιράν παράγει κάτι περισσότερο από 0,2% της παγκόσμιας παραγωγής.

Παρά τις αρχαίες ρίζες της, η παραγωγή της ελιάς στο Ιράν παραμένει περιθωριακή υπόθεση. Αντίθετα οι μεσογειακές χώρες αντιπροσωπεύουν περίπου το 95% της ελαιοκαλλιέργειας παγκοσμίως (8.702.000 εκτάρια). Σε παγκόσμιο επίπεδο, το Ιράν κατατάσσεται μόνο ως 17η παραγωγός το 2003. Η αυξανόμενη σημασία της ελιάς στην κουζίνα του Ιράν τονίζεται επίσης από το γεγονός ότι η παραγωγή της ελιάς η οποία για περισσότερα από 800 χρόνια παρέμεινε περιορισμένη στην περιοχή Rudbār-Manjil στο Gilan, τώρα γίνεται και σε άλλες περιοχές του Ιράν. Αυτό που είναι ενδιαφέρον εδώ είναι ότι σήμερα η Qazvin έχει γίνει ο μεγαλύτερος παραγωγός της ελιάς έναντι της επαρχίας Guilan.



Εικόνα 5 Με κόκκινη ένδειξη σημειώνονται οι τοποθεσίες απ' όπου προέρχονται τα δείγματα του εντόμου από το Ιράν, τα οποία αναλύθηκαν στην παρούσα εργασία. Με πράσινο χρώμα υποδεικνύονται οι σημαντικότερες τοποθεσίες που αναφέρονται στην παραπάνω ιστορική αναδρομή της ελαιοκαλλιέργειας στο Ιράν.

Παρά το γεγονός ότι το Ιράν έχει 90 γνωστές ποικιλίες ελιάς, μόνο τρία είδη εξακολουθούν να καλλιεργούνται για εμπορική χρήση.

(1) Από ανοιχτόχρωμα φρούτα, τα οποία αντιπροσωπεύουν το 60% της παραγωγής, παράγεται το ελαιόλαδο (zaytunerowgani). Τα φρούτα αυτά, έχουν μια περιεκτικότητα σε λάδι που κυμαίνεται από 18 έως 23%.

(2) Οι κίτρινες ελιές (Zaytun-ezard), τα οποία είναι μικρότερα φρούτα και αντιπροσωπεύουν περίπου το 30% της καλλιέργειας.

(3) Η ελιά φίδι (Zaytun-eMari), η οποία ονομάζεται έτσι επειδή ο καρπός “τραβιέται προς τα έξω” (drawnout) και είναι λεπτός. Έχει μικρότερη σάρκα από τις άλλες ελιές και χρησιμοποιείται ως ένα επιτραπέζιο φρούτο, λόγω της ειδικής γεύσης του. Η

καλλιέργειά του αντιπροσωπεύει περίπου το 7% του συνόλου. Αυτές οι τρεις ελιές διαθέτουν διαφορετικές ποικιλίες, όπως της γρήγορης (zud-ras) και της αργής καλλιέργειας (dir-ras).

1.1.4 Συνέπειες της προσβολής του δάκου στην ελαιοπαραγωγή.

Η προσβολή του ελαιόκαρπου από το δάκο έχει άμεσες επιπτώσεις όχι μόνο στον όγκο αλλά και στην ποιότητα της γεωργικής παραγωγής. Οι απώλειες της παγκόσμιας ελαιοπαραγωγής στη διάρκεια κάθε καλλιεργητικής περιόδου τοποθετούνται μεταξύ 5 και 30%, ανάλογα πάντα με τις κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν κάθε φορά (Mazomenos, 1989; Katsoyannos, 1992).

Η ζημιά που προκαλεί ο δάκος στην ελαιοκομία μπορεί να συνοψισθεί στα εξής:

- α) πτώση του καρπού πριν από την περίοδο της συγκομιδής
- β) μείωση απόδοσης των καρπών λόγω της κατανάλωσης του εσωτερικού τους από τις προνύμφες που τρέφονται από αυτούς
- γ) μειωμένη ποιότητα του ελαιολάδου, λόγω αυξημένης οξύτητας, η οποία προκύπτει επειδή οι οπές που ανοίγει ο ωοαποθέτης του θηλυκού εντόμου λειτουργούν ως σημεία εισόδου για παθογόνους μύκητες και
- δ) οι οπές αυτές οδηγούν στην άμεση απόρριψη των προσβεβλημένων καρπών από την αγορά των επιτραπέζιων βρώσιμων ελιών (Economopoulos, 1979, Prota, 1979).

1.1 Πληθυσμιακή ανάλυση.

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

1.2.1 Βιολογική εισβολή

Για τον όρο «βιολογική εισβολή» έχουν αποδοθεί διάφοροι ορισμοί και ερμηνείες. Γενικά, με τον όρο αυτό χαρακτηρίζεται κάθε διαδικασία αποίκισης και εγκατάστασης ξενικών ειδών που διαδραματίζουν έναν ευδιάκριτο ρόλο στα αποικισθέντα οικοσυστήματα. Μέσα σ' ένα πεδίο σκληρού και έντονου ανταγωνισμού το οποίο καθορίζει τη δυνατότητα επιβίωσης των οργανισμών, τα είδη που εισάγονται σε νέα ενδιαιτήματα πρέπει να έχουν ιδιαίτερα γνωρίσματα ή και συνδυασμούς τέτοιων γνωρισμάτων που θα τους επιτρέψουν να ανταγωνιστούν επιτυχώς τα προϋπάρχοντα είδη. Αυτά τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα σχετίζονται με την ικανότητα της γρήγορης ανάπτυξής του, την υψηλή αναπαραγωγική του επιτυχία, την ικανότητα γρήγορης γεωγραφικής διασποράς του, τη φαινοτυπική μεταβλητότητα που του δίνει τη δυνατότητα προσαρμογής στις καινούργιες συνθήκες του νέου ενδιαιτήματος, την ικανότητα αντοχής του σε ένα εύρος περιβαλλοντικών συνθηκών, την ικανότητά του να εκπληρώνει τις διατροφικές του ανάγκες αξιοποιώντας καινούργιους ξενιστές, την ικανότητα αποτελεσματικής θήρευσης στο νέο οικοσύστημα και την ένταξη στο πληθυσμό πιθανών προηγούμενων επιτυχημένων βιολογικών εισβολών (Ewell et al., 1999; Pimentel et al., 2000). Γενικότερα, ένα είδος που εισάγεται σε ένα νέο οικοσύστημα θα πρέπει αρχικά να επιβιώσει έχοντας μικρή πληθυσμιακή πυκνότητα, πριν την επιτυχή εγκατάσταση του στη νέα περιοχή (Tilman, 2004). Όμως, σε χαμηλές πληθυσμιακές πυκνότητες καθίσταται αρκετά δύσκολη η επιτυχής αναπαραγωγή και η διατήρηση του εισβάλλοντος είδους στο νέο περιβάλλον. Έτσι, ένα εξωτικό είδος μπορεί να χρειαστεί να εισαχθεί περισσότερες από μία φορές σε μία περιοχή, πριν την οριστική εγκαθίδρυσή του σ' αυτή.

Οι επιπτώσεις των βιολογικών εισβολών διαγράφονται τόσο στο επίπεδο του γονιδιώματος ενός οργανισμού όσο και στην αλλαγή του οικοσυστήματος που εισέρχονται. Τα εισαγόμενα είδη υφίστανται μία ισχυρή μείωση της γενετικής τους

ποικιλότητας. Οι μηχανισμοί που τη μειώνουν αφορούν το φαινόμενο ιδρυτή και το φαινόμενο της γενετικής στενωπού που λαμβάνουν χώρα (Nei et al., 1975). Όταν τα είδη εισάγονται σε ένα νέο οικοσύστημα, τότε συνήθως μόνο ένα μικρό τμήμα του πληθυσμού φθάνει στη νέα περιοχή. Έτσι, ο εισβάλλοντας πληθυσμός, λόγω των φαινομένων γενετικής στενωπού, αντιπροσωπεύεται από ένα μικρότερο αριθμό γενοτύπων, κάτι που μειώνει τη γενετική του ποικιλότητα. Επιπρόσθετα, ο μικρός ιδρυτικός πληθυσμός των εισβολέων θα επηρεάζεται έντονα από την τυχαία γενετική παρέκκλιση (Hartl and Clark, 1997). Έτσι, ο συνδυασμός αυτών των δύο φαινομένων οδηγεί τελικά σε δραστική μείωση του επίπεδου της γενετικής ποικιλομορφίας των ξενικών ειδών (Holland, 2000).

1.2.2 Γενετική ανάλυση φυσικών πληθυσμών.

Η προσέγγιση των βιολογικών εισβολών από τη σκοπιά της μοριακής γενετικής αποτελεί ένα ισχυρό και χρήσιμο μέσο διερεύνησης των οικολογικών και εξελικτικών πλευρών τους. Αυτό γίνεται καθ'ότι τόσο η γενετική δομή όσο και το επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης του εισαγόμενου είδους αλλάζουν κατά την εξέλιξη του φαινομένου της εισβολής (Miura, 2007). Έτσι, οι μοριακές τεχνικές είναι δυνατόν:

α) να συνθέσουν το υπόβαθρο της ιστορικής πορείας μιας εισβολής

Μετά την εισβολή ενός είδους σε ένα νέο περιβάλλον είναι δύσκολο, ή και σε μερικές περιπτώσεις ακατόρθωτο, να προσδιοριστεί η περιοχή προέλευσής της και να αποδοθούν με ακρίβεια οι γεωγραφικές ζώνες μέσω των οποίων έλαβε χώρα, εκτός εάν υπάρχουν γι' αυτή διασταυρωμένες και έγκυρες ιστορικές αναφορές. Ωστόσο, τέτοιες ιστορικές αναφορές συνήθως απουσιάζουν λόγω του ότι τα περισσότερα εξωτικά είδη εισάγονται σε νέα οικοσυστήματα με τυχαίο τρόπο (Carlton, 1987; Kowarik, 2003). Η μοριακή γενετική παρέχει χρήσιμα εργαλεία για την εξακρίβωση των ιστορικών γεγονότων που χαρακτηρίζουν μία εισβολή, δεδομένου ότι οι οργανισμοί διαθέτουν την πληροφορία της γενετικής τους καταγωγής στο γονιδίωμά τους. Η περιοχή από την οποία προήλθε ένας πληθυσμός πριν εισβάλει σε κάποιο νέο οικοσύστημα μπορεί να ταυτοποιηθεί με τη γενετική σύγκριση των γενοτύπων (ή απλοτύπων) μεταξύ των ατόμων της περιοχής εισαγωγής και των περιοχών που αυτά ενδημούν.

β) να προσδιορίσουν το επίπεδο γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των ενδημικών και εισαγόμενων πληθυσμών

Τα εισαγόμενα σε ένα νέο περιβάλλον είδη υφίστανται μία ισχυρή μείωση της γενετικής τους ποικιλότητας. Οι μηχανισμοί που τη μειώνουν αφορούν τα φαινόμενα «ιδρυτή» και «γενετικής στενωπού» που λαμβάνουν χώρα κατά τη διάρκεια της εισαγωγής των ειδών (Nei et al., 1975). Όταν τα είδη εισάγονται σε ένα νέο οικοσύστημα, τότε συνήθως μόνο ένα μικρό τμήμα του πληθυσμού φθάνει στη νέα περιοχή.

Αν και τα εισαγόμενα είδη, λοιπόν, υφίστανται γενικά μία απώλεια της γενετικής τους ποικιλομορφίας, διάφοροι μηχανισμοί μπορούν να διατηρήσουν υψηλά τα επίπεδά της. Πράγματι, η εισβολή ενός αρχικά μεγάλου αριθμού ατόμων ή οι αλληπάλληλες εισβολές σε μια περιοχή, από διαφορετικούς πληθυσμούς προέλευσης, είναι δυνατό να διατηρήσουν ένα υψηλό επίπεδο γενετικής ποικιλομορφίας.

1.2.3 Εργαλεία γενετικής και πληθυσμιακής ανάλυσης.

Το γενετικό υλικό μεταφέρεται από τους γονείς στους απογόνους με ένα προβλέψιμο τρόπο και για το λόγο αυτό οι γενετικοί δείκτες μας επιτρέπουν να βγάξουμε συμπεράσματα σχετικά με τις σχέσεις των οργανισμών. Ωστόσο, πολλοί είναι οι παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη στην επιλογή των δεικτών. Σε γενικές γραμμές, όταν διερευνούμε τις σχέσεις μεταξύ στενά συγγενικών οργανισμών πρέπει οι επιλεγόμενοι δείκτες να εμφανίζουν υψηλή ποικιλότητα, ενώ για σχέσεις μεταξύ ατόμων σχετικά απομακρυσμένων απαιτείται ακριβώς το αντίθετο. Παράλληλα

υπάρχουν και πρακτικά θέματα που σχετίζονται με την επιλογή των δεικτών, όπως το χρέμα, ο χρόνος και η επιδεξιότητα των ερευνητών.

Μοριακοί δείκτες:

Οι πολυμορφικοί γενετικοί δείκτες είναι χρήσιμα εργαλεία στις γενετικές και πληθυσμιακές αναλύσεις. Χρησιμοποιούνται ευρέως, καθώς με τη βοήθεια τους μπορεί να υπολογιστεί η γενετική ποικιλότητα ενός πληθυσμού και το μέγεθος της γονιδιακής ροής μεταξύ πληθυσμών.

Τα αλλοένζυμα αποτελούν ένα από τα πρώτα παραδείγματα πρωτεϊνικών δεικτών. και ορίζονται ως μια από τις δύο ή περισσότερες μορφές ενζύμου που κωδικοποιούνται από τον ίδιο τόπο (Day et al., 1974). Οι γονότυποι που προκύπτουν από την ανάλυση των αλλοενζύμων παρέχουν πληροφορίες που σχετίζονται με τη ποσότητα της γενετικής ποικιλότητας μέσα στα άτομα. Εάν ένα άτομο έχει μόνο ένα αλληλόμορφο (μία μορφή ενζύμου) για ένα συγκεκριμένο τόπο τότε θεωρείται ομόζυγο, αν έχει περισσότερα από ένα για τον ίδιο τόπο ονομάζεται ετερόζυγο. Αν τώρα, γονοτυπηθούν αρκετά άτομα, τότε μπορεί να εκτιμηθεί η γενετική ποικιλότητα σε επίπεδο πληθυσμού και να συγκριθούν τα γενετικά προφίλ των διαφορετικών πληθυσμών. Το μειονέκτημα αυτής της κατηγορίας δεικτών είναι ότι η ποικιλότητά τους καθορίζεται αποκλειστικά και μόνο από τις μη-συνώνυμες μεταλλαγές που συμβαίνουν σε επίπεδο DNA και ότι δεν είμαστε σε θέση να γνωρίζουμε τις εξελικτικές σχέσεις δυο αλληλομόρφων (Ashburner, 1991).

Ως μοριακοί δείκτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν και το πυρηνικό και το οργανιδιακό DNA των ευκαρυωτών. Οι ευκαρυωτικοί οργανισμοί περιέχουν δι-γονεϊκά κληρονομήσιμο DNA (πυρηνικό) και μονογονικά κληρονομούμενο DNA (οργανιδιακό DNA). Οι γονιδιακές γενεαλογίες του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA) και του πυρηνικού DNA αντανακλούν διαφορετικές πτυχές της βιολογίας και της ιστορίας των οργανισμών. Το mtDNA έχει μικρότερο ενεργό πληθυσμιακό μέγεθος από το πυρηνικό DNA και έτσι η ποικιλότητά του γίνεται διαγνωστική για τα taxa πιο γρήγορα. Η σύγκριση πυρηνικών και μιτοχονδριακών απλοτύπων συμβάλουν στην αναγνώριση υβριδίων, τυχαίες κατανομές γονότυπων, προτιμήσεις ζευγαρώματος κ.α.

Μονογονικοί δείκτες

Το mtDNA αποτελεί μονογονικό δείκτη αφού η κληρονομικότητά του είναι αποκλειστικά μητρική (Avice et al, 1979). Το ίδιο ισχύει και για μοριακούς δείκτες όπως το Y χρωμόσωμα (πατρική προέλευση) και cpDNA (μητρική προέλευση). Αν και οι μονογονικοί γενετικοί δείκτες είναι εξαιρετικά χρήσιμοι στις μελέτες της Μοριακής Οικολογίας υπάρχουν και κάποια σημαντικά μειονεκτήματα:

1) Κάθε οργανίδιο συμπεριφέρεται σαν μία μονάδα και το γονιδιώμα του σαν ένας γενετικός τόπος. Συνεπώς τα δεδομένα από ένα γενετικό τόπο μας επιτρέπουν να ιχνηλατήσουμε την ιστορία ενός μόνο γενετικού τόπου, που μπορεί να συμφωνεί, αλλά μπορεί και όχι, με την εξελικτική ιστορία του υπό εξέταση είδους (Avice and Ball, 1990). Αυτό είναι ιδιαιτέρως αληθές στα mtDNA, cpDNA και Y χρωμόσωμα, επειδή το μειωμένο ενεργό πληθυσμιακό τους μέγεθος, σε σχέση με το αυτοσωμικό DNA, δείχνει ότι οι απλότυποι τους έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να εξαφανιστούν. Η εξαφάνιση απλοτύπων μπορεί να οδηγήσει τους ερευνητές στην υπεραπλούστευση της πληθυσμιακής ιστορίας ή στην υποεκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας.

2) Οι μονογονικοί γενετικοί δείκτες μπορεί να μην είναι αντιπροσωπευτικοί ολόκληρου του πληθυσμού (π.χ εάν η διασπορά ή μετακίνηση γίνεται μόνο από τα αρσενικά άτομα, ενώ τα θηλυκά παραμένουν στάσιμα, τότε οι απλότυποι του mtDNA θα είναι χαρακτηριστικοί για κάθε πληθυσμό και τα δεδομένα του mtDNA θα μας οδηγήσουν σε λανθασμένα συμπεράσματα σχετικά με τις μετακινήσεις των ατόμων μεταξύ των πληθυσμών).

3) Μιτοχονδριακά ψευδογονίδια ή numts (nuclear copies of mtDNA sequences) που είναι αντίγραφα του mtDNA που μεταφέρονται στο πυρηνικό γονιδίωμα και συνεχίζουν (ως μη λειτουργικά) να εξελίσσονται ανεξάρτητα από το mtDNA (Bensasson et al, 2001). Το πρόβλημα εδώ δημιουργείται κατά την PCR, εάν οι θέσεις πρόσδεσης των εκκινητών έχουν συντηρηθεί και στο ψευδογονίδιο, με αποτέλεσμα κατά την PCR να πολλαπλασιαστεί και αυτό ή μόνο αυτό το γονίδιο, αντί του επιθυμητού μιτοχονδριακού γονιδίου. Αν και δεν κατανέμονται εξίσου στις διάφορες ταξινομικές βαθμίδες, numts έχουν βρεθεί σε περισσότερα από 80 είδη ευκαρυωτικών οργανισμών, συμπεριλαμβανομένων μυκήτων, φυτών, ασπόνδυλων και σπονδυλωτών (Wallace et al, 1997).

Πολυγονικοί δείκτες

RFLP

Η μέθοδος του πολυμορφισμού του μήκους των θραυσμάτων DNA μετά από πέψη με περιοριστικά ένζυμα (restriction fragment length polymorphism, RFLP) αναφέρεται στην ποικιλομορφία που παρατηρείται σε ομόλογες αλληλουχίες DNA και εντοπίζεται με την παρουσία διαφορετικών μηκών τμημάτων DNA μετά την πέψη του με περιοριστικά ένζυμα (Saiki et al, 1985). Τα ένζυμα περιορισμού (ή ενδονουκλεάσες) «κόβουν» το DNA στα σημεία που συναντούν ειδικές αλληλουχίες μήκους 5-6 βάσεων, που είναι γνωστές ως θέσεις περιορισμού. Αυτά τα ένζυμα συναντώνται στα βακτήρια και ο ρόλος τους έγκειται στην προστασία αυτών από τους ιούς. Υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία ενζύμων περιορισμού, όπως το ένζυμο EcoRI που κόβει όταν συναντά την αλληλουχία GAATTC παράγοντας ατελή άκρα.

Ριβοσωμικό RNA (rRNA)

Το rRNA αντιπροσωπεύει > 80% του συνολικού RNA που υπάρχει στο κύτταρο. Το 45% του rRNA βρίσκεται στη μικρή ριβοσωμική υπομονάδα ενώ στη μεγάλη βρίσκεται το 55% rRNA. Η αλληλουχία βάσεων ενός δεδομένου τύπου rRNA είναι παρόμοια σε στενά συγγενικά είδη, γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται και ως μοριακοί δείκτες σε αναλύσεις φυσικών πληθυσμών. Ο βαθμός στον οποίον η πρωτογενής δομή ενός συγκεκριμένου rRNA είναι όμοια μεταξύ δύο διαφορετικών ειδών αντανακλά την εξελικτική ιστορία και συγγένεια των οργανισμών. Όμως, μεταξύ φυλογενετικά απομακρυσμένων οργανισμών υπάρχουν πολύ λίγες ομοιότητες στην αλληλουχία βάσεων του συγκεκριμένου rRNA (Weisburg et al, 1991).

SNP

Το SNP (single-nucleotide polymorphism) αναφέρεται σε διαφοροποίηση σε επίπεδο αλληλουχίας DNA όπου ένα νουκλεοτίδιο (A, T, C ή G) σε ένα σημείο του γονιδιώματος διαφέρει μεταξύ των ατόμων ενός είδους ή ενός πληθυσμού (Drabovich et al, 2006). Για παράδειγμα, οι αλληλουχίες AAGCCTA και AAGCTTA αποτελούν τμήματα του ίδιου γενετικού τόπου και διαφέρουν σε ένα νουκλεοτίδιο. Η πρώτη αλληλουχία έχει στην 5η θέση μία κυτοσίνη (C), ενώ η δεύτερη μία θυμίνη (T). Στη περίπτωση αυτή θεωρούμε ότι αυτά αποτελούν δύο αλληλόμορφα του συγκεκριμένου γενετικού τόπου. Σχεδόν όλα τα SNPs έχουν μόνο δύο διαφορετικές καταστάσεις σε όλα

τα άτομα, δηλαδή έχουν μόνο δύο αλληλόμορφα και γι' αυτό ονομάζονται δι-αλληλικά. Αν και τεχνικά τα SNPs είναι ένας άλλος τρόπος να κοιτάζουμε την διαφοροποίηση σε επίπεδο DNA (αλληλουχίας), αποτελούν μια ξεχωριστή ομάδα γενετικών δεικτών, επειδή συνιστούν μια προσέγγιση για την εύρεση πληροφοριακών αλληλουχικών δεδομένων.

Αρκετές μελέτες σήμερα χρησιμοποιούν και ουδέτερους γενετικούς δείκτες (Beebe and Rowe, 2004), που είναι περιοχές του γονιδιώματος όπου μία νέα μετάλλαξη έχει το ίδιο αποτέλεσμα στην αρμοστικότητα με το γονίδιο από το οποίο προήλθε. Αυτό σημαίνει ότι οι τόποι αυτοί δεν υπόκεινται στην εξελικτική πίεση της φυσικής επιλογής, αλλά ακολουθούν δικούς τους νόμους όσον αφορά την εξελικτική τους πορεία. Τέτοιοι ουδέτεροι γενετικοί τόποι είναι και οι μικροδορυφόροι οι οποίοι θα περιγραφούν αναλυτικά στη συνέχεια.

Τεχνικές ανάλυσης:

Το 1995 αναπτύχθηκε μια μέθοδος ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών σε πήκτωμα αμύλου, η οποία αποδείχθηκε πολύ σημαντική για την ανάπτυξη της γενετικής ανάλυσης και συνέβαλε καθοριστικά στην εξέλιξη των γενετικών αναλύσεων της πληθυσμιακής γενετικής. Αυτή η τεχνική διαχωρίζει πρωτεΐνες-αλλοένζυμα με βάση την κινητικότητα τους σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Καθώς το ηλεκτρικό πεδίο εφαρμόζεται, τα μόρια μετακινούνται μέσα στο μέσο με διαφορετικούς ρυθμούς, που καθορίζονται από το μέγεθος, το σχήμα, και κυρίως από το ηλεκτρικό φορτίο των μορίων. Τα χαρακτηριστικά αυτά καθορίζονται από την αμινοξική σύνθεση των υπό εξέταση αλλοενζύμων (Richardson et al, 1986). Η οπτικοποίηση των αλλοενζύμων γίνεται στη συνέχεια μέσω της χρώσης του πηκτώματος (μέσου) με ένα αντιδραστήριο που αποκτά χρώμα στην παρουσία ενός ενζύμου (χρωματισμένη ζώνη στο πήκτωμα του μέσου). Με αυτό τον τρόπο, τα αλλοένζυμα μπορούν να διαφοροποιηθούν βάσει της δομής τους, η οποία επηρεάζει το ρυθμό με τον οποίο μεταναστεύουν μέσα στο πήκτωμα κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης.

Η ανάπτυξη DNA δεικτών, δηλαδή δεικτών που αποκαλύπτουν τον πολυμορφισμό στο επίπεδο του γονιδιώματος, αποτέλεσε επανάσταση στην πληθυσμιακή γενετική. Τέτοιες τεχνικές δίνουν μεγαλύτερη δυνατότητα διάκρισης της ποικιλότητας εντός των πληθυσμών. Παραδείγματα τέτοιων τεχνικών είναι η RFLP, η RAPD και η SSCP. Στη μέθοδο RAPD χρησιμοποιούνται μικροί, τυχαίοι εκκινητές, οι οποίοι υβριδοποιούνται σε διάφορα σημεία του γονιδιώματος, πολλαπλασιάζοντας σε μια αντίδραση PCR πολυάριθμα τμήματα DNA, δημιουργώντας ένα ιδιαίτερο πρότυπο ζωνών για κάθε άτομο (Williams et al, 1990). Στη μέθοδο RFLP παρατηρείται η ποικιλομορφία μεταξύ ομόλογων αλληλουχιών DNA έπειτα από πέψη με ένζυμα περιορισμού. Τέλος, στη μέθοδο SSCP η προς μελέτη περιοχή του DNA ενισχύεται με PCR και στη συνέχεια το προϊόν αποδιατάσσεται και ηλεκτροφορείται σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου (Kubo et al, 2009). Αν υπάρχουν μεταλλάξεις, αλλάζει η κινητικότητα των ενισχυόμενων κομματιών DNA.

Η αλληλούχιση είναι η μόνη μέθοδος που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό των βάσεων που διαφέρουν μεταξύ των ατόμων. Αυτή είναι μια πολύ σημαντική ιδιότητα της αλληλούχισης του DNA, αφού δεν αφήνει περιθώρια αμφισβήτησης. Συγκρίνοντας δύο αλληλουχίες μπορούμε με ακρίβεια να πούμε πού και πόσο διαφέρουν. Με αυτό τον τρόπο μας δίνεται η δυνατότητα να συμπεράνουμε τις εξελικτικές σχέσεις μεταξύ των διαφορετικών αλληλομόρφων (Pareek, 2011). Σε γενικές γραμμές, όσο πιο πολλές αλλαγές έχουν από κοινού δύο άτομα, τόσο πιο συγγενικά είναι. Όμως δεν εμφανίζουν

όλες οι αλληλουχίες τον ίδιο ρυθμό υποκαταστάσεων. Αυτό αυτομάτως υποδηλώνει ότι μπορούν να χρησιμοποιήσουμε ταχέως εξελισσόμενες αλληλουχίες για την σύγκριση κοντινών εξελικτικά ατόμων και πιο αργών για απομακρυσμένα εξελικτικά τάξα. Τα τελευταία χρόνια, η επιλογή κατάλληλων γονιδιακών περιοχών για την διερεύνηση των εξελικτικών σχέσεων των ατόμων έχει διευκολυνθεί σημαντικά από την αυξημένη διαθεσιμότητα αλληλουχιών σε δικτυακές βάσεις δεδομένων.

1.3 Μικροδορυφόροι.

Το ευκαρυωτικό γονιδίωμα περιλαμβάνει μικρές, διαδοχικά επαναλαμβανόμενες ακολουθίες που αποτελούν πάνω από το 5% του συνολικού πυρηνικού DNA. Το DNA αυτής της κατηγορίας είναι γνωστό ως «δορυφορικό DNA» (satellite DNA) και δεν αποτελεί συνήθως φορέα πληροφοριών για τη σύνθεση πρωτεϊνών ή RNA.

Το δορυφορικό DNA διακρίνεται σε δύο επιμέρους κατηγορίες:

- το μινιδορυφορικό DNA (minisatellite DNA), όπου το μέγεθος της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας κυμαίνεται από 7-90 bp.
- το μικροδορυφορικό DNA (microsatellite DNA), όπου το μέγεθος της επαναλαμβανόμενης ακολουθίας κυμαίνεται από 1-6 bp. Το μικροδορυφορικό DNA αποτελεί περίπου το 3% του συνολικού γονιδιώματος. Μικροδορυφορικές περιοχές συνολικού μεγέθους 10-300 bp βρίσκονται διάσπαρτες σε όλο το πυρηνικό DNA των ευκαρυωτών, αλλά και στο DNA των μιτοχονδρίων και των χλωροπλαστών των φυτών. Η διασπορά τους στα διάφορα χρωμοσώματα είναι σχετικά ομοιόμορφη, με ελαφρώς μικρότερη πυκνότητα στις τελομερικές και κεντρομερικές περιοχές.

Η πυκνότητα των μικροδορυφορικών γενετικών τόπων ποικίλει στα διάφορα είδη. Στο ανθρώπινο γονιδίωμα και στο μπακαλιάρο του Ατλαντικού (*Gadus morhua*) συναντάται ένας μικροδορυφορικός τόπος ανά 5 – 6 Kb αν και συνήθως στο ζωικό βασίλειο συναντώνται σε μικρότερη πυκνότητα (έναν μικροδορυφορικός τόπος ανά 30-50 Kb) (Gáspári et al., 2007, Suresh B. Et al., 2007). Οι μικροδορυφορικοί τόποι ανάλογα με την ομοιογένεια ή όχι του επαναλαμβανόμενου μοτίβου χωρίζονται σε τέλειους ή ατελείς και απλούς ή σύνθετους.

Κύριο χαρακτηριστικό του μικροδορυφορικού DNA είναι ο πολύ υψηλός ρυθμός μεταλλαξιγένεσης σε σχέση με τις άλλες ουδέτερες περιοχές του γονιδιώματος. Ο ρυθμός αυτός έχει εκτιμηθεί σε 10^{-4} - 10^{-5} μεταλλαγές ανά τόπο και ανά αντιγραφή στις ζύμες (Strand et al., 1993) και 10^{-3} - 10^{-4} στα ποντίκια (Dallas, 1992), που είναι κατά πολύ υψηλότερος από τον συνολικό ρυθμό μεταλλαγής του γονιδιώματος, που εκτιμάται στα 10^{-9} - 10^{-10} . Οι υψηλοί αυτοί ρυθμοί προκαλούν τη δημιουργία νέων αλληλομόρφων και οδηγούν σε υψηλά επίπεδα πολυμορφισμού δίνοντας μεγάλες τιμές ετεροζυγωτίας.

Ο υψηλός μεταλλακτικός ρυθμός των μικροδορυφορικών αποδίδεται σε αυτό που κοινώς είναι γνωστό ως «γλίστρημα» (slippage) της αλυσίδας DNA κατά τη διάρκεια της αντιγραφής. Το φαινόμενο αυτό, επειδή μπορεί να οδηγήσει στην απώλεια ή στην εμφάνιση μιας νέας επανάληψης (συνήθως μίας μπορεί και περισσότερες), ονομάστηκε Stepwise Mutation Model (SMM, Kimura and Ohta, 1978). Κάποια από τα λάθη που δημιουργούνται από το γλίστρημα μπορεί να διορθωθούν από τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης του πυρήνα, όμως πολλά «δραπετεύουν» από τη διόρθωση. Αν κατά τη διαδικασία της αντιγραφής η νεοσυντιθέμενη αλυσίδα σχηματίσει μια θηλιά όπου περιέχεται μια επανάληψη και αυτό δεν αναγνωριστεί από τα ένζυμα επιδιόρθωσης, τότε η νέα αλυσίδα θα είναι κατά μία επανάληψη μεγαλύτερη. Αν όμως η θηλιά

σχηματιστεί στη μητρική αλυσίδα πριν το πέρασμα της διχάλας της αντιγραφής, τότε η θυγατρική αλυσίδα θα είναι μικρότερη κατά μία επανάληψη (Eisen et al., 1999). Το επίπεδο πολυμορφισμού των μικροδορυφορικών τόπων έχει συσχετιστεί με πλήθος παραγόντων, όπως το μέγεθος του επαναλαμβανόμενου μοτίβου, τη σύσταση του επαναλαμβανόμενου μοτίβου, την ομοιογένεια του πληθυσμού, το φύλο και την ηλικία.

Η αφθονία των μικροδορυφορικών γονιδιακών τόπων, η ευρεία κατανομή τους σε όλο το γονιδίωμα, ο υψηλός πολυμορφισμός και τα υψηλά ποσοστά ετεροζυγωτίας αποτελούν τα κύρια χαρακτηριστικά του μικροδορυφορικού DNA. Η μεντελική κληρονομία και η συνυπεροχή διακριτών αλληλομόρφων καθώς επίσης και τα πολλά τεχνικά πλεονεκτήματα (πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο PCR), οι λίγες μη-ειδικές ζώνες, ο εύκολος καθορισμός αλληλομόρφων που εμφανίζει το μικροδορυφορικό DNA αλλά και το γεγονός ότι οι μικροδορυφορικοί δείκτες επιτρέπουν την ανάλυση από κακής ποιότητας δείγματα, όταν το DNA είναι θρυμματισμένο, το καθιστούν πολύτιμο μοριακό εργαλείο σε μελέτες σύνδεσης, χαρτογράφησης και πληθυσμιακής δομής σε πληθώρα οργανισμών (Morris 1993), ενώ βρίσκει σημαντικές εφαρμογές και στην ιατρική διάγνωση, την ιατροδικαστική, συμπεριλαμβανομένων και υποθέσεων αμφισβητούμενης πατρότητας (Edwards et al. 1991).

Πρέπει να τονιστεί στο σημείο αυτό ότι επειδή οι μικροδορυφορικοί τόποι συνήθως βρίσκονται σε μη μεταγραφόμενες περιοχές του γονιδιώματος, θεωρούνται επιλεκτικά ουδέτερες περιοχές του γονιδιώματος

1.3.1 Οι μικροδορυφόροι ως εργαλεία φυλογενετικών αναλύσεων φυσικών πληθυσμών.

Οι μικροδορυφόροι αποτελούν πολύ χρήσιμα εργαλεία για την ανάλυση φυσικών πληθυσμών (Caracristi and Schlotterer, 2003). Λόγω των χαρακτηριστικών τους που ήδη αναφέρθηκαν, η χρησιμοποίησή τους μπορεί να ανιχνεύσει πολύ μικρές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών. Μπορούν να δώσουν απάντηση σε πλήθος ερωτημάτων της πληθυσμιακής γενετικής, όπως ανίχνευση φαινομένων στενωπού (Waldick et al., 2002), στη μελέτη της πορείας εξάπλωσης ενός είδους (Bonizzoni et al., 2002), στην ανάλυση του δραστηκού μεγέθους και της αναπαραγωγικής ικανότητας ενός πληθυσμού (Matoq, 2004), ανίχνευση φαινομένων εισβολής, γονιδιακής ροής και μετανάστευσης, όπως για τον εντοπισμό της προέλευσης ειδών που δεν προϋπήρχαν σε κάποια περιοχή (Meixner et al., 2002; Gasperi et al., 2002), στον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων μεταξύ δύο ή περισσότερων πληθυσμών (Goldstein et al., 1995), ακόμα και στη μελέτη της συμπεριφοράς ζευγαρώματος ειδών με οικονομική σημασία ή προστατευμένων (Estoup et al., 1995; Bonizzoni et al., 2002; Moore and Ball, 2002).

Από την άλλη, ο υψηλός πολυμορφισμός τους σε συνδυασμό με το γεγονός ότι α) δεν είναι δυνατή η εξακρίβωση της προέλευσης ενός αλληλομόρφου (αν προήλθε δηλαδή από κάποιο αλληλόμορφο με περισσότερες ή λιγότερες επαναλήψεις) και β) φαινόμενα ομοπλασίας (αλληλόμορφο με το ίδιο μέγεθος και ίσως τον ίδιο αριθμό επαναλήψεων, που όμως δεν έχουν ίδια εξελικτική πορεία) δεν τους κάνει ιδιαίτερα χρήσιμους δείκτες σε φυλογενετικές και ειδογενετικές μελέτες ή για τη μελέτη πληθυσμών που έχουν διαφοροποιηθεί αρκετά. Εντούτοις χρησιμοποιούνται με τη μέθοδο της δια-ειδικής ενίσχυσης (cross-species amplification), ελέγχονται δηλαδή οι εκκινητές που έχουν σχεδιαστεί στις μοναδικές περιοχές εκατέρωθεν της αλληλουχίας των μικροδορυφόρων για το κατά πόσο μπορούν να ενισχύσουν το ίδιο προϊόν σε διαφορετικά, αλλά συγγενικά, είδη και ακολούθως αναλύεται κυρίως η πρωτοδιάταξη των μοναδικών

αλληλουχιών που περιβάλλουν τους μικροδορυφόρους, αλλά σε μερικές περιπτώσεις και οι ίδιοι οι μικροδορυφόροι (Schlotterer et al., 1991; Rico et al., 1996).

1.3.2. Χρήση μικροδορυφορικών δεικτών σε φυλογενετικές αναλύσεις φυσικών πληθυσμών δάκου.

Για την φυλογενετική ανάλυση φυσικών πληθυσμών του δάκου από διάφορες περιοχές της Μεσογειακής λεκάνης χρησιμοποιήθηκαν συγκεκριμένοι μικροδορυφορικοί δείκτες. Αρχικά μελετήθηκε η πληθυσμιακή δομή και η ιστορία εξάπλωσης του δάκου από τους Nardi et al (2005), τόσο με μικροδορυφόρους όσο και με mtDNA. Η γενετική ομοιότητα που παρατηρήθηκε ομαδοποίησε τους πληθυσμούς σε δύο γενετικές ομάδες –της Αφρικής και μιας ομάδας που συμπεριλαμβάνει τους πληθυσμούς της λεκάνης της Μεσογείου. Από την άλλη μεριά οι Augustinos et al (2005), σε μια μελέτη για την εξάπλωση του δάκου στη Μεσόγειο υποστήριξαν την ένδειξη μίας διαφοροποίησης των πληθυσμών της Μεσογείου σε 3 υποπληθυσμούς: Έναν της Δυτικής Μεσογείου (Ιβηρικής χερσονήσου), έναν της Κεντρικής Μεσογείου (συμπεριλαμβανομένης της Ελλάδας, της Ιταλίας και της Τουρκίας) και έναν της Ανατολικής Μεσογείου (Κύπρου και Ισραήλ). Οι παρατηρούμενες διαφορές ανάμεσα στις δύο δημοσιεύσεις μπορούν να αποδοθούν στο σημαντικό μεγαλύτερο αριθμό Μεσογειακών τοποθεσιών (19 έναντι 8), μυγών (30 έναντι 22) και μικροδορυφορικών τόπων (12 έναντι 9) που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη των Augustinos et al έναντι των Nardi et al (αντίστοιχα), γεγονός που οδήγησε σε καλύτερη και ευκρινέστερη ομαδοποίηση των πληθυσμών. Μια πιο πρόσφατη μελέτη έγινε για να ρίξει φως και στην διαδικασία εξάπλωσης του εντόμου στην Τουρκία. Η ανάλυση των δεδομένων αποκάλυψε μια σημαντική γενετική διακύμανση στους πληθυσμούς των εντόμων και έναν ορισμένο βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών του Αιγαίου και της Μεσογειακής Λεκάνης. Οι Μεσογειακοί πληθυσμοί εμφανίζουν υψηλότερα επίπεδα γενετικής ποικιλομορφίας των μικροδορυφορικών δεικτών από τους πληθυσμούς του Αιγαίου, τα οποία επισημαίνουν το ανατολικό τμήμα της Μεσογείου ως την πλέον πιθανή πηγή της εισβολής στην Τουρκία (Dogac et al, 2013).

Οι Nardi et al (2005), μέσα από την μικροδορυφορική ανάλυση που πραγματοποίησαν, ανέδειξαν την φυλογεωγραφική ιστορία του δάκου της ελιάς. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν, η διάδοση των εντόμων έγινε μέσω διαδοχικών φαινομένων εισβολής, οι οποίες ξεκινούν από την περιοχή του Πακιστάν, που θεωρείται ως η γεωγραφική πηγή εξάπλωσης του είδους. Η διάδοση των εντόμων μπορεί να δωθεί σε μια γραμμική διάταξη: Πακιστάν, Νότιος Αφρική, Μεσόγειακή λεκάνη, Αμερική (Καλιφόρνια). Σε μεταγενέστερη δημοσίευσή τους, οι ίδιοι συγγραφείς υποστηρίζουν ότι κατά την τελευταία υποπερίοδο του Καινοζωϊκού αιώνα, πληθυσμοί του δέντρου της άγριας ελιάς διαχωρίστηκαν από την άγρια ελιά της Αφρικής και της Ασίας (*Olea europea* subsp. *cuspidata*) και αποτέλεσαν την άγρια ελιά που απαντάται στη Μεσόγειο (*Olea europea* subsp. *europea* var. *sylvestris*), η οποία στη συνέχεια αντικαταστάθηκε από την ήμερη ελιά *Olea europea*. Έτσι, ενώ πληθυσμοί του εντόμου βρίσκονταν αρχικά στα δέντρα της άγριας ελιάς, στη συνέχεια μεταπήδησαν στην ήμερη ελιά και αποτέλεσαν τον πληθυσμό που δραστηριοποιείται στην περιοχή της Μεσογείου (Nardi et al. 2010). Αντίθετα, στη αρχική μελέτη των Augustinos et al (2005), η γραμμική μείωση της παρατηρούμενης ετεροζυγωτίας των μικροδορυφορικών δεικτών από τις ανατολικές στις δυτικές περιοχές της Μεσογείου αποτέλεσε ισχυρή ένδειξη ότι η προέλευση του είδους βρίσκεται ανατολικά της Μεσογειακής λεκάνης και ότι το έντομο συνόδευσε την εξάπλωση της καλλιεργήσιμης ελιάς στη Μεσόγειο τα ιστορικά χρόνια.

Μικροδορυφορικοί δείκτες χρησιμοποιήθηκαν και για την επιβεβαίωση της περιοχής προέλευσης της εισβολής του εντόμου στην Καλιφόρνια. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, αρχικά οι Nardi et al (2005), υπέδειξαν την ύπαρξη δύο ομάδων, της Νοτίου Αφρικής και της Μεσογείου καθώς και ότι οι πληθυσμοί της Καλιφόρνια, προέρχονται από τη Μεσόγειο και δεν αποτελούν ξεχωριστό πληθυσμό (Nardi et al, 2005). Στη συνέχεια, έντομα από την περιοχή της Καλιφόρνια, αναλύθηκαν με βάση τους πολυμορφισμούς σε δέκα μικροδορυφορικούς τόπους (Zygouridis et al., 2009). Τα αποτελέσματα της μελέτης εξετάστηκαν μαζί με αυτά της προηγούμενης μελέτης των πληθυσμών του

εντόμου στη λεκάνη της Μεσογείου (Augustinos et al., 2005) και κατέδειξαν ως πιθανή πηγή της εισβολής το ανατολικό κομμάτι της Μεσογείου ενώ η εμφάνιση μοναδικών αλληλομόρφων στα δείγματα της Καλιφόρνιας υποδήλωσαν την ύπαρξη φαινομένων γενετικής μετάπτωσης κατά τη διάρκεια της εισβολής και της εξάπλωσης του εντόμου.

1.4 ΣΚΟΠΟΣ

Η εξάπλωση του δάκου της ελιάς έχει ακολουθήσει πορεία παράλληλη με αυτή της εξάπλωσης της ελαιοκαλλιέργειας. Η οικονομική ζημιά που προκαλεί ετησίως είναι πολύ σημαντική και γι' αυτό ο έλεγχος των πληθυσμών του είναι επιτακτικός. Προς αυτή την κατεύθυνση είναι απαραίτητη η βαθιά γνώση της βιολογίας του εντόμου, καθώς και της δυναμικής των φυσικών του πληθυσμών.

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η διερεύνηση φυσικών πληθυσμών δάκου από τρεις διαφορετικές επαρχίες του Ιράν, ώστε να διαπιστωθεί αν αποτελούν προϋπάρχοντα πληθυσμό στη περιοχή ή αν η παρουσία του εντόμου είναι αποτέλεσμα πιο πρόσφατης εισβολής από γειτονικές περιοχές.

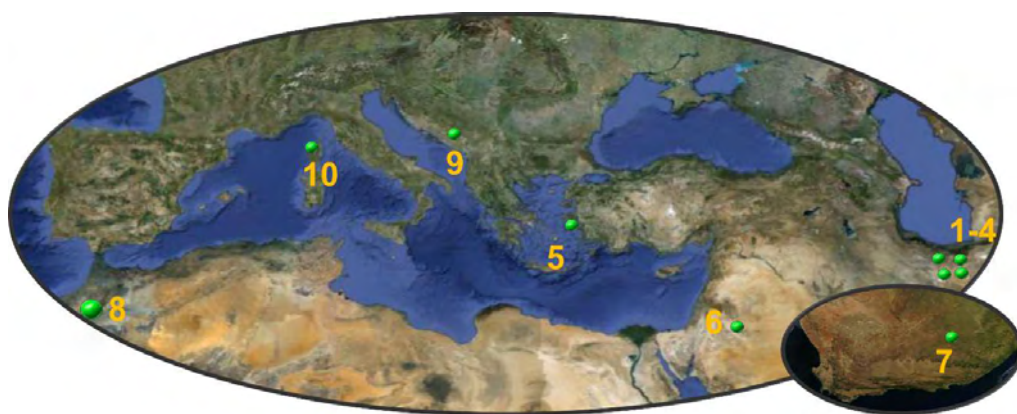
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πληθυσμοί εντόμων.

Οι πληθυσμοί των εντόμων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της συγκεκριμένης ερευνητικής εργασίας προέρχονται από συλλογή ατόμων φυσικών πληθυσμών της μύγας *Bactrocera oleae*. Οι πληθυσμοί παρουσιάζονται συνοπτικά στον πίνακα 1 ενώ η γεωγραφική τους κατανομή παρουσιάζεται στην εικόνα 1.

Γεωγραφική περιοχή	Επαρχίες	Πληθυσμοί	Άτομα	Γεωγραφικές συντεταγμένες
Ελλάδα	Λέσβος	Μυτιλήνη	30	39°6'N 26°33'E
Γαλλία	Κορσική	Κορσική	30	42° 9' 0" N, 9° 5' 0" E
Νότιος Αφρική	Western Cape	Stellenbosch	34	33°55'31"S 18°25'26"E
Μαρόκο	Marrakesh	Menara	30	34°02'N 6°51'W
Ισραήλ	Σινά	Sde boker	18	30°52'08"N 34°47'33"E
Κροατία	Δαλματία	Split	30	43°30'N 16°26'E
Ιράν	Qazvin	Qazvin	30	36.2693°N 50.0029°E
		Zanjan	Abbar	
	Guillan	Gilvan	30	36.6751°N 48.4845°E
		Manjil	30	
		Roodbar	30	
		Rahmatabaad	30	
		Rastamabaad	30	
Loshan	30	37.2774°N 49.5890°E		

Πίνακας 2: Στον πίνακα 2 αναγράφονται με τη σειρά: η γεωγραφική περιοχή, η επαρχία, το όνομα των πληθυσμών, ο αριθμός των ατόμων και τέλος οι γεωγραφικές συντεταγμένες των δειγμάτων.



Εικόνα 6: Οι πληθυσμοί που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση: 1.Qazvin, 2.Gilvan, 3.Roodbar, 4.Manjil, 5.Μυτιλήνη, 6.Ισραήλ (SB), 7.Νότιος Αφρική, 8.Μαρόκο, 9.Split, 10.Κορσική.

2.2 Μικροδορυφορικοί δείκτες.

Οι μικροδορυφορικοί δείκτες που αναλύθηκαν αποτελούν ένα υποσύνολο των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των πληθυσμών του δάκου της ελιάς στη λεκάνη της Μεσογείου και για την ανάλυση της εισβολής του εντόμου στην Καλιφόρνια (Πίνακας 2) (Augustinos et al, 2002, Augustinos et al, 2005, Zygouridis et al, 2009).

Όνομα Δείκτη	Μοτίβο	Αλληλουχία εκκινητών	Μέγεθος	Accession number	Φθοριό-χρωμα
Boms61	A ₁₁ CA ₁₁ CATCACA ₄ GA ₂ GA ₈	F: ACTGAAATGCAGCTTATTGGC R: ATGAAGCGACTGGCACGAG	186-190	DQ078252	PET
Boms22	CAT(CA) ₇ (TA) ₃ TT (TA) ₅	F: GTAAAGCACACGGAAGCG R: GAGGTCAAAAAGGATGCTAAG	197-225	DQ078248	NED
Boms30	(GT) ₁₇	F: CTGACTTCTTGCTTTACACG R: CAGCTTATCTGCTTTAAGTGC	126-168	AF467823	5'FAM
Boms29	(GT) ₁₀	F: TGAAGGTGATGAATGAAAGC R: GGAATGACTGTGAGCAAGC	108-126	AF467824	PET
Boms25	(GT) ₁₂	F: TGGAATGCGCTATTTTGTG R: ACTCGTATATACGTACATGG	157-171	AF467826	NED
Boms18	(CA) ₁₃	F: GCCATGAATGCAGACCAC R: CCTATTCAAATGCACGCAAAAC	154-168	AF467828	VIC
Boms31	(GT) ₄ GC(GT) ₆ GC (GT) ₂	F: TGCTTGAGTTGCTCGTTGG R: GCCGCATGACATAAAGAATCG	144-170	DQ078249	VIC
Boms10	(CA) ₁₀ GA(CA) ₂	F: CAGAGCATCTCGCTTTGG R: TCAACAATCCCAGCAAAATC	136-172	AF467830	6-FAM

Πίνακας 3: Πίνακας μικροδορυφορικών δεικτών. Στον πίνακα αναγράφονται με τη σειρά: το όνομα του δείκτη, η αλληλουχία-μοτίβο του δείκτη, η αλληλουχία των εκκινητών, το αναμενόμενο μέγεθος, του προϊόντος της αντίδρασης PCR, το accession number του μικροδορυφορικού δείκτη και τέλος το όνομα της χρωστικής με τον οποίο έχει σημειωθεί ο κάθε ένας απ' αυτούς.

2.3 Απομόνωση γονιδιωματικού DNA.

Η απομόνωση του γονιδιωματικού DNA από τα έντομα πραγματοποιήθηκε με παραλλαγή του πρωτοκόλλου Wizard® Genomic DNA Purification Kit της εταιρίας Promega. Η μέθοδος καθαρισμού βασίζεται σε μια διαδικασία κατά την οποία πραγματοποιείται λύση των κυττάρων και των πυρήνων, απομάκρυνση των κυτταρικών πρωτεϊνών, συμπύκνωση του DNA μέσω κατακρήμνισης με ισοπροπανόλη και αναδιάλυση του ιζήματος στην επιθυμητή ποσότητα.

Τα έντομα φυλάσσονται σε αιθανόλη στους 4°C σε σωλήνες τύπου falcon. Για την απομόνωση του DNA τους, αρχικά τοποθετούνται σε χαρτί για να εξατμιστεί η αιθανόλη. Στη συνέχεια εισάγονται σε σωληνάκια τύπου erpendorf ώστε να αρχίσει η διαδικασία απομόνωσης.

Υλικά:

- Nucleic lysis solution (NLS)
- RNAάση solution
- Protein Precipitation solution
- Ισοπροπανόλη
- Αιθανόλη 70%
- DNA Rehydration solution

Μέθοδος:

1. Εισαγωγή 200μl Nucleic lysis solution (NLS). Ακολουθεί ομογενοποίηση του εντόμου με τη βοήθεια ειδικού εμβόλου. Εισαγωγή άλλων 200μl NLS με ταυτόχρονη έκπλυση του εμβόλου ομογενοποίησης.
2. Επώαση στους 65 °C για 25 λεπτά. Επώαση περίπου 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
3. Προσθήκη 3μl RNAάση solution. Επώαση 30 λεπτά στους 37 °C. Επώαση περίπου 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
4. Εισαγωγή άλλων 135μl Protein Precipitation solution. Ακολουθεί Vortex και επώαση 5 λεπτά στο πάγο.

5. Φυγοκέντρωση 5 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα (13,000 rpm), μεταφορά του υπερκείμενου σε καθαρό σημασμένο erppendorf και εισαγωγή 400μl ισοπροπανόλης. Ανάδευση 3-4 φορές προσεκτικά.
6. Φυγοκέντρωση 2 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα. Απόρριψη του υπερκειμένου. Εισαγωγή άλλων 500μl αιθανόλης 70%.
7. Προσεκτική ανάδευση 3-4 φορές. Φυγοκέντρωση 2 λεπτά σε μέγιστη ταχύτητα.
8. Απόρριψη του υπερκειμένου και στέγνωμα.
9. Εισαγωγή 100μl DNA Rehydration solution και επώαση στους 65 °C για 1 ώρα.
10. Φύλαξη overnight στους 4 °C.

2.4 Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (Polymerase chain reaction, PCR).

Η μέθοδος βασίζεται στην επαναλαμβανόμενη αντιγραφή ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια μιας ειδικής θερμοανθεκτικής πολυμεράσης και δύο ολιγονουκλεοτιδικών εκκινητών σχεδιασμένων σε γνωστές αλληλουχίες (Saiki et al.,1988). Έτσι ένα δείγμα DNA αναμειγνύεται με τα τέσσερα δεοξυριβονουκλεοτίδια (dNTPs), τα δύο εναρκτήρια ολιγονουκλεοτίδια (εκκινητές) και την ειδική DNA πολυμεράση. Το δείγμα θερμαίνεται στους 94 °C για να αποδιαταχθεί το DNA και ακολούθως ψύχεται στους 50 °C για να υβριδοποιηθούν οι εκκινητές με τις αποδιαταγμένες αλυσίδες του DNA. Ακολουθεί πολυμερισμός στους 72 °C και τα παραπάνω βήματα επαναλαμβάνονται 30 φορές έως ότου συντεθεί αρκετή ποσότητα προϊόντος.

Υλικά:

- DNA
- Ρυθμιστικό διάλυμα (Buffer)
- MgCl₂
- dNTPs
- Ειδική θερμοανθεκτική DNA πολυμεράση (GeneON Maximo Taq DNA polymerase)
- Εκκινητές (Primers)

Μέθοδος:

Σε ένα σωλήνα τύπου erppendorf για PCR τελικού όγκου 10μl χρησιμοποιούνται οι ακόλουθες ποσότητες (Πίνακας 3).

Υλικά	Ποσότητες
DNA	1μl
Buffer	1μl
Primer F	0,5μl
Primer R	0,5μl
dNTPs	0,25μl
Taq	0,1μl
H ₂ O	6,65μl
Τελικός όγκος	10μl

Πίνακας 4: Αναλυτικός πίνακας με αναγραφόμενα τα υλικά και τις ποσότητες αυτών, για την διεξαγωγή της PCR αντίδρασης.

Το πρόγραμμα μιας τυπικής αντίδρασης PCR παρουσιάζεται στον πίνακα 4.

Στάδιο	Θερμοκρασία	Χρόνος	Κύκλος
Αποδιάταξη	94°C	4min	1
Αποδιάταξη	94°C	1minsec	30
Υβριδισμός	50°C	1sec	
Πολυμερισμός	72°C	1min	
Τελικός πολυμερισμός	72°C	5min	1
Διατήρηση	4°C	-	-

Πίνακας 5: Το πρόγραμμα της PCR αντίδρασης όπως αυτό εισάγεται στον κυκλοποιητή.

2.5 Ηλεκτροφόρηση.

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την ταυτοποίηση μορίων DNA (Sambrook et al., 1989). Όταν εφαρμοστεί ηλεκτρικό πεδίο στα άκρα του πηκτώματος τότε το DNA θα μετακινηθεί προς το θετικό πόλο λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρει σε ουδέτερο pH. Έτσι αν τοποθετηθούν τμήματα DNA στην άνοδο(-) θα κινηθούν προς την κάθοδο.

Η μετακίνηση του DNA είναι αντιστρόφως ανάλογη του λογαρίθμου του μοριακού του βάρους. Όσο πιο μικρό το μέγεθος του DNA τόσο πιο γρήγορα μετακινείται προς το θετικό πόλο. Μόρια DNA μεγέθους 200 bp έως 50 kb μπορούν να διαχωριστούν σε πηκτώματα αγαρόζης διαφόρων συγκεντρώσεων. Όσο πιο πυκνή η συγκέντρωση του πηκτώματος σε αγαρόζη τόσο πιο υψηλή η διαχωριστική ικανότητα.

Η κινητικότητα των τμημάτων DNA στο πήκτωμα επηρεάζεται από τη συγκέντρωση της αγαρόζης. Η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA (μ) και η συγκέντρωση της αγαρόζης στο πήκτωμα (τ) συνδέονται με τον τύπο $\mu = \log \mu_0 - K\tau$ όπου μ_0 είναι η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του DNA και $K\tau$ ο συντελεστής επιβράδυνσης.

Το DNA είναι ορατό σε υπεριώδες φως, με τη βοήθεια του βρωμιούχου αιθιδίου, το οποίο δεσμεύεται στη διπλή έλικα του. Άρα με βάση το φθορισμό των μορίων του βρωμιούχου αιθιδίου μπορεί να ποσοτικοποιηθεί και το γενετικό υλικό. Επίσης μπορούμε να υπολογιστεί το μέγεθος του DNA έχοντας ως μέτρο σύγκρισης ένα μάρτυρα μοριακού βάρους (ladder).

Υλικά:

- Ρυθμιστικό διάλυμα TBE 5X 1L: 54g Tris-base, 27,5g Boric acid, 20ml EDTA 0,5M (pH 8.0)
- Αγαρόζη
- Ladder pBR322 DNA-MspI Digest (BioLabs inc.)
- Διάλυμα φόρτωσης (Loading buffer) 6X: 0,09% μπλε της βρωμοφαινόλης, 60% γλυκερόλη, 0,09% κυανού της ξυλόλης, 60mM EDTA
- Βρωμιούχο αιθίδιο

Μέθοδος:

Για την παρασκευή 160ml πηκτώματος αγαρόζης 1,2% με 0,5X TBE:

1. Προσθήκη 1,92 gr αγαρόζης σε μια κωνική φιάλη.
2. Προσθήκη 160ml TBE 0,5X.
3. Θέρμανση της κωνικής φιάλης με συνεχή παρακολούθηση μέχρι να πραγματοποιηθεί πλήρης διάλυση της αγαρόζης
4. Προσθήκη βρωμιούχου αιθιδίου και ανακίνηση
5. Τοποθέτηση του διαλύματος στις ειδικές βάσεις (καλούπια) της ηλεκτροφορητικής συσκευής.
6. Αναμονή μέχρι να στερεοποιηθεί.

Για την ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων:

1. Τοποθέτηση του πηκτώματος στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.
2. Προσθήκη διαλύματος TBE 0,5X ώστε να καλυφθούν τα πηγαδάκια ηλεκτροφόρησης.
3. Προσθήκη διαλύματος φόρτωσης στα δείγματα και ανάδευση.
4. Μεταφορά των δειγμάτων και του μάρτυρα μοριακού βάρους στα πηγαδάκια.

Κατά τη διάρκεια της ηλεκτροφόρησης μπορούμε να παρακολουθούμε το διαχωρισμό των ζωνών σε UV. Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται ποσοτικοποίηση των ζωνών.

2.6 Ανάλυση τμημάτων ενίσχυσης (DNA fragment analysis).

Η ανάλυση των προϊόντων της PCR έγινε αυτόματα με τον 3730 ABI sequencer της εταιρείας Macrogen. Η χρήση σημασμένων, με φθοριοχρώματα, εκκινητών έγινε για να βοηθήσει την οπτικοποίηση των τμημάτων ενίσχυσης της PCR. Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο ότι επιτρέπει να συνυπάρχουν σε κάθε δείγμα προς ανάλυση, 4 τμήματα DNA ενισχυμένα με PCR που όμως το κάθε ένα είναι σημασμένο με διαφορετικό φθοριοχρώμα τοποθετημένο στο τέλος της αλληλουχίας κάθε εκκινητή. Έτσι κατά την ανάλυση των δειγμάτων, οι αλληλουχίες που φέρουν τα τέσσερα διαφορετικά φθοριοχρώματα, εφόσον αυτά έχουν διαφορετικό κύμα εκπομπής μπορούν να ανιχνεύονται ταυτόχρονα εξοικονομώντας χρόνο και χρήματα.

2.7 Χρήση προγραμμάτων βιοπληροφορικής – Επεξεργασία αποτελεσμάτων αλληλούχισης.

Το σκοράρισμα των αλληλομόρφων έγινε μέσω του προγράμματος Peak Scanner. Για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Popgene (υπολογισμός γενετικών αποστάσεων και δεικτών πολυμορφισμού), Genalex 6.5 (Ανάλυση κυρίων συνιστωσών) και Structure (Μπαεσιανή ομαδοποίηση πληθυσμών).

Το πρόγραμμα Peak Scanner (Applied Biosystems) χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να αναλυθούν τα PCR προϊόντα τα οποία είχαν σταλεί για αλληλούχιση. Πιο συγκεκριμένα, το πρόγραμμα έδωσε τη δυνατότητα διαχωρισμού των αλληλομόρφων από τα παραπροϊόντα (ζεύγη εκκινητών) με βάση μια κατανομή διαχωρισμού η οποία υπολογίζει με ακρίβεια τα μεγέθη των θραυσμάτων DNA.

Με το πρόγραμμα Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999) μετρήθηκε η γενετική ποικιλομορφία ως συνάρτηση του πραγματικού αριθμού αλληλομόρφων ανα γενετικό τόπο (n_a), του δραστικού αριθμού των αλληλομόρφων (n_e), της παρατηρούμενης (H_o) και της αναμενόμενη ετεροζυγωτίας (H_e). Αποκλίσεις από την ισορροπία Hardy-Weinberg (HWE) εξετάστηκαν με το τεστ ομοιογένειας μέσω του κριτηρίου G^2 . Χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό των γενετικών αποστάσεων κατά Nei (1972) και του βαθμού γονιδιακής ροής. Τέλος το πρόγραμμα Popgene 1.31, χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή δενδρογράμματος με τη μέθοδο UPGMA, με μια τροποποίηση του Phylip 3.5 (Felsenstein, 1994).

Το λογισμικό Genealex 6.5 (Peakall, R and Smouse, PE, 2012) χρησιμοποιήθηκε για την εκτίμηση των PhiPT τιμών. Η PhiPT μήτρα χρησιμοποιήθηκε για να εκτελεστεί η ανάλυση κυρίων συνιστωσών (PCA). Οι PhiPT τιμές υπολογίζονται ως το τμήμα της ποικιλότητας ανάμεσα στους πληθυσμούς σε σχέση με την συνολική ποικιλότητα. Αντιπροσωπεύουν την συσχέτιση μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού σε σχέση με το σύνολο των ατόμων όλων των πληθυσμών.

Το λογισμικό Structure (Pritchard et al. 2000) ακολουθεί τις μεθόδους ομαδοποίησης δεδομένων που χρησιμοποιούνται στη βιοπληροφορική. Σαν πρόγραμμα χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του αριθμού των πιθανών ομάδων (clusters) στις οποίες διαχωρίζονται όλα τα άτομα των πληθυσμών μας. Το πρόγραμμα Structure ελέγχει την πιθανότητα να είναι πραγματικός ο αριθμός πληθυσμών που εμείς του ζητάμε να ελέγξει. Η Μπαγιεσιανή αυτή μέθοδος υποθέτει πώς οι δείκτες βρίσκονται σε

ισορροπία κατά HWE μεταξύ των πληθυσμών και διαχωρίζει τα άτομα σε πληθυσμούς έτσι ώστε να ισχύει η ισορροπία. Με λίγα λόγια το πρόγραμμα Structure χρησιμοποιείται για την κατάταξη κάθε ατόμου σε κάθε έναν από τους ορισθέντες υποπληθυσμούς. Το αποτέλεσμα προέκυψε από το συνδυασμό των μοντέλων No admixture (Ancestry Model) και Allele Frequencies Correlated among populations (Allele Frequency Model), ο οποίος και χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε για burn-in period 50000 και 100000 Markov chain Monte Carlo (MCMC) επαναλήψεις μετά το αρχικό burn-in, για $K=1$ ως $K=6$ (όπου K ο πιθανολογούμενος αριθμός διακριτών πληθυσμών). Η ανάλυση προχώρησε λίγο με την τροποποίηση Evanno, με μία γρήγορη ανάλυση 5 ανεξάρτητων δοκιμών για κάθε K (1-10 και burn-in period 5000 και επίσης 5000 MCMC επαναλήψεις).

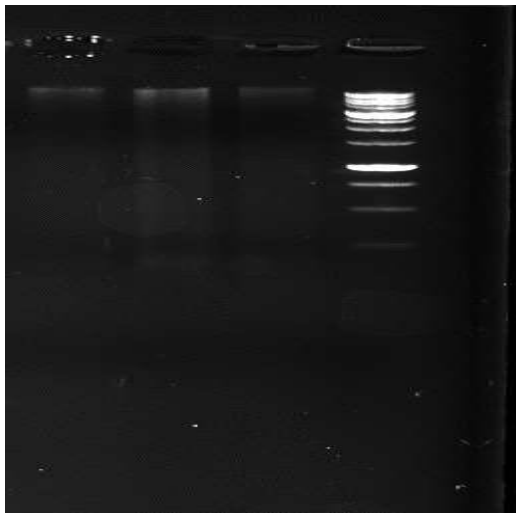
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση φυσικών πληθυσμών δάκου από τρεις διαφορετικές επαρχίες του Ιράν ώστε να διαπιστωθεί αν αποτελούν προϋπάρχοντα πληθυσμό στη περιοχή ή είναι αποτέλεσμα εισβολής του εντόμου από γειτονικές περιοχές.

Η προσέγγιση που ακολουθήθηκε ήταν η απομόνωση DNA εντόμων από τέσσερις διαφορετικές περιοχές του Ιράν και ενίσχυση οκτώ μικροδορυφορικών τόπων με PCR χρησιμοποιώντας σημασμένους με φθοριόχρωμα εκκινητές. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάλυση των προϊόντων με το 3730 ABI sequencer και επεξεργασία με βάση το πρόγραμμα βιοπληροφορικής Peak Scanner. Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκαν το πρόγραμμα Popgen, Genalex 6.5 και το πρόγραμμα Structure.

3.1. Απομόνωση DNA και ενίσχυση μικροδορυφορικών δεικτών.

Από την επαρχία Qazvin προήλθε ο ομώνυμος πληθυσμός από τον οποίο ελήφθησαν 30 ενήλικα έντομα στα οποία έγινε απομόνωση γονιδιωματικού DNA με τη μέθοδο που παρουσιάστηκε παραπάνω (βλ.2.Υλικά και μέθοδοι, παρ. 2.3). Ο ίδιος αριθμός ατόμων (30) εξετάστηκε και από την επαρχία Zanjan (πληθυσμός Gilvan) και Guillan (πληθυσμοί Roodbar, Manjil).

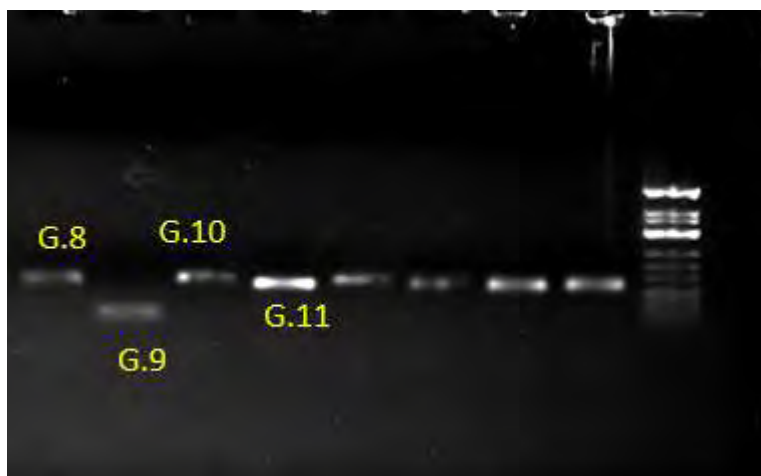


Εικόνα 7 : Ηλεκτροφόρηση προϊόντων απομόνωσης των ατόμων 13,14,15 από τον πληθυσμό Gilvan. Ως μάρτυρας μοριακού βάρους χρησιμοποιήθηκε ο 1kb DNA Ladder Blue της εταιρείας GeneON.

Μετά την απομόνωση ακολούθησε ενίσχυση των 8 μικροδορυφορικών δεικτών με PCR (polymerase chain reaction-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης) και ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Οι συνθήκες και οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για τις δύο αυτές πειραματικές διαδικασίες παρουσιάστηκαν στην προηγούμενη ενότητα (βλ.Υλικά μέθοδοι, παρ. 2.4-2.5).

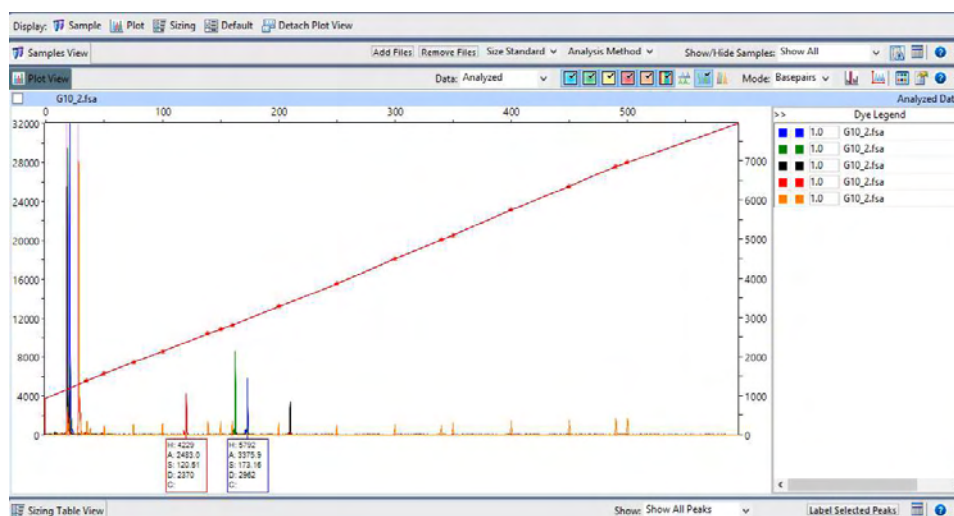
3.2 Ανάλυση μεγέθους PCR προϊόντων μέσω του προγράμματος Peak Scanner.

Η ανάλυση των προϊόντων της PCR έγινε αυτόματα με τον 3730 ABI sequencer της εταιρείας Macrogen μέσω του οποίου πραγματοποιήθηκε τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (capillary sequencing). Οι υπολογισμοί ήταν εφικτό να πραγματοποιηθούν χάρη στην ένταση του φθορισμού της χρωστικής με την οποία είχαν σημειωθεί οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην αντίδραση PCR.

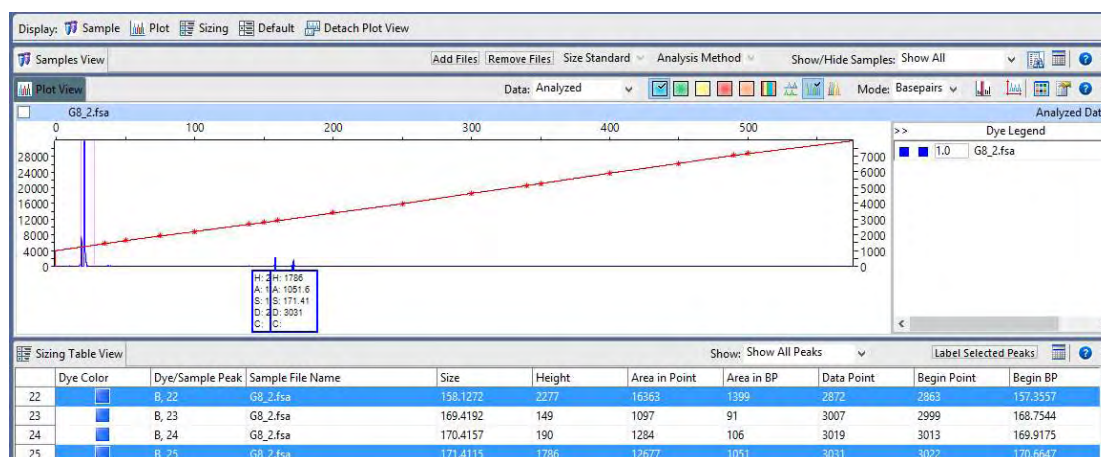


Εικόνα 8: Ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR για των εκκινητή Boms10. Με κίτρινα γράμματα αναγράφονται τα άτομα 8,9,10,11 του πληθυσμού Gilvan για τα οποία έγινε ενίσχυση του συγκεκριμένου μικροδορυφορικού τόπου. Στην εικόνα υποδεικνύεται η ύπαρξη διαφορετικών αλληλομόρφων για το συγκεκριμένο μικροδορυφορικό δείκτη.

Μέσω του προγράμματος Peak Scanner αναλύθηκαν τα αποτελέσματα που λάβαμε από την Macrogen, όπου τα αλληλόμορφα προσδιορίστηκαν με βάση το ακριβές μέγεθος των θραυσμάτων.



Εικόνα 9: Ανάλυση μεγέθους PCR προϊόντων με το πρόγραμμα Peak Scanner. Στην εικόνα διακρίνονται τέσσερις κορυφές, οι οποίες αντιστοιχούν στο μέγεθος των θραυσμάτων DNA. Οι κορυφές αποτελούν ένδειξη για την ανάλυση των αλληλομόρφων (η κόκκινη κορυφή αντιστοιχεί στο προϊόν του εκκινητή Boms29, η πράσινη στον εκκινητή Boms18, η μπλε στον Boms10 και η μαύρη στον Boms22). Όλες οι παραπάνω κορυφές αντιστοιχούν στο άτομο 10 του πληθυσμού Gilvan (G.10 εικόνα 2).

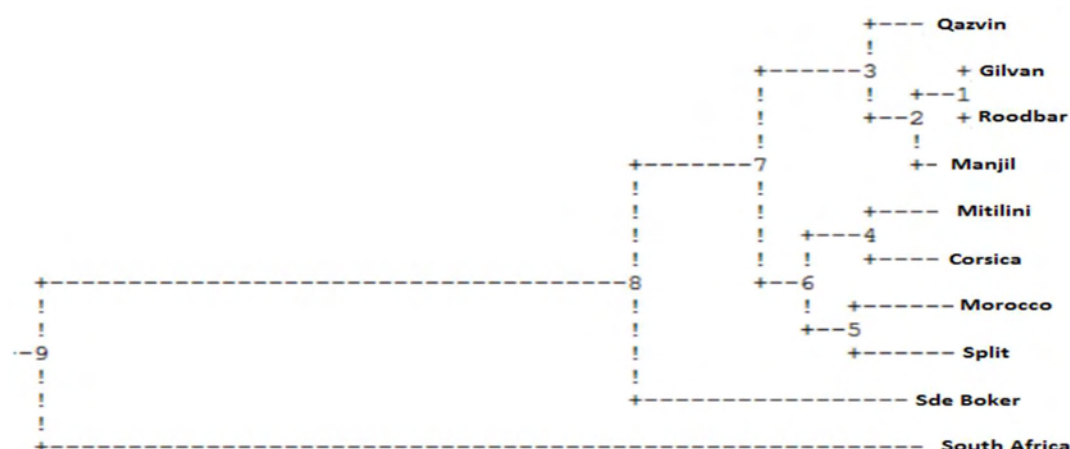


Εικόνα 10: Ανάλυση του πολυμορφισμού του ατόμου G.8 με το πρόγραμμα Peak Scanner. Με τη δυνατότητα επιλογής του προγράμματος μελετήθηκε μεμονομένα ο πολυμορφισμός του ατόμου 8 για τον μικροδορυφορικό δείκτη Boms10. Το συγκεκριμένο άτομο για το δείκτη Boms10 παρουσιάζει δύο αλληλόμορφα με μήκη 158/171. Στην εικόνα της ηλεκτροφόρηση των προϊόντων της PCR δεν μπορούμε να δούμε δυο διαφορετικές ζώνες καθότι οι διαφορές στα μήκη των αλληλομόρφων του συγκεκριμένου ετεροζυγώτη είναι πολύ μικρές.

Στο παράρτημα 1 παρουσιάζονται αναλυτικά τα μεγέθη των αλληλομόρφων που αναλύθηκαν, τόσο από τους πληθυσμούς του Ιραν όσο και από τους υπόλοιπους πληθυσμούς που συμπεριλήφθηκαν στην ανάλυση (όπως αναφέροται στον Πίνακα 2, Υλικά- Μέθοδοι).

3.3. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τα προγράμματα Popgene, GeneAlex και Structure.

Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκαν τα προγράμματα Popgene και Genalex 6.5 για τον υπολογισμό γενετικών αποστάσεων και δεικτών πολυμορφισμού και για την ανάλυση των κυρίων συνιστωσών αντίστοιχα



Εικόνα 11: Δενδρόγραμμα που κατασκευάστηκε από το πρόγραμμα Popgene 1.31, με τη μέθοδο UPGMA με μία τροποποίηση του Phylip 3.5.

Κατασκευάστηκε δενδρόγραμμα μέσω του προγράμματος Popgene 1.31, με τη μέθοδο UPGMA βασισμένο στις γενετικές αποστάσεις κατά Nei 1972 χρησιμοποιώντας μια τροποποίηση του Phylip 3.5. Σαν πρώτη εικόνα από την τοπολογία του δενδρογράμματος καταδεικνύεται η ομαδοποίηση των πληθυσμών του Ιράν μεταξύ τους, ενώ σε σχέση με του υπόλοιπους πληθυσμούς της ανάλυσης φαίνονται να συσχετίζονται περισσότερο με τους πληθυσμούς της Κεντρικής και Δυτικής Μεσογείου παρά με εκείνους της Ανατολικής.

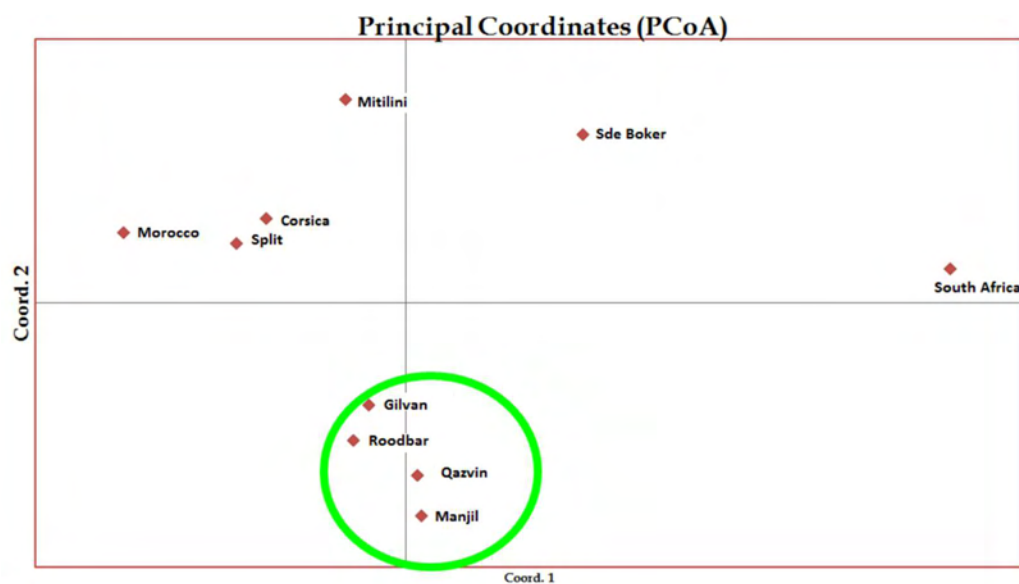
Γεωγραφική περιοχή	Na	Ne	Ho	He	HW
Qazvin	3.87	2.49	0.45	0.5	8/8
Gilvan	3.75	2.29	0.44	0.52	7/8
Roodbar	3.37	2.17	0.44	0.48	6/8
Manjil	3.75	2.29	0.48	0.52	5/8
Mitilini	5.00	2.42	0.51	0.53	7/8
Sde Boker	4.00	2.40	0.55	0.55	8/8
South Africa	6.50	3.13	0.52	0.63	7/8
Morocco	5.20	2.28	0.46	0.48	8/8
Split	4.25	2.28	0.48	0.50	7/8
Corsica	5.25	2.43	0.53	0.52	8/8

Πίνακας 6: Στον παραπάνω πίνακα, που δημιουργήθηκε με το πρόγραμμα Popgene 1.31 (Yeh et al., 1999), αναγράφεται με Na ο αριθμός αλληλομόρφων με Ne: δραστικός αριθμός αλληλομόρφων, ως Ho η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία και ως He η αναμενόμενη ετεροζυγωτία.

pop ID	Qasvin	Gilvan	Roodbar	Manjil	Mitilini	Sde Boker	South Africa	Morocco	Split	Corsica
Qasvin	****	0.9722	0.9643	0.9574	0.9345	0.8844	0.7033	0.9059	0.9396	0.9423
Gilvan	0.0282	****	0.9907	0.9758	0.9354	0.9001	0.7262	0.9194	0.9512	0.9322
Roodbar	0.0363	0.0094	****	0.9826	0.9310	0.8887	0.7201	0.9186	0.9566	0.9274
Manjil	0.0435	0.0245	0.0176	****	0.9143	0.8878	0.7329	0.8910	0.9355	0.8935
Mitilini	0.0677	0.0668	0.0715	0.0895	****	0.9319	0.7160	0.9041	0.9409	0.9595
Sde Boker	0.1229	0.1052	0.1180	0.1190	0.0705	****	0.8101	0.8078	0.8889	0.8706
South Africa	0.3520	0.3199	0.3284	0.3107	0.3341	0.2106	****	0.5715	0.6807	0.6445
Morocco	0.0988	0.0841	0.0849	0.1154	0.1008	0.2134	0.5595	****	0.9522	0.9469
Split	0.0623	0.0500	0.0444	0.0666	0.0609	0.1178	0.3846	0.0490	****	0.9562
Corsica	0.0595	0.0703	0.0754	0.1126	0.0413	0.1385	0.4392	0.0546	0.0448	****

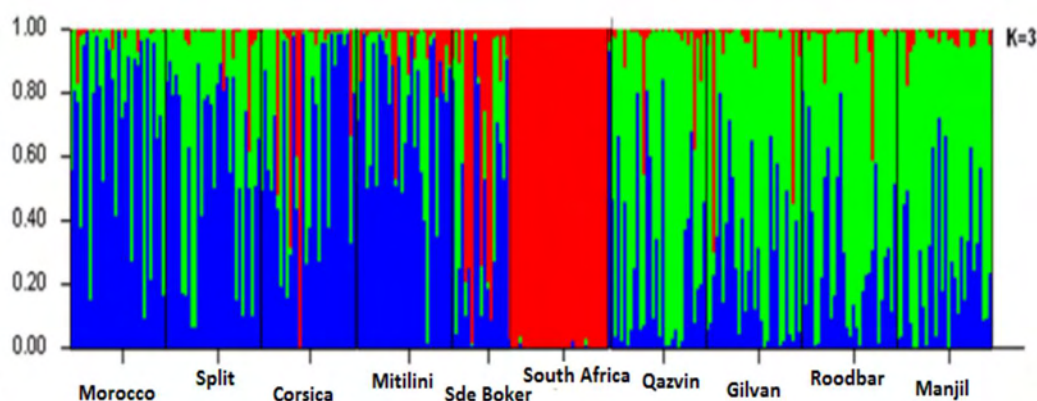
Πίνακας 7: Γενετικές αποστάσεις όπως προκύπτουν από τις διαφορές γονιδιακών συχνοτήτων μέσω του προγράμματος Popgene (Yeh et al., 1999).

Με τη βοήθεια του προγράμματος Popgene φτιάξαμε τον πίνακα γενετικών αποστάσεων με βάση τις διαφορές γονιδιακών συχνοτήτων που φαινόνται στον πίνακα 7, όπου η μεγαλύτερη γενετική απόσταση αποδίδεται μεταξύ Μαρόκο και Νοτίου Αφρικής (0.5595), ενώ η μικρότερη μεταξύ των ιρανικών περιοχών Gilvan και Roodbar (0.0094).



Εικόνα 12: Ανάλυση PCA. Ανάδειξη της ομαδοποίησης των πληθυσμών του Ιράν

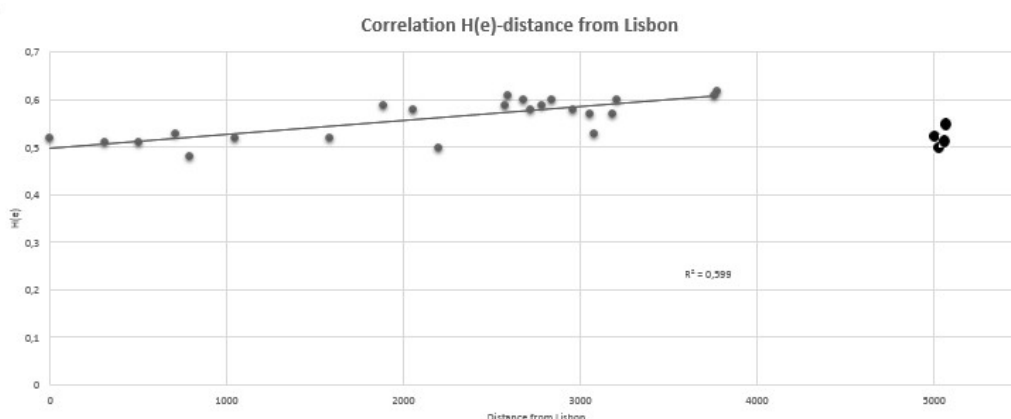
Για περαιτέρω ανάλυση της πληθυσμιακής δομής των πληθυσμών του Ιράν χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση PCA (μέσω του λογισμικού Genealex 6.5, εκτίμηση των PhiPT τιμών). Η συγκεκριμένη ανάλυση καταδεικνύει μια αρκετά σαφή διαφοροποίηση σε τέσσερις ομάδες: μια που περιλαμβάνει τα δείγματα του Ιράν (στην εικόνα περικλείονται στον πράσινο κύκλο), μια άλλη της μεσογειακής λεκάνης (στην εικόνα επάνω αριστερά) και μια άλλη που περιλαμβάνει τα δείγματα του Ισραήλ και της Νοτίου Αφρικής. Αξίζει να σημειωθεί ότι το δείγμα του Ισραήλ τοποθετείται πιο κοντά στα δείγματα της ανατολικής Μεσογείου (Μυτιλήνη).



Εικόνα 13: Ανάλυση STRUCTURE που έγινε εκτίμηση της δομής των πληθυσμών με βάση τη διακύμανση των αλληλομορφικών συχνοτήτων.

Με την ανάλυση STRUCTURE έγινε εκτίμηση της δομής όλων των πληθυσμών με βάση τη διακύμανση των αλληλομορφικών συχνοτήτων. Με βάσει τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν, το πιο πιθανό ιστόγραμμα ήταν αυτό που προέκυπτε για $K=3$. Στο ιστόγραμμα που φαίνεται στην Εικόνα 7, δίνεται η πιθανότητα κάθε ατόμου να ανήκει σε έναν από τους εννιά πληθυσμούς. Στην εικόνα φαίνεται η μεγάλη γενετική διαφοροποίηση των δειγμάτων της Νοτίου Αφρικής και μια μικρότερη του δείγματος του Ισραήλ. Η μεγάλη διαφοροποίηση των δειγμάτων της Νοτίου Αφρικής ήταν αυτή που οδήγησε στην ομαδοποίηση των πληθυσμών σε τρεις ομάδες (clusters). Οι τρεις ομάδες αυτές είναι: η ομάδα των πληθυσμών του Ιραν, η ομάδα που περιλαμβάνει τα δείγματα της Κεντρικής και Ανατολικής Μεσογείου και η ομάδα που περιλαμβάνει τον πληθυσμό της Νοτίου Αφρικής.

Τέλος έγινε σύγκριση της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας (H_e) με την απόσταση των πληθυσμών από τη Λισαβόνα, που είναι το δυτικότερο μέρος της μεσογειακής λεκάνης από την οποία έχουν αναλυθεί πληθυσμοί του δάκου. Για τη συγκεκριμένη ανάλυση χρησιμοποιήθηκαν αποτελέσματα από προηγούμενες αναλύσεις (Augustinos et al., 2005), στα οποία εντάχθηκαν και τα δεδομένα της παρούσας εργασίας.



Εικόνα 14: Συσχέτιση της H_e και της απόστασης από τη Λισαβόνα. Στην παραπάνω εικόνα φαίνεται ο σαφής διαχωρισμός των δειγμάτων του Ιράν σε σχέση με τους πληθυσμούς της μεσογειακής λεκάνης (στο γράφημα δεν έχει ληφθεί υπόψη ο πληθυσμός της Νοτίου Αφρικής και του Ισραήλ). Το R^2 είναι στατιστικά σημαντικό (0.599) καθώς δείχνει τη γραμμική συσχέτιση των πληθυσμών της μεσογειακής λεκάνης και την ομαδοποίηση σε χαμηλότερες τιμές ετεροζυγωτίας των πληθυσμών του Ιραν.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η ανίχνευσή του δάκου της ελιάς σε διάφορες περιοχές του Ιράν τα τελευταία χρόνια δημιουργεί εύλογα ερωτήματα αναφορικά με την προέλευση του εντόμου στις περιοχές αυτές. Η παρούσα εργασία, είχε ως στόχο να διερευνηθεί το ερώτημα αν οι πληθυσμοί του εντόμου στην περιοχή του Ιράν προϋπήρχαν και αυξήθηκαν μετέπειτα σε μέγεθος ή αν αποτελούν προϊόν σχετικά πρόσφατης βιολογικής εισβολής από γειτονικές χώρες.

Οι μικροδορυφορικοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι μέρος των δεικτών που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση φυσικών πληθυσμών δάκου γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου καθώς και για την εισβολή του εντόμου στην Καλιφόρνια. Από τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής φαίνεται ότι στην ανάλυση των φυσικών πληθυσμών δάκου από το Ιράν, οι δείκτες δίνουν εξίσου καλά αποτελέσματα με τις προηγούμενες αναλύσεις (Augustinos et al., 2005, Zygourides et al., 2009, Dogac et al, 2013), γεγονός που ενισχύει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που θα συζητηθούν στη συνέχεια. Για την ανάλυση των αλληλουχημένων προϊόντων PCR χρησιμοποιήθηκε σήμανση των εκκινητών με φθοριοχρώματα για την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση, σε αντιδιαστολή με τις προηγούμενες μελέτες που διενεργήθηκε ανάλυση των ζωνών των αλληλομόρφων σε πηκτώματα πολυακρυλαμιδίου. Επίσης στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PeakScanner για το “σκοράρισμα” των αλληλομόρφων ενώ στις προγενέστερες μελέτες το “σκοράρισμα” γινόταν χειροκίνητα χωρίς τη βοήθεια προγραμμάτων βιοπληροφορικής. Αυτό μας παρείχε πολύ καλύτερη εικόνα διαχωρισμού των αλληλομόρφων υπολογίζοντας με ακρίβεια τα μεγέθη τους.

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

1. Η δομή του δένδρογράμματος UPGMA και οι δείκτες πολυμορφισμού, υποδεικνύουν ένα σαφή διαχωρισμό των δειγμάτων της Νοτίου Αφρικής γεγονός που υποδηλώνει ότι ο πληθυσμός προϋπήρχε στην περιοχή για πολλά χρόνια. Ο διαχωρισμός του πληθυσμού της Νοτίου Αφρικής, είναι αναμενόμενος, δεδομένου ότι η περιοχή φαίνεται να αποτελεί μια από τις πρώιμες περιοχές αποικισμού του εντόμου τα αρχέγονα χρόνια (Nardi et al., 2005; Nardi et al., 2010). Ο πληθυσμός της Νοτίου Αφρικής είναι ο πλέον πολυμορφικός πληθυσμός παρουσιάζοντας μεγάλη γενετική διαφοροποίηση ($H_e=0,63$). Η ανάλυση των δειγμάτων μέσω του προγράμματος Structure έρχεται να επιβεβαιώσει ότι τα δείγματα της Νοτίου Αφρικής αποτελούν μια ανεξάρτητη ομάδα.
2. Τα δείγματα του Ιράν παρουσιάζουν μεγάλη ομοιογένεια μεταξύ τους και ομαδοποιούνται. Οι γενετικές αποστάσεις υπολογίστηκαν με βάση τις διαφορές των γονιδιακών συχνοτήτων και βρέθηκαν αρκετά μικρές (Gilvan-Roodbar 0,0094). Στη δημοσιευμένη εργασία των Zygouridis et al. (2009) παρατηρούμε ότι στον αντίστοιχο πίνακα αποστάσεων, οι γενετικές αποστάσεις μεταξύ των ελληνικών δειγμάτων αλλά και μεταξύ των ελληνικών ιταλικών και τουρκικών δειγμάτων είναι πολύ μικρές, παρόμοιες με αυτές ανάμεσα στα ιρανικά δείγματα. Από την παρατήρηση των γενετικών αποστάσεων αυτών καταλήγουμε στο γεγονός ότι η μικρή γενετική απόσταση μεταξύ των ιρανικών δειγμάτων δικαιολογεί την ομαδοποίηση των πληθυσμών του Ιράν στην παρούσα μελέτη, όπως δικαιολογεί στους Zygouridis et al, την ομαδοποίηση των ιταλικών ελληνικών και τουρκικών δειγμάτων στην ομάδα της Κεντρικής Μεσογείου. Σε σχέση με τους πληθυσμούς που έχουμε στη διάθεσή μας στην παρούσα ανάλυση, οι ιρανικοί πληθυσμοί συσχετίζονται περισσότερο με τους

πληθυσμούς της λεκάνης της Μεσογείου, γεγονός που γίνεται αντιληπτό τόσο από το δένδρογραμμα UPGMA, όσο και από την ανάλυση PCA (μέσω του λογισμικού Genealex 6.5, εκτίμηση των PhiPT τιμών).

Η εμφάνιση χαμηλής ετεροζυγωτίας των πληθυσμών του Ιράν, αποτελεί ισχυρή ένδειξη ότι δεν αποτελούν προϋπάρχοντες πληθυσμούς στη περιοχή, αλλά μάλλον πρόκειται για νέους πληθυσμούς που προέκυψαν από φαινόμενα βιολογικών εισβολών. Οι πληθυσμοί αυτοί “γειτνιάζουν” γενετικά περισσότερο με τους πληθυσμούς της κεντρικής και δυτικής Μεσογείου (Κορσική, Μυτιλήνη) παρά με αυτούς της Ανατολικής (Sde Boker) υποδεικνύοντας ως πιθανή πηγή της εισβολής του δάκου στην περιοχή του Ιράν, τις περιοχές αυτές. Μια περαιτέρω σύγκριση της He (αναμενόμενη ετεροζυγωτία), της Ho (παρατηρούμενη ετεροζυγωτία) και του Na (δραστικός αριθμός αλληλομόρφων) των πληθυσμών του Ιράν με των πληθυσμών του δάκου όπως αναφέρονται στην δημοσιευμένη εργασία των Dogac et al (2013), υπογραμμίζει την πιθανή προέλευση των μυγών του Ιραν. Το συμπέρασμα αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι και οι τρεις παραπάνω παράμετροι είναι ευκρινώς μικρότερες στους ιρανικούς πληθυσμούς σε σχέση με αυτές που παρατηρούνται στα τουρκικά δείγματα. Η Τουρκία λοιπόν ως η πλέον κοντινή ελαιοπαραγωγός περιοχή στο Ιράν, για την οποία έχουμε αποτελέσματα αναλύσεων, είναι θεωρητικά και η πιθανότερη τοποθεσία από την οποία “ξεκίνησαν” ιδρυτικοί πληθυσμοί του είδους για να “εισβάλουν” στην ευρύτερη περιοχή του Ιράν. Η παραπάνω σύγκριση δικαιολογείται από τις παρακάτω δύο παρατηρήσεις: (1) στην μελέτη των Dogac et al (2013) χρησιμοποιήθηκαν 7 από τους δέκα μικροδορυφορικούς δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρούσα ανάλυση, αλλά και για την ανάλυση φυσικών πληθυσμών δάκου γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου καθώς και για την εισβολή του εντόμου στην Καλιφόρνια, και (2) στην συγκεκριμένη δημοσίευση υποστηρίζεται πως οι τουρκικοί πληθυσμοί αποτελούν αποτέλεσμα βιολογικών εισβολών προερχόμενες από το κεντρικο-ανατολικό τμήματος της Μεσογείου (εδώ το ανατολικό τμήμα ορίστηκε ως οι πληθυσμοί της Ιταλίας και του Αιγαίου). Η προέλευση του δάκου του Ιράν μπορεί λοιπόν να αποδοθεί (με τις όποιες επιφυλάξεις που δημιουργεί η έλλειψη περαιτέρω αναλύσεων) με την παρακάτω γραμμική διάταξη: Ιταλία-Αιγαίο, Τουρκία, Ιράν.

3. Από το γράφημα της αναμενόμενης ετεροζυγωτίας σε συνάρτηση με την απόσταση των πληθυσμών από τη Λισαβόνα (δυτικότερο άκρο της Μεσογείου) λαμβάνουμε ακόμα μια ένδειξη για το ότι ο πληθυσμός του Ιραν είναι νέος στην περιοχή. Εάν ο πληθυσμός προϋπήρχε στην περιοχή τότε θα έπρεπε η He να αυξάνεται καθώς κινούμαστε προς το θεωρητικό κέντρο εξάπλωσης του είδους (σημείο διασταύρωσης Μέσης Ανατολής με Νότια και κεντρική Ασία). Αντίθετα η He μειώνεται, ενώ οι πληθυσμοί του Ιράν ομαδοποιούνται εκτός της γραμμής συνάρτησης. Στηριζόμενοι και στα προηγούμενα αποτελέσματα όλα τα δεδομένα συγκλίνουν στο ότι οι πληθυσμοί αυτοί δεν είναι αρχέγονοι.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που σχολιάστηκαν παραπάνω, οι πληθυσμοί του Ιράν ομαδοποιούνται μεταξύ τους ενώ σε σχέση με του υπόλοιπους πληθυσμούς της ανάλυσης φαίνονται να συσχετίζονται με τους πληθυσμούς της κεντρικής και δυτικής Μεσογείου. Πιθανόν να είναι μια ένδειξη για εισβολή του δάκου στο Ιράν από την Τουρκία, μια μεγάλη ελαιοπαραγωγό χώρα. Για την εξακρίβωση την θεωρίας αυτής είναι απαραίτητη η ανάλυση περισσότερων μικροδορυφορικών δεικτών, η ανάλυση δειγμάτων από την Τουρκία και τις γειτονικές προς το Ιράν χώρες (π.χ. Συρία) και η ενσωμάτωση τους στις προηγούμενες μελέτες για την ανάλυση πληθυσμών γύρω από τη Μεσόγειο (Augustinos et al., 2005) .

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Microsatellite results-Peak Scanner

	Boms31	Boms21	Boms10	Boms25	Boms18	Boms29	Boms30	Boms22	Boms2	Boms61
Qasvin1	159159	177189	000000	000000	000000	000000	000000	210210	000000	186190
Q2	169169	177177	000000	000000	164164	000000	138138	210210	124124	186186
Q3	159159	177179	161173	167171	166166	120120	138138	210210	126126	186186
Q4	177177	177179	157173	167167	164164	000000	136138	210210	122124	186190
Q5	169169	177189	157163	167169	166166	120120	138138	210210	122124	190190
Q6	159177	177179	157173	167169	162166	120120	136138	199209	124124	190190
Q7	159159	177189	173173	167169	162162	000000	138138	210210	122122	190190
Q8	169169	177177	163173	167167	160162	120120	136152	210210	122124	190190
Q9	169169	177179	173173	169171	166166	000000	138138	210210	122126	186186
Q10	169177	000000	157171	167171	164166	118120	138138	210210	122124	186186
Q11	159169	177183	169173	167171	166166	118118	138138	000000	126126	000000
Q12	159159	179189	157157	169169	166166	000000	138138	000000	126126	000000
Q13	177177	179183	171173	165169	000000	120120	136138	000000	122124	186186
Q14	169169	179179	173173	167171	162166	000000	136136	210210	124124	186190
Q15	159159	177177	163171	167167	166166	120120	136136	210210	124124	186190
Q16	169169	177177	173173	167171	162164	120120	136138	210210	122122	186190
Q17	159169	177179	157173	169169	166166	120120	138138	210210	122124	190190
Q18	159159	177189	157157	167171	162162	120120	136136	210210	124124	186190
Q19	159159	177177	171173	169171	000000	118118	136136	209210	122122	186190
Q20	159177	177189	157157	167171	162166	000000	136154	209210	124126	186190
Q21	169177	179189	000000	167171	164166	120120	138138	209210	122124	186190
Q22	169169	177177	157171	167167	162164	118120	136138	210210	124124	186186
Q23	169169	177189	160173	165171	162162	120120	138138	209210	122124	186190
Q24	159159	177189	000000	000000	164166	000000	138158	210210	000000	186186
Q25	177177	177179	163173	165171	000000	000000	000000	210210	126126	186190
Q26	169177	177183	163173	165171	160166	120120	152152	210210	124126	186186
Q27	159169	177177	169171	167169	000000	118120	136150	210210	000000	186190
Q28	169169	177177	000000	000000	000000	000000	136136	210210	124126	000000
Q29	159169	000000	000000	000000	000000	000000	136150	210210	124126	186190
Q30	159169	177187	169173	000000	000000	120120	136138	210210	000000	186190
Gilvan1	169177	177177	000000	167167	162162	120120	000000	000000	126128	190190
G2	159169	177177	157157	167167	000000	000000	136138	210210	124124	186186
G3	000000	177177	000000	169169	000000	000000	138138	000000	124126	190190
G4	159177	181183	171173	171171	000000	120120	138138	210210	124126	186186
G5	169177	177177	173173	165169	166166	120120	138138	210210	124126	186190
G6	169169	177179	171173	167171	000000	000000	138138	210210	124128	000000
G7	169177	177179	173173	167167	162166	120120	138138	210210	126128	186190
G8	159177	177189	157171	169171	160166	120120	138138	210210	124124	186190
G9	159159	177189	173173	169171	164166	000000	138138	210210	124126	190190
G10	159159	177189	173173	167167	162162	120120	138152	210210	124126	186186
G11	159177	177177	157157	167171	162162	120120	136152	210210	126126	186190
G12	159159	177177	171173	169171	166166	118120	138138	210210	126126	186190
G13	169169	177179	157171	167169	000000	118120	138154	210210	124128	186186
G14	169177	179189	157171	169169	000000	120120	136138	210212	124126	186186
G15	159177	177183	157173	167169	162166	120120	138138	210210	124126	186186
G16	177177	177189	171173	167169	162164	120120	138138	210212	124126	190190
G17	159169	177177	173173	165171	000000	120120	138138	210210	126128	186186
G18	159177	183189	171171	167171	164164	120120	136152	000000	124126	186190
G19	169169	177189	171173	167171	162164	120120	138138	199210	124124	186190
G20	159177	177189	157157	167167	162164	000000	136138	210210	124126	190190
G21	169177	177177	171173	167169	162166	120120	154154	210210	124126	186190
G22	169177	177177	157157	167177	162166	120120	136158	210210	124126	186186
G23	000000	177179	157171	169171	162166	120120	152154	210210	124126	186186
G24	169169	177179	171173	167167	166166	118118	136136	199199	124124	186186
G25	159169	177177	157173	167171	162164	120120	136138	210210	124124	186190
G26	159159	177189	173173	169169	162162	120120	136138	210210	126138	186190
G27	159169	177189	171173	167167	162162	120120	136138	210210	124126	186190
G28	169169	177179	171173	167167	162166	111118	136138	210210	124126	186190
G29	159159	177179	171173	167167	164166	114120	136138	210210	000000	186190
G30	163169	177179	157171	165167	162162	120120	136138	210210	124124	186186
Roodbar1	159177	177189	157171	167169	166166	120120	138138	210210	124126	186186
R2	169177	177189	000000	167167	162164	120120	138138	210210	124126	186186
R3	169177	177177	157173	167169	166166	000000	138138	000000	124126	186190
R4	159177	177189	000000	169171	000000	000000	136136	000000	124126	186186

R5	169169	177189	157173	171171	162162	120120	136138	210210	124126	190190
R6	159169	177179	171173	167171	162162	118120	138138	210210	126126	186190
R7	159169	177179	163171	167167	160162	120120	136138	210210	126126	186186
R8	000000	177181	000000	167169	000000	000000	138138	000000	124128	186186
R9	159159	177189	157173	167169	162162	112120	138138	210210	126126	186190
R10	159159	177189	173173	167167	162162	000000	000000	210210	126126	190190
R11	159177	177179	157173	167169	162164	120120	136136	210210	000000	186186
R12	000000	177177	000000	167171	166166	120120	000000	210210	124126	000000
R13	169177	177179	171173	167169	166166	120120	136138	210210	126126	186186
R14	169169	177189	157173	167169	162166	120120	000000	210210	124126	186190
R15	159159	183189	157169	167171	162164	120120	136138	210210	126126	186190
R16	177177	177189	157157	167171	162162	120120	136138	210210	126126	190190
R17	159159	177189	171173	167169	162166	118120	136138	210210	124128	186190
R18	169177	177189	171171	167167	162162	120120	138138	210210	124126	186190
R19	159159	177177	157171	167169	162164	118120	136138	210212	126126	186186
R20	177177	177183	157157	171171	162166	120120	138138	210210	124126	190190
R21	159159	177179	173173	165167	162166	120120	136136	210210	124126	186186
R22	169169	177177	163173	165169	162164	120120	138138	210210	126126	186190
R23	169177	177177	000000	167169	000000	000000	138138	210210	124124	190190
R24	169177	177189	173173	169169	162162	120120	136138	210210	124124	186186
R25	159169	177179	173173	167167	162164	118120	136152	210210	124126	190190
R26	169177	189189	157173	165167	162162	120120	138154	210210	126126	186190
R27	159169	177179	157171	167167	162164	112120	136138	210210	126126	186186
R28	159177	177189	173173	167167	160162	120120	136138	210210	124126	190190
R29	159159	177181	157173	171171	162166	120120	136138	210210	124126	186190
R30	159159	177177	000000	167169	160162	120120	000000	210210	126126	186190
Manjill	159177	177177	157171	167167	162162	120120	136136	210210	124128	186190
MA2	169169	177189	157157	167171	162166	120120	136138	210210	124126	186190
MA3	159159	177177	157171	167171	160160	120120	138138	210210	124126	186186
MA4	169177	183189	000000	167169	000000	000000	138138	210210	124124	186190
MA5	169169	177189	157171	167169	162162	120120	138138	210210	124126	186190
MA6	159159	177177	171173	165167	162164	118118	136138	210210	126126	186190
MA7	159159	177179	157157	171171	164164	120120	136136	210212	124126	186190
MA8	159177	177189	000000	167171	000000	000000	136158	210210	124128	186186
MA9	159159	177189	000000	169171	162164	000000	136136	210210	124126	186186
MA10	159177	177189	171173	171171	162164	118118	136138	210210	124126	186190
MA11	159177	177189	171173	167169	162164	000000	138138	210210	126126	186190
MA12	177177	187189	000000	167169	000000	000000	136138	210210	124126	186190
MA13	159159	177189	157173	167171	162162	120120	000000	210210	126126	190190
MA14	159159	177189	157157	169169	164166	120120	136138	198210	124126	190190
MA15	159177	177189	157163	169171	162164	120120	136138	210210	126128	186190
MA16	159169	177181	000000	167169	000000	000000	152152	210210	124126	186190
MA17	000000	177179	157171	167169	162164	118118	136136	210210	126126	186186
MA18	159159	177183	171173	167171	162162	114120	138138	210210	124126	186190
MA19	159169	177189	157157	167169	166166	118120	138138	210210	124124	186190
MA20	169169	177189	000000	167167	000000	000000	136138	210210	126126	186190
MA21	169177	177189	173173	167169	162164	120120	136154	210210	124124	186190
MA22	169169	177189	157171	167171	162166	120120	138154	210210	124124	186186
MA23	159159	177189	157171	169171	162166	120120	138138	210210	124126	186190
MA24	159177	177177	000000	167169	000000	000000	138138	210210	126128	186190
MA25	169179	000000	157173	167169	162162	120120	138138	210210	124126	186190
MA26	159169	177189	157157	169169	162164	120120	138152	210210	124126	186190
MA27	159169	177177	173173	167171	166166	120120	138138	210210	126126	186190
MA28	159159	000000	157173	000000	162166	118120	136138	000000	124126	186190
MA29	159169	177183	157157	171171	164166	120120	138154	210210	124126	190190
MA30	177177	000000	169173	167167	162162	000000	136138	210210	124124	186190
Mitilini1	159177	177177	157173	169171	160166	120120	136138	210210	124128	186190
MI2	159177	179189	171171	157167	166168	120120	138138	210210	124124	186190
MI3	177177	189189	157173	169169	166166	112112	136138	210210	124126	186190
MI4	159169	179189	173173	171171	162166	116120	138138	210210	124124	190190
MI5	169177	177177	173173	165169	160160	120120	136136	210210	124126	190190
MI6	177177	177183	157173	169169	161164	112120	136152	210210	124124	186190
MI7	169177	177183	157173	167169	164166	120120	138138	210210	126128	186190
MI8	177177	183189	157173	169169	162166	112112	136138	210210	000000	186186
MI9	177177	183189	157173	169169	166166	120120	138152	210210	124128	186190
MI10	159169	179189	163173	169171	166168	120120	138138	210210	124126	190190
MI11	177177	177181	173173	169171	162166	120120	138138	210210	124124	186190
MI12	171177	177181	171171	157169	166166	120120	138146	210210	124124	186186
MI13	159177	177177	169171	167169	162166	112120	108108	210210	124126	186186

MI14	177177	177189	171175	167171	160164	120120	000000	210210	124126	186186
MI15	159169	177177	173173	167167	160166	120120	136138	000000	124126	186190
MI16	159177	177179	157173	169169	160164	120120	136138	210210	122124	190190
MI17	167177	189189	157173	169171	160162	112120	138138	210210	124124	186190
MI18	159177	177177	171173	163167	160166	120120	138152	210210	124126	186186
MI19	159169	177177	169171	167169	164166	112120	136136	210210	124126	186190
MI20	171177	177179	157173	169169	162166	120120	138152	210210	126126	186190
MI21	159169	177189	173173	169169	164166	120120	136136	210210	124128	190190
MI22	177177	177179	157173	167167	162166	120120	138138	210210	124126	186190
MI23	159169	187189	171173	171171	162162	110118	136138	210210	000000	186186
MI24	159169	177183	171175	167169	160166	120120	138138	210210	124124	186190
MI25	159169	177189	157173	169169	166166	112120	136138	210210	126128	186186
MI26	169177	179181	163169	169169	162164	120120	136138	210210	000000	190190
MI27	159169	179189	171173	157167	162168	112120	138152	210210	124130	190190
MI28	169177	189189	167173	157169	166166	120120	138138	210210	124126	186190
MI29	169177	177177	157173	145169	166166	114120	136136	210210	116126	190190
MI30	169177	000000	157173	167169	166166	112120	138138	200210	124128	186190
SdeBoker11	169177	183177	157173	169169	166160	120116	138136	000000	126126	190190
12	177159	189179	157173	167167	162162	120120	138136	000000	128128	190190
13	169159	183179	171173	167165	164162	120116	138136	000000	126124	186186
14	177159	183189	171173	169171	166164	120120	136152	210210	126124	190186
15	169159	177181	171171	169171	166166	118114	138136	210214	126124	190190
16	167177	183179	171171	169167	166166	120116	138138	210210	126126	190186
17	169169	177187	171171	169169	160162	120120	138128	210210	124124	190190
18	169159	183183	173173	169169	166160	120116	138138	210210	124124	190186
19	177159	179179	171157	169157	166162	120116	138136	210210	126124	190186
20	169177	177189	171171	167171	164162	116116	138138	210210	124124	186186
21	177177	183179	171173	169167	164162	116114	138136	210210	126126	190186
22	177159	183181	171171	167157	166166	120118	138138	210210	000000	190190
23	159159	177191	171171	169169	160160	116114	138138	210214	124124	190190
24	000000	189179	157173	169169	166162	120118	138136	210210	126124	000000
25	159159	183189	157173	169167	166160	000000	138138	210210	126124	190190
26	177159	183179	171171	167167	166166	120120	138136	210198	126124	190186
27	177159	177177	171173	169167	160162	000000	138136	210210	126126	190186
28	169159	183179	171173	169169	166168	120120	138144	210210	126124	190190
29	169169	189179	171173	171157	160160	120116	138138	210198	126124	190190
30	177159	179179	171173	169167	166166	120112	138138	210210	126126	190190
South Africa1	171167	000000	171157	167165	162162	120120	138138	000000	126124	190190
2	169153	000000	171171	169169	160160	118118	138138	000000	128124	190190
3	171171	000000	157169	167167	166162	114114	138126	198212	126126	190190
4	169159	000000	171163	169167	160162	118112	138138	210210	126126	190190
5	171172	000000	171169	169169	164162	112112	138138	210210	124124	190190
6	171171	000000	157163	169157	166157	118118	138138	210198	124124	190190
7	169177	000000	169163	169167	160162	114110	138126	198198	128124	190186
8	000000	000000	171169	169167	160162	118118	138126	210210	126122	186186
9	171169	000000	169169	169165	162168	118118	138130	210212	126124	190190
10	171171	000000	169173	171157	162162	112110	138136	210210	126124	190190
11	171171	000000	171171	165165	162157	120126	138136	210210	126126	190190
12	171169	000000	171171	165157	166162	116116	138138	210200	126124	186186
13	171169	000000	157169	169165	162162	120111	138138	208226	126124	190186
14	171169	000000	157169	165157	166166	120118	138138	210210	126126	190190
15	171169	000000	171171	169159	000000	118118	138138	198210	126124	190186
16	167169	000000	169167	167167	164162	118118	138128	210210	126126	190190
17	171171	000000	169169	000000	164162	000000	138138	212212	124124	190186
18	167169	000000	157157	169165	164162	120110	138138	200210	126124	190186
19	169159	000000	157169	169167	160162	118118	138128	206210	126126	190186
20	171177	000000	169169	000000	162154	000000	000000	000000	126124	186186
21	167167	000000	171167	169165	166162	000000	138138	210210	126126	190190
22	167169	000000	171167	000000	162161	120118	138136	210218	126126	190190
23	171171	000000	157169	169169	166157	118108	138128	198198	128125	190190
24	171177	000000	171171	167167	166164	120110	138138	210210	126124	190186
25	172177	000000	171169	169163	164162	112112	138138	210210	124124	190190
26	171169	000000	171171	167167	160168	000000	138138	210198	126124	190190
27	171169	000000	171171	000000	166162	116116	138138	210210	126124	186186
28	171169	000000	171169	167165	162162	112112	138138	208208	124120	190190
29	171169	000000	157169	167163	160162	116116	138138	208208	126124	190190
30	171171	000000	171169	167159	166164	116116	138138	210212	126124	190190
31	171169	000000	171163	163163	162162	116112	138138	210216	126124	190186
32	171177	000000	167161	165165	164162	116116	138138	210210	126126	190186

33	171171	000000	171169	167165	162162	118112	138138	200200	126124	190190
34	169177	000000	169169	163159	154154	118118	138138	210210	126126	000000
Morocco1	159159	000000	157169	169167	162162	120120	138152	210214	124124	186186
2	159159	000000	173173	169167	166162	120122	136136	210210	126124	186186
3	169159	000000	169169	169169	166160	120120	138138	210210	000000	186186
4	171177	000000	157173	167171	164162	120120	138138	210210	124124	186186
5	169177	000000	169161	169167	000000	120116	136152	210210	000000	186186
6	169177	000000	173173	169167	166157	120120	138152	000000	128124	186186
7	177159	000000	157173	167171	160162	120120	136136	210210	126124	190186
8	169177	000000	169173	169159	166162	120120	136136	210210	126124	186186
9	159175	000000	157173	169169	162168	120120	152154	210210	126128	186186
10	169159	000000	171173	169169	160162	000000	138152	210210	128124	186186
11	177159	000000	173173	169167	166162	000000	136136	210210	126126	190186
12	159159	000000	173173	169169	166166	120116	138136	000000	124124	186186
13	169159	000000	173161	169167	166162	120120	138152	000000	124124	186186
14	177153	000000	157173	169169	160162	000000	138154	000000	126124	186186
15	177159	000000	173173	167167	160164	120120	138136	000000	124124	186186
16	177159	000000	173161	169169	166164	120120	138138	210210	124124	186186
17	000000	000000	157173	169169	166164	120120	138136	210210	126126	186186
18	159159	000000	171173	171159	166162	120116	138138	210210	124124	186186
19	177159	000000	173173	169169	160162	120120	154140	210210	124124	190186
20	169159	000000	173173	169167	164162	120120	136154	210210	124124	190186
21	169177	000000	173173	169167	166166	120120	138138	210210	126126	186186
22	169169	000000	169173	169169	164162	116112	152148	210210	124124	186186
23	169177	000000	173173	169169	166166	120120	138138	210210	124124	186186
24	159159	000000	173173	167171	164162	120120	138136	210210	126124	186186
25	159159	000000	173173	169169	164168	120120	138154	210210	126124	186186
26	159159	000000	157173	167167	166162	118121	138136	210214	124124	186186
27	159159	000000	173173	169167	162168	120120	138136	210208	126124	186186
28	177159	000000	173173	167167	162157	120120	136136	210210	128124	186186
29	159159	000000	157173	169167	166164	120120	138152	210210	124124	186186
30	169159	000000	173173	169167	166162	120120	136152	212212	126124	190186
Split1	159159	000000	173173	169169	160162	120120	138154	210210	000000	000000
2	159159	000000	173173	169169	164157	120120	138154	210210	000000	000000
3	167159	000000	171173	171171	000000	120122	136148	210210	000000	000000
4	159159	000000	173173	169169	160162	120120	138154	210210	000000	186186
5	167159	000000	157173	167167	166162	120120	136148	210210	000000	186186
6	169169	000000	157173	169167	166162	120120	136136	210210	000000	190186
7	169169	000000	173173	169167	000000	120118	138138	210210	000000	190186
8	159159	000000	173163	159159	166162	120118	138136	210210	000000	186186
9	169159	000000	157173	169171	164162	120120	138136	210210	000000	190190
10	169159	000000	173173	169167	164162	120118	138138	210210	000000	190186
11	177159	000000	173173	169169	166164	120120	138154	210210	000000	190186
12	169169	000000	157173	169169	160162	120120	136136	210210	000000	190186
13	169159	000000	173173	167167	000000	120120	148132	210210	000000	190190
14	167159	000000	171157	167167	166166	120120	136148	210210	000000	186186
15	169159	000000	157173	167167	160162	120122	138132	210210	000000	190186
16	169169	000000	157173	169169	160162	120120	138136	210210	000000	190186
17	159159	000000	173173	169169	160162	120120	138154	210210	000000	190186
18	177159	000000	173173	169169	160164	120120	138138	210210	000000	186186
19	159159	000000	171173	169169	166168	112112	138136	200214	000000	190186
20	159159	000000	173173	169169	000000	120120	138138	210210	000000	190186
21	169177	000000	157173	169169	000000	120120	136136	210210	000000	190186
22	169177	000000	173163	169167	166166	114112	138136	210210	000000	190186
23	169159	000000	157173	169167	164162	120120	138138	000000	000000	190186
24	169169	000000	157173	169169	160162	120120	138136	210210	000000	190186
25	169159	000000	173173	167167	164162	120120	138138	210210	000000	190186
26	177159	000000	173173	169169	164162	120120	138138	210210	000000	186186
27	171177	000000	171173	167159	166162	120120	138138	210210	000000	190186
28	169159	000000	171157	167167	160162	120120	000000	210210	000000	190190
29	169177	000000	000000	169167	000000	120120	000000	000000	000000	190186
30	169159	000000	173173	167171	000000	120112	000000	000000	000000	190186
Corsica1	169169	000000	169173	000000	160164	120120	136152	210210	000000	190186
2	169177	000000	173173	000000	166166	120120	136148	000000	000000	000000
3	171159	000000	173173	171171	166162	120120	136152	210210	000000	186186
4	169159	000000	171173	167167	166166	120120	136152	210210	000000	190186
5	169159	000000	173173	169167	164162	120112	136152	210210	000000	186186
6	169177	000000	000000	169169	166162	120108	138138	210210	000000	190186

7	159159	000000	173173	169171	164162	120121	138136	210210	000000	190186
8	159157	000000	173173	171157	166165	120120	138136	210210	000000	190186
9	000000	000000	157173	000000	164164	000000	000000	000000	000000	000000
10	171177	000000	157173	169157	166164	120118	138138	210210	000000	190186
11	177159	000000	173173	169167	160168	120120	138138	210214	000000	190186
12	169159	000000	000000	000000	166166	118112	000000	210210	000000	000000
13	171169	000000	173167	000000	162162	120118	138136	210198	000000	190190
14	177159	000000	173161	171157	166162	120112	138136	210210	000000	190190
15	177159	000000	173173	167175	164162	120120	136136	210210	000000	186186
16	169159	000000	000000	000000	000000	120120	138136	210210	000000	186186
17	169177	000000	173173	169167	166160	120114	136154	210210	000000	190186
18	171177	000000	173173	000000	000000	120120	138138	210210	000000	000000
19	169159	000000	173173	169167	164162	120120	138138	210210	000000	190186
20	169177	000000	173173	169169	166160	120120	138138	210210	000000	186186
21	169177	000000	161175	167163	166162	112122	138138	210210	000000	186186
22	177159	000000	173173	000000	166166	118118	138152	210210	000000	190186
23	169159	000000	173173	169157	166166	120120	138136	210210	000000	190190
24	177159	000000	173173	167159	166164	112112	136136	210210	000000	190186
25	177159	000000	173173	167163	166166	120120	138152	210198	000000	186186
26	177159	000000	157173	169157	166166	120120	138136	210210	000000	190186
27	177159	000000	173175	169171	166162	120120	138136	210210	000000	186186
28	177159	000000	173175	169167	166166	120120	138138	210210	000000	186186
29	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000	000000
30	177177	000000	173173	169167	166164	120120	138138	210210	000000	190186

Μήτρα Popgene 10x8

Locus name:

D86 D38 D71 D64 D84 D85 D68 BoAT6

Name =	Qazvin	Name =	Gilvan
ID =	1	ID =	2
CC	GG AB	FJ .. FF EE HH .. .	BB
FF FF ..	GG FG AA	CF BB FF	FG GG AA
CC DI FH HH HH	GG FG AA GG	GG .. BB
JJ BI FF FF ..	FG FG AB	CJ HI HH .. HH	GG GG AA
FF BE FG HH HH	GG GG BB	FJ II EG HH HH	GG GG AB
CJ BI FG EH HH	FG BF BB	FF HI FH	GG GG ..
CC II FG EE ..	GG FG BB	FJ II FF EH HH	GG GG AB
FF EI FF CE HH	FM GG BB	CJ BH GH CH HH	GG GG AB
FF II GH HH ..	GG GG AA	CC II GH FH ..	GG GG BB
FJ BH FH FH GH	GG GG AA	CC II FF EE HH	GM GG AA
CF GI FH HH GG	GG	CJ BB FH EE HH	FM GG AB
CC BB GG HH ..	GG	CC HI GH HH GH	GG GG AB
JJ HI EG .. HH	FG .. AA	FF BH FG .. GH	GN GG AA
FF II FH EH ..	FF GG AB	FJ BH GG .. HH	FG GH AA
CC EH FF HH HH	FF GG AB	CJ BI FG EH HH	GG GG AA
FF II FH EF HH	FG GG AB	JJ HI FG EF HH	GG GH BB
CF BI GG HH HH	GG GG BB	CF II EH .. HH	GG GG AA
CC BB FH EE HH	FF GG AB	CJ HH FH FF HH	FM .. AB
CC HI GH .. GG	FF FG AB	FF HI FH EF HH	GG BG AB
CJ BB FH EH ..	FN FG AB	CJ BB FF EF ..	FG GG BB
FJ .. FH FH HH	GG FG AB	FJ HI FG EH HH	NN GG AB
FF BH FF EF GH	FG GG AA	FJ BB FJ EH HH	FO GG AA
FF CI EH EE HH	GG FG AB	.. BH GH EH HH	MN GG AA
CC FH ..	GO GG AA	FF HI FF HH GG	FF BB AA
JJ EI EH	GG AB	CF BI FH EF HH	FG GG AB
FJ EI EH CH HH	MM GG AA	CC II GG EE HH	FG GG AB
CF GH FG .. GH	FL GG AB	CF HI FF EE HH	FG GG AB
FF	FF GG ..	FF HI FF EH CG	FG GG AB
CF	FL GG AB	CC HI FF FH EH	FG GG AB
CF GI HH	FG GG AB	DF BH EF EE HH	FG GG AA
Name =	Roodbar	Name =	Manjil
ID =	3	ID =	4
CJ BH FG HH HH	GG GG AA	CJ BH FF EE HH	FF GG AB
FJ .. FF EF HH	GG GG AA	FF BB FH EH HH	FG GG AB
FJ BI FG HH ..	GG .. AB	CC BH FH CC HH	GG GG AA
CJ .. GH	FF .. AA	FJ .. FG	GG GG AB
FF BI HH EE HH	FG GG BB	FF BH FG EE HH	GG GG AB
CF HI FH EE GH	GG GG AB	CC HI EF EF GG	FG GG AB
CF EH FF CE HH	FG GG AA	CC BB HH FF HH	FF GH AB
.. .. FG	GG .. AA	CJ .. FH	FO GG AA
CC BI FG EE DH	GG GG AB	CC .. GH EF ..	FF GG AA
CC II FF EE ..	GG BB	CJ HI HH EF GG	FG GG AB
CJ BI FG EF HH	FF GG AA	CJ HI FG EF ..	GG GG AB
.. .. FH HH HH	.. GG ..	JJ .. FG	FG GG AB
FJ HI FG HH HH	FG GG AA	CC BI FH EE HH	.. GG BB
FF BI FG EH HH	.. GG AB	CC BB GG FH HH	FG AG BB
CC BG FH EF HH	FG GG AB	CJ BE GH EF HH	FG GG AB
JJ BB FH EE HH	FG GG BB	CF .. FG	MM GG AB
CC HI FG EH GH	FG GG AB	.. BH FG EF GG	FF GG AA
FJ HH FF EE HH	GG GG AB	CC HI FH EE EH	GG GG AB
CC BH FG EF GH	FG GH AA	CF BB FG HH GH	GG GG AB
JJ BB HH EH HH	GG GG BB	FF .. FF	FG GG AB
CC II EF EH HH	FF GG AA	FJ II FG EF HH	FN GG AB
FF EI EG EF HH	GG GG AB	FF BH FH EH HH	GN GG AA
FJ .. FG	GG GG BB	CC BH GH EH HH	GG GG AB
FJ II GG EE HH	FG GG AA	CJ .. FG	GG GG AB
CF II FF EF GH	FM GG BB	FK BI FG EE HH	GG GG AB
FJ BI EF EE HH	GN GG AB	CF BB GG EF HH	GM GG AB
CF BH FF EF DH	FG GG AA	CF II FH HH HH	GG GG AB
CJ II FF CE HH	FG GG BB	CC BI .. EH GH	FG .. AB
CC BI HH EH HH	FG GG AB	CF BB HH FH HH	GN GG BB
CC .. FG CE HH	.. GG AB	JJ GI FF EE ..	FG GG AB

Name = Mitilini
 ID = 5
 CJ BI GH CH HH FG GG AB
 CJ HH BF HI HH GG GG AB
 JJ BI GG HH DD FG GG AB
 CF II HH EH FH GG GG BB
 FJ II EG CC HH FF GG BB
 JJ BI GG DF DH FM GG AB
 FJ BI FG FH HH GG GG AB
 JJ BI GG EH DD FG GG AA
 JJ BI GG HH HH GM GG AB
 CF EI GH HI HH GG GG BB
 JJ II GH EH HH GG GG AB
 JJ HH BG HH HH GJ GG AA
 CJ GH FG EH DH AA GG AA
 JJ HJ FH CF HH .. GG AA
 CF II FF CH HH FG .. AB
 CJ BI GG CF HH FG GG BB
 EJ BI GH CE DH GG GG AB
 CJ HI DF CH HH GM GG AA
 CF GH FG FH DH FF GG AB
 GJ BI GG EH HH GM GG AB
 CF II GG FH HH FF GG BB
 JJ BI FF EH HH GG GG AB
 CF HI HH EE BG FG GG AA
 CF HJ FG CH HH GG GG AB
 CF BI GG HH DH FG GG AA
 FJ EG GG EF HH FG GG BB
 CF HI BF EI DH GM GG BB
 FJ FI BG HH HH GG GG AB
 FJ BI AG HH EH FF GG BB
 FJ BI FG HH DH GG CG AB

Name = Sde Boker
 ID = 6
 FJ BI GG CH FH FG .. BB
 CJ BI FF EE HH FG .. BB
 CF HI EF EF FH FG .. AA
 CJ HI GH FH HH FM GG AB
 CF HH GH HH EG FG GI BB
 EJ HH FG HH FH GG GG AB
 FF HH GG CE HH CG GG BB
 CF II GG CH FH GG GG AB
 CJ BH BG EH FH FG GG AB
 FJ HH FH EF FF GG GG AA
 JJ HI FG EF EF FG GG AB
 CJ HH BF HH GH GG GG BB
 CC HH GG CC EF GG GI BB
 .. BI GG EH GH FG GG ..
 CC BI FG CH .. GG GG BB
 CJ HH FF HH HH FG AG AB
 CJ HI FG CE .. FG GG AB
 CF HI GG HI HH GI GG BB
 FF HI BH CC FH GG AG BB
 CJ HI FG HH DH GG GG BB

Name = South Africa
 ID = 7
 EG BH EF EE HH GG .. BB
 AF HH GG CC GG GG .. BB
 GG BG FF EH EE BG AH BB
 CF EH FG CE DG GG GG BB
 GH GH GG EF DD GG GG BB
 GG BE BG BH GG GG AG BB
 FJ EG FG CE BE BG AA AB
 .. GH FG CE GG BG GG AA
 FG GG EG EI GG DG GH BB
 GG GI BH EE BD FG GG BB
 GG HH EE BE HK FG GG BB
 FG HH BE EH FF GG CG AA
 FG BG EG EE CH GG EK AB
 FG BG BE HH GH GG GG BB
 FG HH CG .. GG GG AG AB
 EF FG FF EF GG CG GG BB
 GG GG .. EF .. GG HH AB
 EF BB EG EF BH GG CG AB
 CF BG FG CE GG CG DG AB
 GJ GG .. AE AA
 EE FH EG EH .. GG GG BB
 EF FH .. DE GH FG GJ BB
 GG BG GG BH AG CG AA BB
 GJ HH FF FH BH GG GG AB
 HJ GH DG EF DD GG GG BB
 FG HH FF CI .. GG AG BB
 FG HH .. EH FF GG GG AA
 FG GH EF EE DD GG EE BB
 FG BG DF CE FF GG EE BB
 GG GH CF FH FF GG GH BB

Name = Morocco
 ID = 8
 CC BG FG EE HH GM GI AA
 CC II FG EH HJ FF GG AA
 CF GG GG CH HH GG GG AA
 GJ BI FH EF HH GG GG AA
 FJ DG FG .. FH FM GG AA
 FJ II BG BH HH GM .. AA
 CJ BI FH CE HH FF GG AB
 FJ GI CG EH HH FF GG AA
 CI BI GG EI HH MN GG AA
 CF HI GG CE .. GM GG AA
 CJ II FG EH .. FF GG AB
 CC II GG HH FH FG .. AA
 CF DI FG EH HH GM .. AA
 AJ BI GG CE .. GN .. AA
 CJ II FF CF HH FG .. AA
 CJ DI GG AH HH GG GG AA
 .. BI GG FH HH FG GG AA
 CC HI CH EH FH GG GG AA
 CJ II GG CE HH HN GG AB
 CF II FG EF HH FN GG AB
 FJ II FG HH HH GG GG AA
 FF GI GG EF DF KM GG AA
 FJ II GG HH HH GG GG AA
 CC II FH EF HH FG GG AA
 CC II GG FI HH GN GG AA
 CC BI FF EH GI FG GI AA
 CC II FG EI HH FG EG AA
 CJ II FF BE HH FF GG AA
 CC AB FG FH HH GM GG AA
 CF II FG EH HH FM HH AB

Name =	Split	Name =	Corsica
ID =	9	ID =	10
CC II GG CE HH GN GG ..		FF GI .. CF HH FM GG AB	
CC II GG BF HH GN GG ..		FJ II .. HH HH FK	
CE HI HH .. HJ FK GG ..		CG II HH EH HH FM GG AA	
CC II GG CE HH GN GG AA		CF HI FF HH HH FM GG AB	
CE BI FF EH HH FK GG AA		CF II FG EF DH FM GG AA	
FF BI FG EH HH FF GG AB		FJ .. GG EH AH GG GG AB	
FF II FG .. GH GG GG AB		CC II GH EF HI FG GG AB	
CC EI CC EH GH FG GG AA		BC II BH GH HH FG GG AB	
CF BI GH EF HH FG GG BB		.. BI .. FF	
CF II FG EF GH GG GG AB		GJ BI BG FH GH GG GG AB	
CJ II GG FH HH GN GG AB		CJ II FG CI HH GG GI AB	
FF BI GG CE HH FF GG AB		CF HH DG .. GG ..	
CF II FF .. HH EK GG BB		FG FI .. EE GH FG AG BB	
CE BH FF HH HH FK GG AA		CJ DI BH EH DH FG GG BB	
CF BI FF CE HJ EG GG AB		CJ II FI EF HH FF GG AA	
FF BI GG CE HH FG GG AB		CF HH FG GG AA	
CC II GG CE HH GN GG AB		FJ II FG CH EH FN GG AB	
CJ II GG CF HH GG GG AA		GJ II HH GG GG ..	
CC HI GG HI DD FG CI AB		CF II FG EF HH GG GG AB	
CC II GG .. HH GG GG AB		FJ II GG CH HH GG GG AA	
FJ BI GG .. HH FF GG AB		FJ DJ DF EH DJ GG GG AA	
FJ EI FG HH DE FG GG AB		CJ II .. HH GG GM GG AB	
CF BI FG EF HH GG .. AB		CF II BG HH HH FG GG BB	
FF BI GG CE HH FG GG AB		CJ II CF FH DD FF GG AB	
CF II FF EF HH GG GG AB		CJ II DF HH HH GM AG AA	
CJ II GG EF HH GG GG AA		CJ BI BG HH HH FG GG AB	
GJ HI CF EH HH GG GG AB		CJ IJ GH EH HH FG GG AA	
CF BH FF CE HH .. GG BB		CJ IJ FG HH HH GG GG AA	
FJ .. FG .. HH AB		
CF II FH .. DH AB		JJ II FG FH HH GG GG AB	

6.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Amos W., Rubinstzein D.C., (1996). “Microsatellites are subject to directional evolution”. *Nat Genet.* 1996 Jan 12(1):13-4.

Augustinos. A.A., Mamuris, Z., Stratikopoulos, E.E., D’Amelio, S., Zacharopoulou, A., Mathiopoulos K.D., (2005). “Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species”. *Genetica* 125: 231–241.

Augustinos, A.A., E.E. Stratikopoulos A., Zacharopoulou & Mathiopoulos K.D., 2002. “Polymorphic microsatellite markers in the olive fly, *Bactrocera oleae*”. *Mol. Ecol. Notes* 2: 278–280.

Αυγουστίνος Α. (2005), “Απομόνωση μικροδορυφόρων από το δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*, και χρησιμοποίησή τους για την ανάλυση φυσικών πληθυσμών του είδους”, Πάτρα (Διδακτορική διατριβή).

Bonizzoni M., Katsoyannos B.I., Marguerie R., Guglielmino C.R., Gasperi G., Malacrida A.R. and Chapman T., (2002). “Microsatellite analysis reveals remating by wild Mediterranean fruit fly females, *Ceratitis capitata*”. *Molecular Ecology* 11: 1915-1921.

Caracristi G. and Schlotterer C., (2003). “Genetic differentiation between American and European *Drosophila melanogaster* populations could be attributed to admixture of African alleles”. *Mol. Biol. Evol.*, 20(5): 792-799.

Carlton, J.T., (1987). “Patterns of transoceanic marine biological invasions in the Pacific Ocean”. *Bull. Mar. Sci.* 41:452–465.

Dallas F., (1992). “Estimation of microsatellite mutation rates in recombinant inbred strains of mouse”. *Mammalian Genome*, Volume 3, Issue 8, pp 452-456

Dogac E, Kandemir I, Taskin V., (2013). “The Genetic Polymorphisms and Colonization Process of Olive Fly Populations in Turkey”. *PLoS ONE* 8(2): e56067. doi:10.1371/journal.pone.0056067

Economopoulos A.P., (1979) *IOBC/WPRS Bulletin*. 2/1: 42-49.

Edwards A., Civitello A., Hammond H.A. and Caskey C.T., (1991). “DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric repeat units”. *Am. J. Hum. Genet.*, 49: 746-756.

Eisen J.A., (1999). “Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites: Evolution and Applications*”. Goldstein DB and Schlotterer C edition, pp. 34–48. Oxford University Press, Oxford.

Ewell, J.J., D.J., O’Dowd, J., Bergelson, C.C., Daehler, C.M., D’Antonio, L.D., Gomez, D.R., Gordon, R.J., Hobbs, A., Holt, K.R., Hopper, C.E., Hughes, M., LaHart, R.R.B., Leakey, W.G., Wong, L.L., Loope, D.H., Lorence, S.M., Louda, A.E., Lugo, P.B., McEvoy, D.M., Richardson, P.M., Vitousek., (1999). “Deliberate introductions of species: Research needs - Benefits can be reaped, but risks are high”. *BioScience* 49 (8): 619–630.

Estoup A., Scholl A., Pouvreau A. and Solignac M., (1995). “Monoandry and polyandry in bumble bees (Hymenoptera: *Bombinae*) as evidenced by highly variable microsatellites”. *Molecular Ecology*, 4: 89-93.

Felsenstein J., (1994). “PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6”.

Gáspári Z., Ortutay C., Tóth G., (2007). “Divergent microsatellite evolution in the human and chimpanzee lineages”. *FEBS Letters* 581(13): 2523-2526.

Goldstein D.B., Linares A.R., Cavalli-Sforza L.L. and Feldman M.W., (1995). “An evaluation of genetic distance for use with microsatellite loci”. *Genetics*, 139: 463-471.

- Goulielmos, G.N., Cosmidis, N., Theodorakopoulou, M.E., Loukas, M., Zouros, E., (2003). "Tracing the history of an enzyme polymorphism: The case of alcohol dehydrogenase -2 (Adh - 2) of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*". *Mol. Biol. Evol.* 20 (3): 293–306.
- Hartl, D.L., Clark, A.G., (1997). "Principles of population genetics". Sinauer Assoc. Sunderland.
- Holland, B.S., (2000). "Genetics of marine bioinvasions". *Hydrobiologia* 420:63–71.
- Katsoyannos, P., (1992). "Olive Pests and their Control in the Near East". FAO Plant Production and Protection Paper No 115. FAO: Rome.
- Kimura. M., Crow J.F., (1969). Natural selection and gene substitution. *Genet. Res.* 13: 127-141.
- Kimura M., Ohta T., (1978). "Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population". *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 75(6): 2868–2872.
- Kowarik, I., (2003). "Human agency in biological invasions: secondary release foster naturalisation and population expansion of alien plant species". *Biol. Invasions* 5:293–312.
- Matocq M.D., (2004). "Reproductive success and effective population size in woodrats (*Neotoma macrotis*)". *Molecular Ecology*, 13: 1635-1642.
- Mazomenos, B.E., (1989). "Dacus oleae. In: Robinson AS, Hooper G (eds). *World Crop Pests*". Vol. 3B, Elsevier: Amsterdam. pp 169–177.
- Miura, O., (2007). "Molecular genetic approaches to elucidate the ecological and evolutionary issues associated with biological invasions". *Ecol. Res.* 22: 876–883.
- Moore M.K. and Ball R.M., (2002). "Multiple paternity in loggerhead turtle (*Caretta caretta*) nests on Melbourne beach, Florida: a microsatellite analysis". *Molecular Ecology*, 11: 281-288.
- Morris, D.B., (1993). "The isolation and characterization of microsatellites from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)". M.Sc. thesis, Dalhousie University, Halifax, NS.
- Nardi, F., Carapelli, A., Dallai, R., Roderick, G.K. & Frati, F. 2005, "Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae)". *Molecular Ecology*, vol. 14, no. 9, pp. 2729-2738.
- Nardi F, Carapelli A, Boore JL, Roderick GK, Dallai R, Frati F (2005). Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: Comparative dating using complete mitochondrial genomes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 678-686.
- Nardi F, Carapelli A, Boore JL, Roderick GK, Dallai R, et al. (2010). "Domestication of olive fly through a multi-regional host shift to cultivated olives: Comparative dating using complete mitochondrial genomes". *Mol Phylogenet Evol* 57: 678–686
- Nei M., Maruyama T., Chakraborty R., (1975). "The bottleneck effect and genetic variability in populations". *Evolution* 29:1–10.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly P., 2000, "Inference of population structure using multilocus genotype data", *Genetics*, vol. 155, no. 2, pp. 945-959.
- Prota R., (1979) *IOBC/WPRS Bulletin*. 2/1: 5-15.
- Richardson B.J., Baverstock P.R., and Adams M., (1986). "Allozyme Electrophoresis. A handbook for animal systematics and population studies". Academic Press, New York, NY.

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

Saiki R.K., Gelfand D.H, Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B. and Erlich H.A., (1988). Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science **239**: 487-491

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

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

Strand, M., Prolla T.A., Lismyand R. M., Petes T.D., (1993). "Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair". Nature 365: 274-276.

Suresh B., Mudunuri, Hampapathalu A., Nagarajaram, (2007). "IMEx: Imperfect Microsatellite Extractor. Bioinformatics". Vol. 23 no. 10, pages 1181–1187

Tilman, D. (2004). "Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: A stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly". Proceedings of the National Academy of Sciences 101 (30): 10854–10861.

Waldick R.C., Kraus S., Brown M. and White B.N., (2002). "Evaluating the effects of historic bottleneck events: an assesment of microsatellite variability in the endangered, North Atlantic right whale". Molecular Ecology, 11: 2241-2249.

Weisburg W.G., Barns S.M., Pelletier D.A., Lane D.J., (January 1991). "16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study". J Bacteriol. 173 (2): 697–703.

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

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

Διαδουκτιακές πηγές:

1.http://agrinfo.nagref-cha.gr/index.php/index.php?option=com_content&view=article&Itemid=2&id=58:dakos-elias

2.<http://www.iranicaonline.org/articles/olive-tree>

3.http://nemertes.lis.upatras.gr/jspui/bitstream/10889/1123/1/Nimertis_Oikonomou%28b%29.pdf