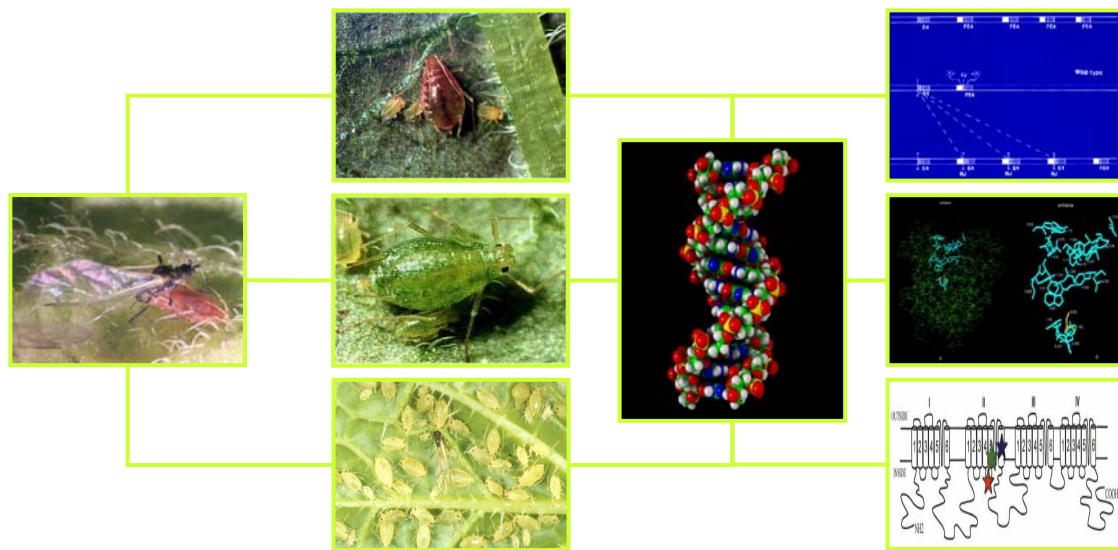


ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Διατμηματικό Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών μεταξύ του
Τμήματος Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής & Αγροτικού
Περιβάλλοντος και του Τμήματος Γεωπονίας Ζωικής Παραγωγής &
Υδάτινου Περιβάλλοντος

Αικατερίνη Α. Μαρίτσα

Μελέτη της γενετικής δομής του *Myzus persicae* (Sulzer)
(Hemiptera: Aphididae)



Νέα Ιωνία Μαγνησίας 2006

**Μελέτη της γενετικής δομής του *Myzus persicae* (Sulzer)
(Hemiptera: Aphididae)**

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Ι. Α Τσιτσιπής (Επιβλέπων) Καθηγητής Εντομολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	Ζ. Μαμούρης (Μέλος) Αναπληρωτής Καθηγητής Γενετικής πληθυσμών Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας	Κ. Μαθιόπουλος (Μέλος) Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
---	---	---

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1-2
ABSTRACT	3-4
A. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1. ΑΦΙΔΕΣ – ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ	5
1.1 Αφίδες	5-9
1.2 Βιολογικός κύκλος των αφίδων	9-15
2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	16
2.1 Γενικά	16-23
2.1.1 Μετάλλαξη	23-24
2.1.2 Μετανάστευση	24
2.1.3 Επιλογή	24-26
2.1.4 Ορισμένα παραδείγματα	26-28
3. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	29
3.1 Γενικά	29
3.1.1 Παρούσα κατάσταση	29-30
3.1.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας	30-31
3.1.3 Διασταυρούμενη και πολλαπλή ανθεκτικότητα	31-32
3.1.4 Πώς αναπτύσσεται η ανθεκτικότητα	32-33
3.1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας	33
3.1.6 Μέθοδοι ελέγχου ανθεκτικότητας	34-35
3.1.7 Ανθεκτικότητα και αφίδες	36-37
3.2 Ανθεκτικότητα και <i>Myzus persicae</i>	37
3.2.1 Αποτοξίκωση εντομοκτόνων από εστεράσες	37
3.2.2 Ενίσχυση των γονιδίων των εστερασών	38-39
3.2.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας που δρουν στο στόχο δράσης των εντομοκτόνων	39-42
4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ENTOMA	43
4.1 Γενικά	43-45
4.1.1 Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR)	45-48

4.2 Μέθοδοι	49
4.2.1 Αλλοένζυμα	49
4.2.2 Τυχαίο ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (Random Amplified Polymorphic DNA, RAPD)	49-51
4.2.3 Πολυμορφισμός μεγέθους περιοριστικών τμημάτων DNA (Random Fragment Length Polymorphism, RFLP)	51-52
4.2.4 Πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων τμημάτων (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)	52-55
4.2.5 Μοριακοί δείκτες βασισμένοι σε απλές επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες (SSR) και απλές σε σειρά επαναλήψεις (Sort Tandem Repeats, STR)	55-56
4.2.6 Κλωνοποιημένες αλληλουχίες ως δείκτες (STS, EST, SSCP, SNP, ASOH, DASH)	56-57
4.3 Πλεονεκτήματα - μειονεκτήματα μεθόδων	57
5. ΜΙΚΡΟΔΟΥΡΥΦΟΡΟΙ (MICROSATELLITES)	58
5.1 Γενικά	58-63
5.2 Μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τις μεταλλάξεις των μικροδορυφόρων	63
5.2.1 «Γλίστρημα» της πολυμεράσης	63-64
5.2.2 Άνιση διασταύρωση κατά τη διάρκεια της μείωσης	64
5.2.3 Μοντέλο βηματικής μετάλλαξης (Stepwise Mutation Model, SMM)	64
5.2.4 Μοντέλο των αλληλομόρφων «Κ»	65
5.2.5 Μοντέλο απεριόριστων αλληλομόρφων (Infinite Alleles Model, IAM)	65
5.3 Οι μικροδορυφόροι ως γενετικό εργαλείο	65-68
5.4 Πλεονεκτήματα	68
5.5 Μειονεκτήματα	69
5.5.1. Πρακτικά προβλήματα	69-70
5.5.2 Προβλήματα στην εξαγωγή αποτελεσμάτων	70-73
5.5.3 Προβλήματα στην ανάλυση	73-74
6. <i>MYZUS PERSICAE</i> (SULZER)	75-80
7. ΣΚΟΠΙΟΣ	81

B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	82-84
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	85
2.1 Δειγματοληψίες αφίδων	85
2.2 Έλεγχος βιολογικού κύκλου	85-88
2.3 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA	88-91
2.3.1 Στατιστική ανάλυση	92-93
2.4 Βιοχημική μέθοδος εκτίμησης ενζυματικής δράσης ολικής εστεράσης	93-94
2.5 Συχνότητα εμφάνισης γενοτύπων FE4 και E4	94-97
2.6 Ανίχνευση γενοτύπων kdr	97-98
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	99
3.1 Βιολογικός κύκλος	99-101
3.2 Μικροδορυφορική ανάλυση	101-107
3.3 Ολική δραστηριότητα εστερασών	108-109
3.4 Καθορισμός της ανθεκτικότητας kdr	109-110
3.5 Εμφάνιση των γονιδίων FE4 και E4	110-111
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	112
4.1. Κατηγορία βιολογικού κύκλου	112
4.2 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA	113-115
4.3 Ανθεκτικοί γενότυποι σε οργανοφωσφωρικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα	115-117
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	118-134
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	135-142

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Στη παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, μελετάται η βιολογία, η γενετική δομή καθώς και οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας σε εντομοκτόνα πληθυσμών της αφίδας *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae).

Η διατριβή αποτελείται από δυο μέρη. Στο γενικό μέρος δίνονται πληροφορίες για το βιολογικό κύκλο των αφίδων και συγκεκριμένα για το *Myzus persicae*. Ακολουθεί μια αναφορά εξελικτικών φαινομένων και παραγόντων που μπορεί να επηρεάσουν τη γενετική παραλλακτικότητα του είδους, κάτι που βοηθάει στην κατανόηση των αποτελεσμάτων. Ακόμη, παρατίθενται και σχολιάζονται απόψεις ερευνητών που έχουν ασχοληθεί με παρόμοια θέματα ανά τον κόσμο. Στο ειδικό μέρος, περιγράφονται οι πειραματικές εργασίες που πραγματοποιήθηκαν στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, γίνεται ανάλυση των αποτελεσμάτων, εξάγονται συμπεράσματα και γίνεται συζήτηση για την περαιτέρω μελλοντική έρευνα που μπορεί να γίνει.

Ευχαριστίες

Στην πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής βοήθησαν άνθρωποι τόσο από τον ακαδημαϊκό χώρο όσο και έξω από αυτόν, τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω για τη πολύτιμη βοήθεια και την αμέριστη συμπαράστασή τους.

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

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής, τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής Πληθυσμών του Τμήματος Βιοτεχνολογίας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ζήση Μαμούρη και τον Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Κωνσταντίνο Μαθιόπουλο, για τις πολύτιμες διορθώσεις και συμβουλές τους, όσον αφορά τη συγγραφή της παρούσας διατριβής καθώς και για τη συμβολή τους στην απόκτηση βασικών γνώσεων σε θέματα Γενετικής και Μοριακής Βιολογίας. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Γενετικής πληθυσμών Ζήση Μαμούρη για την άδειά του να χρησιμοποιήσω τον εξοπλισμό του εργαστηρίου του, στα αρχικά στάδια της διατριβής.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στο Διδάκτορα του Εργαστηρίου Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Ιωάννη Μαργαριτόπουλο για την πολύτιμη βοήθεια και τις συζητήσεις που είχαμε πάνω στο θέμα της διατριβής αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας. Συνέβαλε τόσο στην επιστημονική μου κατάρτιση όσο και στην απόκτηση γνώσεων που συνδέονται με τη πολυδιάστατη επιστήμη της Εντομολογίας. Ακόμη θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την ανεκτίμητη συμβολή του στη συγγραφή της διατριβής καθώς και για τη σημαντική του βοήθεια στη στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Ευχαριστίες εκφράζονται στον υποψήφιο Διδάκτορα του Εργαστηρίου Εντομολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Κωνσταντίνο Ζάρπα για την βοήθειά

του στη κατανόηση τεχνικών και οργάνων που αφορούσαν κυρίως τη μελέτη του βιολογικού κύκλου του *Myzus persicae*. Για τη βοήθεια στο πειραματικό μέρος της διατριβής ευχαριστώ ιδιαίτερα, τη προπτυχιακή φοιτήτρια Μαρία Καλλέργη.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον υποψήφιο Διδάκτορα του τμήματος Βιοτεχνολογίας και Βιοχημείας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Κωνσταντίνο Σταμάτη, για την πολύτιμη βοήθειά του στο αρχικό στάδιο του πειραματικού μέρους της μεταπτυχιακής διατριβής καθώς και για τη βοήθειά του στη κατανόηση των μεθοδολογιών που χρησιμοποιήθηκαν.

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

Αικατερίνη Μαρίτσα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

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

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

Συγκεκριμένα, εξετάστηκε η στρατηγική αναπαραγωγής 199 κλωνικών σειρών της αφίδας από καπνό και ροδακινιά από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και από μια περιοχή στη Νότια Αφρική (Ζιμπάμπουε). Με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών (myz2, myz25, M35) αναλύθηκαν 137 κλωνικές σειρές από τις παραπάνω περιοχές καθώς και από τη Σερβία. Επίσης, με τη χρήση μοριακών και βιοχημικών μεθόδων εξετάστηκαν 193 και 221 κλωνικές σειρές για την ύπαρξη μηχανισμών ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα, αντίστοιχα.

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

Η γενετική ανάλυση με το μικροδορυφορικό DNA έδειξε σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ 7 πληθυσμών που εξετάστηκαν. Συγκεκριμένα, οι δυο

πληθυσμοί από τη Σερβία και ο ένας από τη Ζιμπάμπουε διαχωρίστηκαν από αυτούς που συλλέχθηκαν στην Ελλάδα. Βρέθηκαν ενδείξεις διαφοροποίησης μεταξύ πληθυσμών που συλλέχθηκαν από περιοχές που καλλιεργείται και από αυτές που δεν καλλιεργείται καπνός. Επίσης, διαπιστώθηκε πρόσφατη δημιουργία γενοτύπων που έχουν χάσει μερικώς (ενδιάμεσοι, ανδροκυκλικοί) ή ολικώς την ικανότητα σεξουαλικής αναπαραγωγής (ανολοκυκλικοί).

Διαπιστώθηκε ευρεία εξάπλωση του μηχανισμού (υπερπαραγωγή εστερασών) που προσδίδει ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα όπως και στη μετάλλαξη της διόδου νατρίου που προσδίδει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή (kdr ανθεκτικότητα). Ωστόσο, ο πρώτος μηχανισμός εμφανίσθηκε σε μικρότερη συχνότητα στον πληθυσμό από τη Ζιμπάμπουε από ότι σε αυτούς από τα Βαλκάνια. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγεί μερικώς τη γενετική διαφοροποίηση του πληθυσμού αυτού από τους υπόλοιπους. Ενδιαφέρον έχει το γεγονός ότι η kdr ανθεκτικότητα βρέθηκε και στις τρεις χώρες, ενώ προγενέστερες αναφορές αφορούσαν μόνο τη Δυτική Ευρώπη. Επίσης, φαίνεται ότι υπάρχει μια γενετική αλλαγή στους πληθυσμούς της Ελλάδας όσον αφορά τα γονίδια των εστερασών FE4 και E4. Αντίθετα σε προγενέστερες μελέτες πιο συχνά εμφανίζονταν γενότυποι με το γονίδιο E4.

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

ABSTRACT

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

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

In particular, the mode of reproduction was examined in 199 *M. persicae* clones collected from peach and tobacco in different regions of Greece (north, central, eastern central) and in one region of South Africa (Zimbabwe). One hundred thirty seven clones were analysed using three microsatellite loci (*myz2*, *myz25*, *M35*). The clones we used three specific primers in 137 clones were collected from the aforementioned regions and also from two localities from Serbia. The presence of resistance mechanisms in organophosphates and pyrethroids insecticides, we was examined in 193 and 221 clones, respectively using molecular and biochemical methods.

Most of the clonal lineages (77 - 82 %) from peach were holocyclic (i.e., they have a sexual phase in autumn). A high percentage (57,4 %) of holocyclic lineages was observed in the population from tobacco in North Greece, which is the main peach-growing region of Greece. By contrast, low percentage of holocyclic clones was observed in Central and South Greece and in Zimbabwe (0 –13 %). In Greece the geographical distribution of holocyclic genotypes was parallel to that of the green coloured clonal lineages.

Microsatellite DNA analysis revealed important genetic differentiation among the 7 populations of *M. persicae* examined. According to F_{ST} and phylogenetic tree analysis the two populations from Serbia and one from Zimbabwe were separated from those collected in Greece. Important differentiation was also observed among populations from tobacco- and non-tobacco-growing regions. The analysis also denotes a recent loss of sexuality (totally or partially) in the non-holocyclic clones examined. The mechanisms that involve overproduction of carboxylesterases and a mutation in sodium channel (kdr resistance), which confer resistance to organophosphates and pyrethroids, respectively, were found to be wide spread among the populations examined. However the first mechanism was observed less frequently in the population from Zimbabwe than in those from Greece and Serbia. This may partially explain the genetic differentiation of the population from Zimbabwe revealed by the microsatellite DNA analysis. The fact that the kdr mechanism has been found in all three countries in addition to the previous reports from western Europe, suggests a possible world wide spread of this mechanism. Furthermore, there seems to be a genetic drift in Greek populations regarding the esterase genes FE4 and E4. In previous studies genotypes with E4 gene were very common. By contrast in the present study the most frequent genotypes were those with FE4 gene.

In summary, the present study revealed significant interspecific genetic variation in *M. persicae*. This variation could be partially attributed to differences in several biological characteristics among populations such as the mode of reproduction, adaptation in specific hosts, and evolution of different insecticide resistance mechanisms.

Α. ΤΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

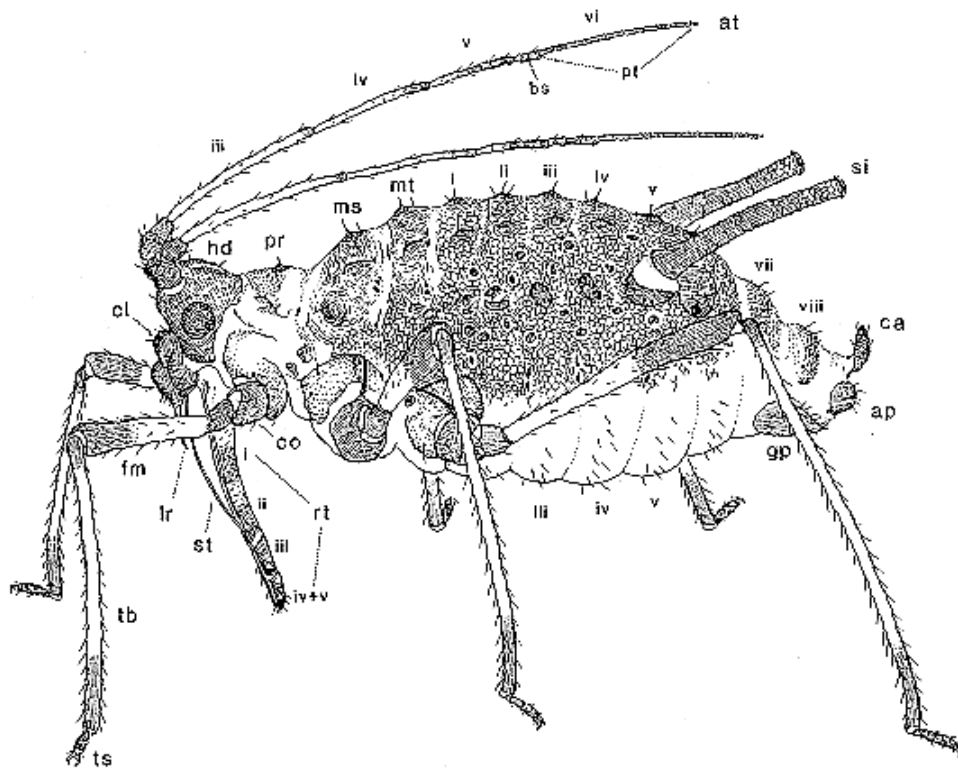
1. ΑΦΙΔΕΣ – ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

1.1 Αφίδες

Οι αφίδες είναι έντομα που εμφανίζονται συχνά σε πολλές καλλιέργειες και είναι γνωστά με τα κοινά ονόματα μελίγκρα, ψύλλοι και ψείρες. Ανήκουν στην υπεροικογένεια Aphidoidea στη σειρά Sternorrhyncha της τάξης Hemiptera, στην οποία έχουν περιγραφεί περίπου 4000 είδη.

Για τη συστηματική κατάταξη των αφίδων έχουν προταθεί δύο συστήματα ταξινόμησης. Ο Heie (1980) κατατάσσει τις αφίδες σε δυο υπεροικογένειες: Phylloxeroidea και Aphidoidea. Στην πρώτη τοποθετεί τις οικογένειες Adelgidae, Phylloxeridae και στη δεύτερη τις: Mindaridae, Hormaphididae, Phloeomyzidae, Thelaxidae, Anoecilidae, Pemphigidae, Drepanosiphidae, Greenideidae, Aphididae και Lachnidae. Οι Remaudière & Stroyan (1984) ταξινομούν τις αφίδες σε μια υπεροικογένεια, την Aphidoidea, στην οποία τοποθετούν τρεις οικογένειες: Adelgidae, Phylloxeridae και Aphididae. Στην οικογένεια Aphididae εντάσσονται 20 υποοικογένειες: Pemphiginae, Mindarinae, Hormaphidinae, Tamaliinae, Neophyllaphidinae, Phloeomyzinae, Lizeriinae, Greenideinae, Anoecilinae, Thelaxinae, Phyllaphidinae, Saltusaphidinae, Macropodaphidinae, Drepanosiphinae, Israelaphidinae, Chaitophorinae, Lachninae, Pterocommatinae, Parachaitophorinae και Aphidinae. Ορισμένοι συγγραφείς ακολουθούν την ταξινόμηση των Remaudière και Stroyan, όπως οι Blackman & Eastop (2000), και άλλοι (Ilharco & Van Harten 1987) αυτή του Heie.

Οι αφίδες είναι έντομα μικρού μεγέθους με μαλακό σώμα, γενικό σχήμα ωοειδές και μήκος 1-10 mm. Τα κυριότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τις αφίδες από τα άλλα έντομα είναι: (1) Η βάση του ρύγχους βρίσκεται μεταξύ και εμπρός από τα ισχία του πρώτου ζεύγους ποδιών (2) Η κεραία αποτελείται από δύο βασικά άρθρα (σκάπος και ποδίσκος) και το σχετικά λεπτό μαστίγιο, που συνήθως έχει τέσσερα άρθρα. Το τελευταίο άρθρο της κεραίας αποτελείται από το βασικό τμήμα, και την τελική απόληξη (3) Κάτω από κάθε σύνθετο οφθαλμό υπάρχει ένας οπτικός λοβός με τρία οματίδια (τριοματίδιο) (4) Ο ταρσός αποτελείται από 2 άρθρα (5) Οι πτέρυγες έχουν μόνο ένα χαρακτηριστικό επίμηκες νεύρο (6) Στη ραχιαία πλευρά του πέμπτου κοιλιακού άρθρου υπάρχει ένα ζεύγος από σιφώνια ή



Σχήμα 1. Πλευρική όψη άπτερου παρθενογενετικού θηλυκού του *Macromyzus woodwardiae* (Takahashii). ap: εδρική πλάκα, at: κεραία, bs: βασικό τμήμα του τελευταίου άρθρου της κεραίας, ca: ουρίτσα, cl: επιστόμιο co: ισχύον, fm: μηρός, gr: γενετική πλάκα, hd: κεφαλή, lr: άνω χείλος ms: μεσοθώρακας, mt: μεταθώρακας, pr: προθώρακας, pt: τελικό τμήμα του τελευταίου άρθρου της κεραίας, rt: ρύγχος, si: σιφώνια, st: στιλέτα, tb: κνήμη, ts: ταρσός . Οι Λατινικοί αριθμοί υποδηλώνουν τον αριθμό του άρθρου (τροποποιημένο από Miyazaki 1987).

κεράτια (τα σιφώνια είναι εκφορητικοί αγωγοί αδένων που παράγουν φερομόνες συναγεμμού) (Dixon 1998). Μια γενικευμένη μορφή αφίδας φαίνεται στο Σχήμα 1.

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

Η κυκλική παρθενογένεση και η εναλλαγή ξενιστού (ετεροουικία) είναι τα πλέον σημαντικά γνωρίσματα της εξέλιξης του βιολογικού κύκλου των αφίδων, που τις επιτρέπουν να εκμεταλλεύονται τους διαθέσιμους πόρους, ιδιαίτερα τους ποώδεις ξενιστές με μικρή διάρκεια ζωής, όπως είναι οι περισσότερες καλλιέργειες. Η ικανότητα αυτή φαίνεται ότι είναι περισσότερο αναπτυγμένη στις αφίδες από ότι στα άλλα έντομα (Blackman & Eastop 2000). Η κυκλική παρθενογένεση (cyclical parthenogenesis) χαρακτηρίζεται από την εναλλαγή της φάσης της σεξουαλικής αναπαραγωγής με τη φάση, όπου τα έντομα αναπαράγονται παρθενογενετικά. Στα είδη με εναλλαγή ξενιστών (host alternation), εμφανίζεται εποχική μετανάστευση μεταξύ δύο φυτών ξενιστών, του πρωτεύοντα ξενιστή (δένδρο ή θάμνος), όπου λαμβάνει χώρα η σεξουαλική αναπαραγωγή και του δευτερεύοντα (ποώδης, θαμνώδης), όπου τα έντομα αναπαράγονται παρθενογενετικά για ορισμένο αριθμό γενεών. Η μετανάστευση δεν έχει σχέση με μετακινήσεις που λαμβάνουν χώρα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες σε διάφορους δευτερεύοντες ξενιστές και αφορούν στην εξάπλωση πληθυσμών του είδους λόγω της αύξησης του αριθμού τους. Ορισμένα είδη αφίδων (μονούικα) δεν εμφανίζουν εναλλαγή ξενιστών και συμπληρώνουν το βιολογικό τους κύκλο σε ένα μόνο ξενιστή (δενδρώδη, θαμνώδη, ποώδη). Η εναλλαγή ξενιστού εμφανίζεται σε μέλη τεσσάρων (Aphididae, Anoeciidae, Hormaphididae και Pemphigidae) από τις 10 οικογένειες των Aphidoidea (Eastop 1977). Ωστόσο, ακόμη και στο ίδιο γένος, κάποια είδη είναι ετερόουικα και άλλα αυτόουικα και περιστασιακά η ίδια παραλλακτικότητα εμφανίζεται μέσα στο ίδιο το είδος (Shaposhnikov 1981). Ορισμένοι γενότυποι, σε διάφορα είδη, έχουν χάσει πλήρως ή μερικώς την ικανότητα σεξουαλικής αναπαραγωγής. Οι πρώτοι αναπαράγονται όλο το έτος παρθενογενετικά ενώ οι δεύτεροι παράγουν κυρίως παρθενογενετικές μορφές αλλά και αριθμό αρσενικών ή και λίγων έμφυλων θηλυκών.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό γνώρισμα της βιολογίας των αφίδων είναι η ωοτοκία και η ζωοτοκία. Στις οικογένειες Adelgidae και Phylloxeridae τόσο τα σεξουαλικά όσο και τα παρθενογενετικά θηλυκά εναποθέτουν ωά. Αντίθετα, στην οικογένεια Aphididae τα έμφυλα θηλυκά είναι ωοτόκα και τα παρθενογενετικά ζωοτόκα. Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα ορισμένων ειδών αφίδων είναι η σχέση συμβίωσης με είδη μυρμηγκιών, τα οποία τις προστατεύουν από τα αρπακτικά (Banks 1962), αλλά όχι σε όλες τις περιπτώσεις από τα παράσιτα (Barlett 1961, Burns 1973). Η συμβιωτική σχέση εξαρτάται τόσο από το είδος των αφίδων όσο και από το είδος των μυρμηγκιών. Συνήθως παρατηρείται όταν οι πληθυσμοί των αφίδων είναι σχετικά

μικροί (Addicott 1978, 1979). Σε ορισμένες περιπτώσεις η παραπάνω σχέση ευνοεί και το φυτό ξενιστή, καθώς τα μυρμήγκια απομακρύνουν άλλα φυτοφάγα έντομα, που προξενούν στο φυτό πολύ μεγαλύτερες ζημιές (Laine & Niemelä 1980). Σημαντική είναι και η συνεισφορά των αφίδων στη ροή της ενέργειας σε φυσικά οικοσύστημα, τόσο γιατί παράγουν μεγάλες ποσότητες μελιτώματος που προσφέρει θρεπτικά στοιχεία σε μύκητες ή σε ζωικούς οργανισμούς, όσο και γιατί μια πληθώρα οργανισμών τρέφεται από αυτές (Price 1984). Έχει βρεθεί ότι από την ενέργεια που καταναλώνει το είδος *Eucallipterus tiliae* L. (Hemiptera: Aphididae), μόνο το 5% χρησιμοποιείται από το ίδιο (πρωτογενής παραγωγή) ενώ το 90% περιέχεται στα μελιτώδη απεκκρίματα που χρησιμοποιούνται από άλλους οργανισμούς (Liewellyn 1972). Επίσης, σε ορισμένες περιπτώσεις προκαλούν αύξηση της σύνθεσης οργανικών ενώσεων στο φυτό ξενιστή, απομακρύνοντας συσσωρευμένα θρεπτικά στοιχεία, που αν δεν χρησιμοποιούνταν κατά αυτό τον τρόπο θα μειωνόταν ο ρυθμός της φωτοσύνθεσης (Way & Cambell 1970).

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

Έχει βρεθεί π.χ. ότι σε ένα εκτάριο καλλιέργειας φασολιών παράγονται κατά την καλλιεργητική περίοδο τέσσερα εκατομμύρια πτερωτά του *Aphis fabae* Scopoli (Hemiptera: Aphididae) (Way & Banks 1967). Ένας σημαντικός παράγοντας που περιορίζει την αύξηση των πληθυσμών των αφίδων είναι οι φυσικοί εχθροί, οι οποίοι σε αρκετές περιπτώσεις τους ελέγχουν ικανοποιητικά. Ανάμεσα στους φυσικούς εχθρούς είναι: α) αρπακτικά: Δίπτερα των οικογενειών Syrphidae και Cecidomyiidae, Νευρόπτερα των οικογενειών Hemerobiidae και Chrysopidae, Κολεόπτερα των οικογενειών Coccinellidae, Staphylinidae και Carabidae, β) παρασιτοειδή:

Υμενόπτερα των οικογενειών Braconidae και Aphidiidae καθώς και εντομοπαθογόνοι μύκητες των γενών *Conidiobolus*, *Entomophthora*, *Erynia* κ.α.

Οι αφίδες αφαιρούν μεγάλη ποσότητα χυμού από τα φυτά και το νύγμα πολλών ειδών προκαλεί συστρόφη φύλλων και παραμόρφωση φύλλων ή καρπών. Τα άφθονα μελιτώδη απεκκρίματα ορισμένων ειδών ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς και ευνοούν την ανάπτυξη καπνιάς, που οφείλεται στην ανάπτυξη σαπροφυτικών μυκήτων. Οι αφίδες προκαλούν και άλλες έμμεσες ζημιές καθώς αποτελούν μια από τις κυριότερες κατηγορίες εντόμων που μεταδίδουν στα φυτά παθογόνους ιούς. Ορισμένα είδη, όπως το *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), είναι φορείς πολλών σοβαρών ιώσεων των καλλιεργούμενων φυτών (van Emden et al. 1969, Blackman & Eastop 2000). Οι πυκνοί συνήθως πληθυσμοί τους, ο μεγάλος αριθμός γενεών το έτος, που συχνά ξεπερνά τις 10 και η μετάδοση ιών στα φυτά, κατατάσσουν τις αφίδες ανάμεσα στους πιο βλαβερούς εχθρούς των καλλιεργούμενων φυτών. Η μείωση που προκαλούν στη γεωργική παραγωγή και κατά συνέπεια στο γεωργικό εισόδημα, στην Ελλάδα είναι σημαντική. Ενδεικτικά αναφέρονται δύο χαρακτηριστικές περιπτώσεις. Στην πεδιάδα Μεσσαράς Κρήτης, στις υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας το 1992, λόγω προσβολής από τους αφιδομεταδιδόμενους ιούς, μωσαϊκό της αγγουριάς (CMV) και Υ της πατάτας (PVY) η απώλεια του αγροτικού εισοδήματος εκτιμήθηκε στο ένα δισ. δρχ. (Αυγελής και Παπαδημητράκης, αδημοσίευτα στοιχεία). Στα Βασιλικά Θεσσαλονίκης η απώλεια του αγροτικού εισοδήματος το 1992 υπολογίσθηκε στα 210 εκτ. δρχ. λόγω της παρουσίας των αφιδομεταδιδόμενων ιών: μωσαϊκό της καρπουζιάς (WMV-2), κίτρινο μωσαϊκό της κοινής κολοκυθιάς (ZYMV) και αφιδομεταδιδόμενος ίκτερος των κολοκυνθοειδών (CABYV) (Βαϊτσόπουλος και Κατής 1993). Επίσης, στην περιοχή της Αργολίδας εγκαταλείφθηκε η καλλιέργεια της τομάτας λόγω της αφιδομεταδιδόμενης νεκρωτικής φυλής του CMV (Δρ. Μπέμ, προσωπική επικοινωνία).

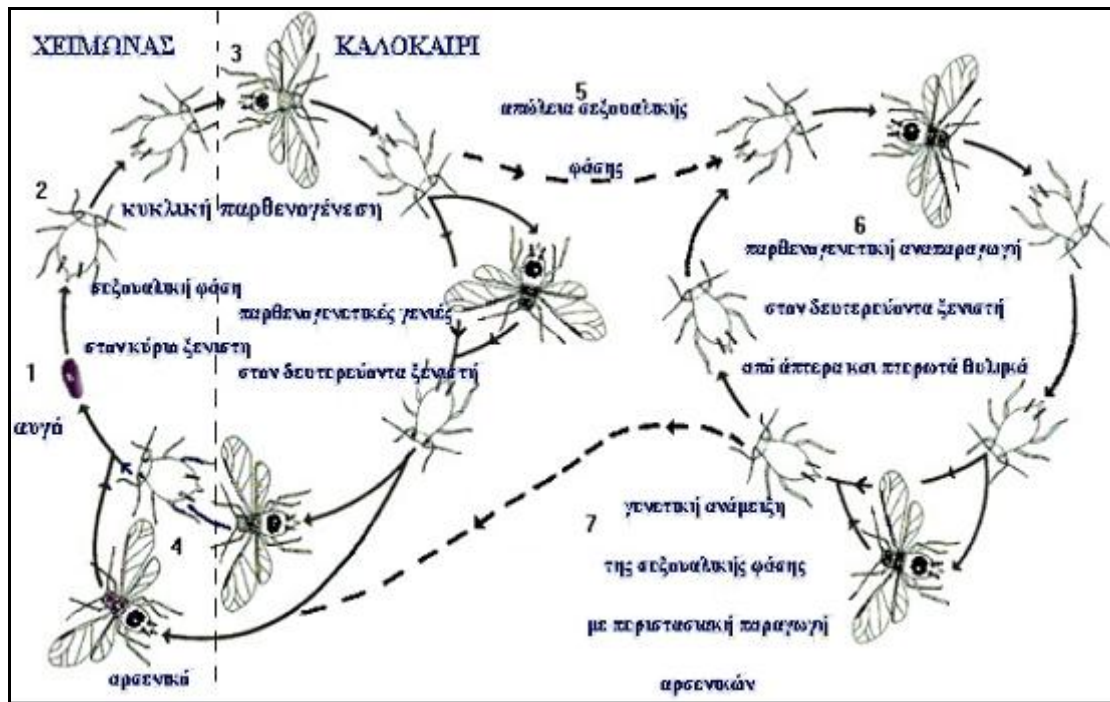
1.2 Βιολογικός κύκλος των αφίδων

Στα ετερόοικα (μεταναστευτικά) είδη αφίδων τα χειμερινά ωά γεννιούνται το φθινόπωρο στους κλάδους του κύριου ξενιστή. Την άνοιξη τα ωά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά, που ονομάζονται θεμελιωτικά ή ιδρυτικά άτομα (fundatrix). Ακολουθούν παρθενογενετικές γενιές με άπτερα (apterous fundatrigeniae) που παρουσιάζουν προοδευτική μεταβολή στη μορφολογία τους

(Lees 1966). Έπειτα από ορισμένο αριθμό γενεών γεννιούνται τα πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά (migrantes ή alate fundtrigieniae), που διασπείρονται σε φυτά του ίδιου είδους με τον κύριο ξενιστή ή μεταναστεύουν στους δευτερεύοντες ποώδεις ξενιστές. Την άνοιξη και το καλοκαίρι στους δευτερεύοντες ξενιστές η μία παρθενογενετική γενιά διαδέχεται την άλλη. Εκτός από άπτερες μορφές παράγονται πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά (alienicolae), που μεταναστεύουν σε άλλα φυτά και συνεχίζουν την παρθενογενετική αναπαραγωγή. Το φθινόπωρο καθώς η διάρκεια της ημέρας μειώνεται, σε είδη ορισμένων οικογενειών, π.χ. στο είδος *A. fabae* Scopoli (Aphididae), παράγονται στο δευτερεύοντα ξενιστή θηλυτόκα πτερωτά (gynoparae) και αρσενικά που θα μεταναστεύσουν στον κύριο ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα θα γεννήσουν τα έμφυλα θηλυκά (ονίparae), που εναποθέτουν τα χειμερινά ωά, μετά από σύζευξη με τα αρσενικά. Στα ετερόοικα είδη άλλων οικογενειών, π.χ. στο είδος *Pemphigus bursarius* (L.) (Pemphigidae), παράγεται στους δευτερεύοντες ξενιστές μόνο μια μεταναστευτική μορφή, τα πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά και ονομάζονται φυλογόνα (sexuparae). Τα φυλογόνα γενούν στον πρωτεύοντα ξενιστή άπτερα αρσενικά και ωτόκα θηλυκά. Τα θηλυκά που επιστρέφουν στον πρωτεύοντα ξενιστή, συχνά παρουσιάζουν μορφολογικές διαφορές από αυτά που μεταναστεύουν την άνοιξη στους δευτερεύοντες ξενιστές (Blackman & Eastop 2000). Απεικόνιση αυτών των σταδίων των αφίδων παρουσιάζονται στο Σχήμα 1.

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

Αρκετές θεωρίες σχετικά με την εξέλιξη της εναλλαγής ξενιστών και της μονοοικίας έχουν διατυπωθεί από τις αρχές του αιώνα. Ο Mordvilko (1928) κατέληξε



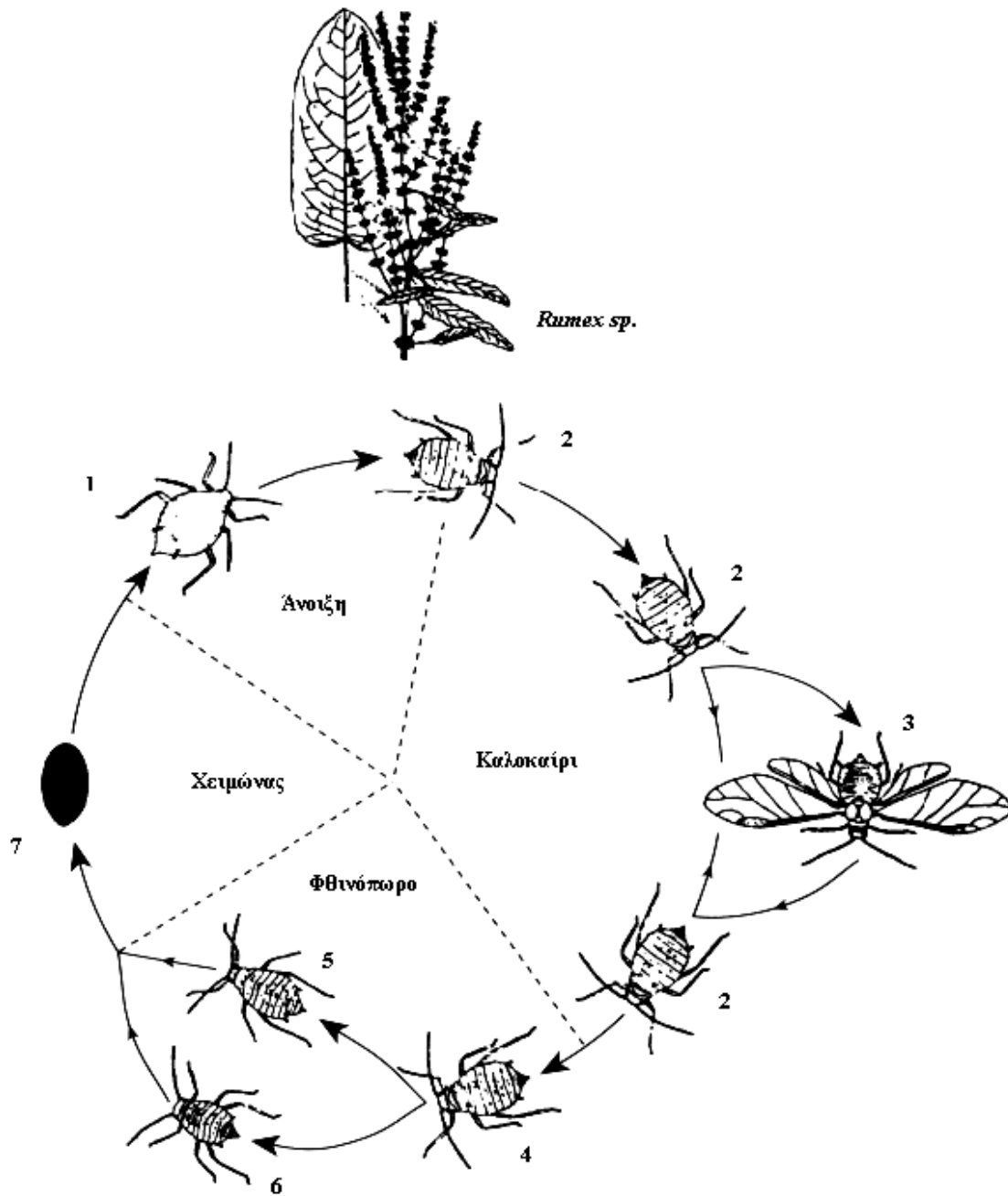
Σχήμα 2. Εναλλαγή ξενιστών και μορφές του *Myzus persicae* (Τροποποιημένο από Field & Blackman 2003).

σε δυο πιθανούς λόγους για την εξέλιξη της εναλλαγής ξενιστών: 1. Έντομα με πολλές γενιές το έτος, όπως οι αφίδες, μπορούν να εκμεταλλευτούν τη συμπληρωματική ανάπτυξη που παρουσιάζουν οι ποώδεις και δενδρώδεις ξενιστές. 2. Εκμετάλλευση των ποωδών φυτών, που αποτελούν υψηλότερης ποιότητας τροφή. Ο ίδιος θεώρησε, ότι η ιδιότητα της εναλλαγής ξενιστών διατηρήθηκε μέσω της εξελικτικής διαδικασίας εξαιτίας της προσαρμογής που παρουσιάζουν τα θεμελιωτικά άτομα στον πρωτεύοντα ξενιστή.

Αυτή η προσαρμογή είναι δυνατή να εμποδίσει την εξέλιξη της αυτοοικίας στους δευτερεύοντες ξενιστές. Ο Börner (1939) πρότεινε, ότι οι αφίδες αρχικά ήταν πολυφάγες, αν και τώρα παρουσιάζουν αρκετή εξειδίκευση, ώστε οι καλοκαιρινοί και χειμερινοί ξενιστές τους μπορεί να σχετίζονται με την πολυφαγία στη διάρκεια του χρόνου. Ο Shaposhnikov (1951, 1956, 1987) πρότεινε ότι οι αλλαγές κατά την εξέλιξη των ξενιστών που προκλήθηκαν από αλλαγές του περιβάλλοντος, εξασθένησαν την εξειδίκευση των αφίδων και έκανε δυνατό τον αποικισμό νέων ξενιστών. Η μικρή θρεπτική ποιότητα των ξυλωδών ξενιστών κατά το καλοκαίρι μπορεί να οδήγησε τις αφίδες σε νέους ξενιστές. Ο Hille Ris Lambers (1953) διατύπωσε την άποψη ότι η ετεροοικία δεν πρέπει να θεωρείται ως ένα εξελικτικό

αδιέξοδο. Αντίθετα ο Istock (1967) πρότεινε ότι οι πολύπλοκοι βιολογικοί κύκλοι είναι μη σταθεροί και τείνουν να τροποποιηθούν σε καταστάσεις, όπως η μονοοικία, που έχουν περισσότερα πλεονεκτήματα. Επικριτές της παραπάνω άποψης είναι οι Slade & Wassersung (1975) και Wilbur (1980), που θεωρούν ότι πολύπλοκοι βιολογικοί κύκλοι προτιμούνται εκεί που αναμένονται, συμπατριικοί, υψηλής ποιότητας εφήμεροι πόροι. Δύο άλλα αίτια της εξέλιξης της εναλλαγής ξενιστών είναι ο ενδοειδικός ανταγωνισμός και η αποφυγή των φυσικών εχθρών. Όσο αυξάνει ο ενδοειδικός ανταγωνισμός σε ένα ξενιστή τόσο μειώνονται οι κίνδυνοι που απορρέουν από τη μετανάστευση. Συνεπώς, ο ανταγωνισμός που υπάρχει στον πρωτεύοντα ξενιστή μπορεί να οδηγήσει τις αφίδες σε εναλλακτικούς καλοκαιρινούς ξενιστές (Dixon 1966). Οι Weed (1896) και Way & Banks (1968) έχουν προτείνει ότι οι φυσικοί εχθροί συνέβαλαν στην εξέλιξη της ετεροοικίας. Η Moran (1983, 1988, 1990) πρότεινε, ότι η ετεροοικία διατηρείται λόγω της ισορροπίας μεταξύ των πλεονεκτημάτων που έχουν οι αφίδες όταν τρέφονται στους ποώδεις ξενιστές και της μεγαλύτερης επιβίωσης το χειμώνα και αναπαραγωγής την άνοιξη στους ξυλώδεις ξενιστές. Όπως οι Mordvilko και Istock, η Moran θεωρεί την ετεροοικία ως συνέπεια της προσαρμογής και του περιορισμού του θεμελιωτικού ατόμου στον πρωτεύοντα ξενιστή. Επίσης συμφωνεί με τους Mordvilko και Shaposhnikov, ότι η εξέλιξη των αφίδων οδηγεί στη μονοοικία σε ποώδη φυτά. Αντίθετα οι Mackenzie & Dixon (1990), Dixon & Kundu (1994) και Kundu & Dixon (1995) υποστηρίζουν την άποψη, ότι για τα έντομα με πολλές γενιές το έτος, η εναλλαγή ξενιστών είναι ένας τρόπος για να εκμεταλλευτούν καλύτερα φυτά που έχουν συμπληρωματική ανάπτυξη και αλλαγές στην θρεπτική ποιότητα δηλαδή συμφωνούν με την εναλλακτική υπόθεση του Mordvilko.

Σύμφωνα με τους Blackman & Eastop (2000), η κυκλική παρθενογένεση διαχωρίζει τις δύο βασικές λειτουργίες ενός οργανισμού, που είναι απαραίτητες στην εκμετάλλευση των πόρων του περιβάλλοντος: 1) την εγγενή αναπαραγωγή, που εμπλέκει τον ανασυνδυασμό των γονιδίων και την παραγωγή νέων γενοτύπων και 2) την αύξηση της βιομάζας κάθε γενοτύπου στο χώρο και στο χρόνο, ώστε να μεγιστοποιηθούν οι πιθανότητες συνεισφοράς των γονιδίων του στην επόμενη σεξουαλική φάση. Αποτέλεσμα του διαχωρισμού των παραπάνω λειτουργιών είναι ότι η εξέλιξή τους συμβαίνει ανεξάρτητα, με συνέπεια να αποκλίνει η μορφολογία των σεξουαλικών από αυτή των παρθενογενετικών μορφών. Χαρακτηριστικό



Σχήμα 3. Βιολογικός κύκλος μονόοικου είδους *Aphis rumicis* L. 1. Θεμελιωτικό άτομο, 2. άπτερο παρθενογενετικό θηλυκό, 3. Πτερωτό παρθενογενετικό θηλυκό. 4. Φυλογόνο, 5. Ωοτόκο, 6. Αρσενικό, 7. Διαχειμάζον ωό (τροποποιημένο από Jones 1942)

παράδειγμα αποτελούν οι αφίδες της υποοικογένειας Pemphiginae, όπου στην πρώτη παρθενογενετική γενιά (fundatrix) οι αφίδες είναι μεγαλόσωμες, ζωοτόκες και γενούν

πολλούς απογόνους, ενώ τα έμφυλα θηλυκά είναι μικρόσωμα, δεν τρέφονται και γενούν ένα ωό μεγέθους περίπου ίδιο με το δικό τους.

Το χαρακτηριστικό που απέκτησαν οι αφίδες (Aphididae) και τους επιτρέπει να αναπτύσσουν μεγάλους πληθυσμούς είναι η ζωοτοκία. Η ανάπτυξη του εμβρύου αρχίζει πριν γεννηθεί η μητέρα του και με την ενηλικίωσή της το έντομο είναι έτοιμο να γεννηθεί. Συνεπώς παρατηρείται επικάλυψη των γενεών και μείωση της μέσης διάρκειας γενιάς, που οδηγεί στη γρήγορη αύξηση των πληθυσμών των αφίδων. Λαμβάνοντας υπόψη ότι όσο μεγαλύτερος είναι ένας οργανισμός τόσο αυξάνει ο χρόνος ανάπτυξής του (Bonner 1988), η τηλεσκοπική ανάπτυξη των γενεών έχει ως αποτέλεσμα οι αφίδες να συμπληρώνουν την ανάπτυξή τους σε χρόνο τρεις φορές μικρότερο από άλλα ισομεγέθη έντομα και οι πληθυσμοί τους να επιτυγχάνουν ρυθμούς αύξησης όμοιους με αυτούς μικρότερων οργανισμών όπως π.χ. τα ακάρεα (Dixon 1998). Επίσης, ένα άλλο χαρακτηριστικό των αφίδων που τις επιτρέπει να δημιουργούν μεγάλους πληθυσμούς και να εκμεταλλεύονται πόρους, που «χάνονται» στο χώρο και το χρόνο, είναι η παραγωγή πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών που μεταναστεύουν από φυτό σε φυτό και δημιουργούν καινούριες αποικίες. Συχνό γεγονός στη φυλογένεση του βιολογικού κύκλου των αφίδων είναι η ανολοκυκλικότητα, δηλαδή η απώλεια της ικανότητας για σεξουαλική αναπαραγωγή. Υπάρχουν είδη από σχεδόν όλες τις κύριες ομάδες των αφίδων, που είναι αποκλειστικά ανολοκυκλικά και αναπαράγονται όλο το έτος παρθενογενετικά. Επίσης, τόσο μονόοικα όσο και ετερόοικα είδη έχουν γίνει μερικώς ανολοκυκλικά, καθώς βρίσκονται ανολοκυκλικοί γενότυποι είτε στην ίδια περιοχή μαζί με ολοκυκλικούς είτε σε άλλες περιοχές του εύρους εξάπλωσης του είδους (Blackman & Eastop 2000). Αν και οι ανολοκυκλικοί κλώνοι έχουν την ικανότητα να αποκτήσουν ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα, να αποικίσουν ανθεκτικές ποικιλίες και να παρουσιάσουν υψηλότερο ρυθμό αύξησης από ότι οι αντίστοιχοι ολοκυκλικοί, μόνο το 3% των ειδών είναι αποκλειστικά ανολοκυκλικά (Blackman 1980). Φαίνεται, ότι η σεξουαλική αναπαραγωγή προσδίδει σημαντικές δυνατότητες προσαρμογής και επιβίωσης στις αφίδες. Μερικοί από τους λόγους, που σύμφωνα με τον Dixon (1998) είναι υπεύθυνοι για τη διατήρηση της εγγενούς αναπαραγωγής στις αφίδες συνοψίζονται παρακάτω. Η εναπόθεση διαχειμαζόντων ωών, που είναι το πιο ανθεκτικό στάδιο του εντόμου στο ψύχος, δεν θα πρέπει να θεωρείται ως πλεονέκτημα της εγγενούς αναπαραγωγής αλλά ως μια προσαρμογή στις ψυχρές χειμερινές συνθήκες. Είδη των οικογενειών Adelgidae και Phylloxeridae παράγουν

για το ίδιο λόγο ωά χωρίς γονιμοποίηση. Η ετερογένεια του περιβάλλοντος είναι ένας από τους λόγους που διατηρείται η εγγενής αναπαραγωγή. Παράγεται ένα εύρος γενοτύπων και αυξάνεται η πιθανότητα κάποιος από αυτούς να έχει μεγαλύτερη προσαρμογή σε συγκεκριμένο περιβάλλον. Επίσης, με την παραγωγή διαφορετικών γενοτύπων μειώνεται ο ενδοειδικός ανταγωνισμός, καθώς κάθε ένας από αυτούς έχει διαφορετικές ανάγκες και εκμεταλλεύονται διαφορετικούς πόρους. Η έλλειψη ετερογένειας στις καλλιέργειες εξηγεί γιατί οι αφίδες, που τις προσβάλλουν, έχουν την τάση να αναπαράγονται παρθενογενετικά όλο το έτος ακόμη και σε περιοχές με ψυχρούς χειμώνες. Ένα άλλο στοιχείο, που πιθανώς είναι υπεύθυνο για την επιλογή της εγγενούς αναπαραγωγής, είναι ότι στις παρθενογενετικές σειρές συσσωρεύονται θανατηφόρα ή μη λειτουργικά αλληλόμορφα και δεν υπάρχει τρόπος να μειωθούν. Με την εγγενή αναπαραγωγή και τον ανασυνδυασμό των γονιδίων το παραπάνω μπορεί να αποφευχθεί. Τέλος, η εγγενής αναπαραγωγή συνδέεται με τα είδη που παρουσιάζουν εξειδικευμένη στρατηγική αναπαραγωγής σχετική με την εποχή. Αντίθετα λείπει από τα είδη που ζουν σε περιβάλλοντα χωρίς εποχικότητα ή είναι μειωμένη.

Οι αφίδες λοιπόν, είναι μια εξαιρετικά πολύπλοκη κατηγορία εντόμων κυρίως λόγω του βιολογικού τους κύκλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να παρουσιάζουν συνήθως μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα στους πληθυσμούς τους, σε σχέση βέβαια και με άλλους παράγοντες. Η γενετική παραλλακτικότητα αποτελεί καθοριστικό παράγοντα και σε άλλες ικανότητες των συγκεκριμένων εντόμων, όπως για παράδειγμα η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε διάφορες μορφές εντομοκτόνων. Η μεγάλη σημασία καθώς και η σύνδεση που υπάρχει μεταξύ αυτών των δυο καταστάσεων αναλύεται στην επόμενη παράγραφο.

2. ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

2.1 Γενικά

Η ζωή εξαρτάται από την ικανότητα των κυττάρων να αποθηκεύουν, να ανακαλούν και να μεταφράζουν τις γενετικές πληροφορίες που απαιτούνται για τη δημιουργία και τη συντήρηση ενός ζωντανού οργανισμού. Οι κληρονομικές πληροφορίες μεταβιβάζονται από ένα κύτταρο στα θυγατρικά του κατά τη κυτταρική διαίρεση και από γενιά σε γενιά μέσω των αναπαραγωγικών κυττάρων (Bittar & Bittar 1996). Αυτές οι πληροφορίες αποθηκεύονται σε κάθε ζωντανό κύτταρο ως γονίδια (genes). Τα γονίδια αποτελούν τα πληροφοριακά γενετικά στοιχεία τα οποία καθορίζουν τα χαρακτηριστικά ενός είδους στο σύνολό του αλλά και τα χαρακτηριστικά των επιμέρους οργανισμών που ανήκουν στο είδος αυτό (Alberts et al. 1998, Avers 1984).

Ήδη από τις αρχές του εικοστού αιώνα, οι βιολόγοι είχαν αναγνωρίσει ότι τα γονίδια βρίσκονται στα χρωμοσώματα, τα οποία ήταν τότε γνωστά ως νηματώδεις δομές στο πυρήνα των ευκαρυωτικών κυττάρων που γίνονται ορατά καθώς το κύτταρο αρχίζει να διαιρείται. Αργότερα, με την εφαρμογή βιοχημικών αναλύσεων, βρέθηκε ότι τα χρωμοσώματα αποτελούνται από DNA και πρωτεΐνες. Επειδή το DNA εθεωρείτο σχετικά απλό μόριο από χημική άποψη, αρχικά επικράτησε η άποψη ότι τα γονίδια έπρεπε να αποτελούνται από πρωτεΐνες, οι οποίες έχουν πολύ μεγαλύτερη χημική ποικιλομορφία. Τα γονίδια κάθε κυττάρου πάνω στη γη αποτελούνται από DNA. Οι γνώσεις μας για τη σχέση ανάμεσα στο DNA και τα γονίδια προήλθαν από πειράματα που έγιναν σε μια μεγάλη ποικιλία οργανισμών (Allfrey et al. 1957, Wickner 1974).

Οι πρώτες ισχυρές ενδείξεις ότι τα γονίδια αποτελούνται από DNA προέκυψαν το 1944, όταν βρέθηκε ότι η προσθήκη καθαρού DNA σε ένα βακτήριο μετέβαλε τις ιδιότητές του και ότι η μεταβολή αυτή μεταβιβαζόταν με ακρίβεια στις επόμενες γενιές των βακτηρίων (Allfrey et al. 1957). Σήμερα το γεγονός ότι το DNA είναι το γενετικό υλικό είναι τόσο θεμελιώδες για τη βιολογική σκέψη ώστε είναι δύσκολο να συνειδητοποιήσουμε το τεράστιο νοητικό κενό που κάλυψε αυτή η ανακάλυψη (Alberts et al. 1998).

Οι πληροφορίες που αφορούν την κληρονομικότητα και καθορίζουν την εξέλιξη όλων των ζωντανών οργανισμών, βρίσκονται κωδικοποιημένες στο χημικό μόριο που

καλείται DNA (δεοξυριβονουκλεϊκό οξύ). Ένα μόριο DNA συνίσταται από δυο μακριές πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες οι οποίες αποτελούνται από τέσσερα είδη νουκλεοτιδίων. Καθεμία από αυτές τις αλυσίδες αναφέρεται ως αλυσίδα DNA ή κλώνος DNA και μεταξύ τους σχηματίζουν μια διπλή έλικα. Οι δυο αλυσίδες συγκρατούνται με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των βάσεων των νουκλεοτιδίων. Τα νουκλεοτίδια αποτελούνται από μια πεντόζη με την οποία συνδέονται μια ή περισσότερες φωσφορικές ομάδες και μια αζωτούχο βάση. Στην περίπτωση των νουκλεοτιδίων του DNA η πεντόζη είναι δεοξυριβόζη που συνδέεται με μια φωσφορική ομάδα ενώ η βάση μπορεί να είναι είτε αδενίνη (A), κυτοσίνη (C), γουανίνη (G) ή θυμίνη (T) (Avers 1984, Blackburn et al. 1990, Alberts et al. 1998).

Το DNA κωδικοποιεί πληροφορίες με τη σειρά ή την αλληλουχία των νουκλεοτιδίων κατά μήκος ενός κλώνου. Η κάθε βάση A, C, G, ή T μπορεί να θεωρηθεί σαν ένα γράμμα από ένα αλφάβητο με τέσσερα γράμματα που χρησιμοποιείται για να ορθογραφούνται βιολογικά μηνύματα στη χημική δομή του DNA. Οι οργανισμοί διαφέρουν μεταξύ τους επειδή τα αντίστοιχα μόρια του DNA τους έχουν διαφορετική αλληλουχία νουκλεοτιδίων και επομένως περιέχουν διαφορετικά βιολογικά μηνύματα (Berg 1992, Bittar et al. 1996).

Το σύνολο των πληροφοριών στο DNA ενός οργανισμού ονομάζεται γονιδίωμα του οργανισμού (ο ίδιος όρος αναφέρεται επίσης για το DNA που περιέχει αυτές τις πληροφορίες). Η συνολική ποσότητα αυτών των πληροφοριών είναι εντυπωσιακή: ένα τυπικό ανθρώπινο κύτταρο περιέχει ένα μέτρο DNA (3×10^9 νουκλεοτίδια). Η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων ενός μικρού γονιδίου του ανθρώπου γραμμένη με το αλφάβητο των τεσσάρων νουκλεοτιδίων, καταλαμβάνει το ένα τέταρτο μιας σελίδας, ενώ η πλήρης αλληλουχία του DNA του γονιδιώματος του ανθρώπου θα γέμιζε πάνω από 1000 βιβλία της τάξεως των 800 σελίδων (Wickner 1974, Bittar et al. 1996, Alberts et al. 1998).

Το γονιδίωμα των οργανισμών αποτελεί το εκμαγείο για κάθε είδους μοριακή μελέτη. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των ερευνητών μέχρι σήμερα ήταν τα πειράματα που ασχολούνταν με **γενετική πληθυσμών** και την **εξέλιξη των ειδών**. Πρόκειται για δυο μεγάλα κεφάλαια της γενετικής, τα οποία όσο και αν μελετήθηκαν δεν θα σταματήσουν ποτέ να προκαλούν το ενδιαφέρον, ιδιαίτερα λόγω των σημαντικών πληροφοριών που δίνουν για τους οργανισμούς που εξετάζονται. Η γενετική πληθυσμών, προσπαθεί να περιγράψει τον τρόπο με τον οποίο μεταβάλλεται η

συχνότητα των αλληλομόρφων που ελέγχουν ένα συγκεκριμένο γνώρισμα και δεν ασχολείται με τη μελέτη της κληρονομικότητας αυτού του γνωρίσματος. Προκειμένου να μελετηθούν αλλαγές στη συχνότητα εμφάνισης των αλληλομόρφων, χρησιμοποιούνται για ανάλυση πληθυσμοί αντί για άτομα. Επιπλέον, επειδή οι αλλαγές των γονιδιακών συχνοτήτων είναι στενά συνδεδεμένες με την εξελικτική πορεία και την διαφοροποίηση των ειδών, η γενετική πληθυσμών μελετάται παράλληλα με την εξελικτική γενετική.

Ένας τρόπος για την κατανόηση των αποτελεσμάτων και την εξαγωγή συμπερασμάτων ύστερα από μια μελέτη γενετικής πληθυσμών, είναι η χρήση του νόμου των **Hardy-Weinberg** (Hardy 1908, Weinberg 1908). Ο θεμελιώδης αυτός νόμος για τη γενετική μελέτη των πληθυσμών, πήρε το όνομα του από τους δυο επιστήμονες που τον θέσπισαν. Ο νόμος αυτός κάνοντας κάποιες υποθέσεις προβλέπει τον τρόπο με τον οποίο οι συχνότητες γονιδίων μεταδίδονται από γενιά σε γενιά. Συγκεκριμένα:

Αν υποτεθεί ότι ένας πληθυσμός που έχει άπειρο μέγεθος και αναπαράγεται τυχαία, δεν επηρεάζεται από εξωτερικούς εξελικτικούς παράγοντες (π.χ. μετάλλαξη, μετανάστευση και φυσική επιλογή), **τότε** οι συχνότητες γονιδίων δεν θα αλλάξουν με το πέρασμα του χρόνου και στην επόμενη γενιά οι συχνότητες αυτές θα είναι p^2 για τους κυρίαρχους γενότυπους (AA), $2pq$ για τους συκυρίαρχους γενότυπους (Aa) και q^2 για τους υποτελείς γενότυπους (aa).

Ας εξεταστούν λοιπόν οι υποθέσεις και τα συμπεράσματα του νόμου των Hardy-Weinberg, ξεκινώντας από τις υποθέσεις.

A. Πληθυσμός άπειρου μεγέθους: Στη πραγματικότητα δεν υπάρχει τέτοιος πληθυσμός. Ακυρώνει όμως αυτό το γεγονός τον νόμο των Hardy-Weinberg; Η απάντηση είναι ΟΧΙ! Εκείνο που ενδιαφέρει έναν τέτοιο πληθυσμό είναι η επίδραση που έχει σε αυτόν η **γενετική ροή**. Η γενετική ροή περιλαμβάνει τις αλλαγές που σημειώνονται στις συχνότητες των γονιδίων, ως αποτέλεσμα της τυχαίας απόκλισης από τις αναμενόμενες γενοτυπικές συχνότητες. Αυτό το φαινόμενο αποτελεί πρόβλημα σε πληθυσμούς μικρού μεγέθους αλλά μειώνεται ή μηδενίζεται σε πληθυσμούς μέτριου ή μεγάλου μεγέθους αντίστοιχα.

B. Τυχαία σύζευξη: Η τυχαία σύζευξη απευθύνεται σε άτομα του πληθυσμού τα οποία αναπαράγονται σεξουαλικά και διατηρούν μια ισορροπία με τις γενοτυπικές τους συχνότητες. Για παράδειγμα, αν μέσα σε έναν πληθυσμό, που έχει τα αλληλόμορφα M και N, οι συχνότητές τους είναι $MM = 0.83$, $MN = 0.16$ και $NN =$

0.01 τότε από τα άτομα που έδωσαν τη συχνότητα MM, το 68.9% ($0.83 \times 0.83 \times 100$) αναμένεται να έχει συζευχθεί. Αν στη πραγματικότητα σημειωθεί σημαντική απόκλιση από την αναμενόμενη τιμή, τότε εξάγεται το συμπέρασμα ότι στο συγκεκριμένο πληθυσμό δεν έλαβε χώρα το φαινόμενο της τυχαίας σύζευξης. Το συμπέρασμα είναι το ίδιο και στη περίπτωση που σημειωθεί απόκλιση και στις άλλες περιπτώσεις σύζευξης (π.χ MM x MN ή MN x NN).

Η τυχαία σύζευξη είναι ένα φαινόμενο, το οποίο λαμβάνει χώρα στους ανθρώπους για πολλά χαρακτηριστικά γνωρίσματα όπως είναι η ομάδα αίματος. Ένας άνθρωπος όμως δεν επιλέγει συνειδητά σύντροφο λόγω της ομάδας αίματός του, αλλά λόγω κάποιων άλλων χαρακτηριστικών όπως η νοημοσύνη και η φυσική κατάσταση, για τα οποία ο πληθυσμός δεν έχει υποστεί τυχαία σύζευξη. Κάτι τέτοιο όμως δεν αποκλείει την ανάλυση του πληθυσμού για χαρακτηριστικά γνωρίσματα στα οποία έχει λάβει χώρα το φαινόμενο της τυχαίας σύζευξης.

Γ. Ο πληθυσμός δεν επηρεάζεται από εξελικτικούς παράγοντες: Οι εξελικτικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν ένα πληθυσμό είναι οι μεταλλάξεις, η μετανάστευση και η φυσική επιλογή. Οι συγκεκριμένοι παράγοντες, οι οποίοι θα αναλυθούν με λεπτομέρεια παρακάτω, μπορεί να επηρεάσουν τη σύσταση ενός πληθυσμού αλλά μπορεί και να μην παίζουν κανένα ρόλο. Όπως και στην περίπτωση της τυχαίας σύζευξης, υπάρχουν κάποιοι γενετικοί τόποι οι οποίοι θα επηρεαστούν περισσότερο από τους συγκεκριμένους παράγοντες. Για τους συγκεκριμένους γενετικούς τόπους, αυτή η υπόθεση του νόμου των Hardy-Weinberg αποκλείεται ενώ για τους γενετικούς τόπους οι οποίοι δεν επηρεάζονται από τους εξελικτικούς παράγοντες, η υπόθεση αυτή ισχύει.

Τα δυο συμπεράσματα του νόμου των Hardy-Weinberg μπορούν να αποδοθούν με μαθηματικές εξισώσεις (Hardy 1908, Weinberg 1908). Έτσι, αν η συχνότητα των αλληλομόρφων του γαμέτη A συμβολιστεί με το p και με το q η συχνότητα των αλληλομόρφων του γαμέτη a , τότε ο συνδυασμός των γαμετών θα δώσει τα αποτελέσματα που φαίνονται στον Πίνακα 1.

Μια από τις υποθέσεις του νόμου των Hardy-Weinberg αναφέρεται στις συχνότητες των γονιδίων που προκύπτουν μετά από μια γενιά τυχαίας σύζευξης. Οι τιμές των συχνοτήτων αυτών όπως προβλέπονται από το νόμο, φαίνονται στον παραπάνω πίνακα και συμφωνούν με την αρχική υπόθεση.

Πίνακας 1. Συχνότητες αλληλομόρφων μετά από μια γενιά σεξουαλικής αναπαραγωγής.

	p (A)	q (α)
p (A)	p ² (AA)	pq (Aα)
q (α)	qp (Aα)	q ² (αα)

Η δεύτερη υπόθεση του νόμου, είναι ότι οι συχνότητες των δυο αλληλομόρφων θα παραμείνουν οι ίδιες από γενιά σε γενιά. Παρακάτω παρουσιάζεται η μαθηματική απόδειξη της συγκεκριμένης υπόθεσης.

$$p = f(AA) + \frac{1}{2}f(Aa) \Leftrightarrow p = p^2 + \frac{1}{2}(2pq) \Leftrightarrow p = p(p + q)$$

Όμως, $(p+q) = 1$

Οπότε: $q = 1-p$

Άρα: $p = p [p + (1 - p)] \Leftrightarrow p = p$

Συνεπώς, οι συχνότητες των αλληλομόρφων A δεν αλλάζουν σε μια γενιά. Με ανάλογους υπολογισμούς αποδεικνύεται το ίδιο και για τα αλληλόμορφα α. Στην περίπτωση λοιπόν που δεν υπάρχουν παράγοντες, που να επηρεάσουν και να αλλάξουν τις συχνότητες των αλληλομόρφων και των γονιδίων, αυτές θα παραμείνουν ίδιες από γενιά σε γενιά. Αυτά τα δυο συμπεράσματα αποδείχτηκαν και πειραματικά ώστε να είναι έγκυρα και αποτέλεσαν τη βάση για όλες τις μελέτες που έγιναν πάνω στη γενετική πληθυσμών καθώς και στην εξελικτική βιολογία (Barker 1990, Futuyma 1997).

Ένας πληθυσμός ατόμων για να θεωρηθεί ότι αναπτύσσεται εξελικτικά, πρέπει να περιέχει **γενετική παραλλακτικότητα**. Λόγω του γεγονότος ότι σε μια μελέτη δεν είναι δυνατόν να είναι γνωστές όλες οι γενετικές μεταβλητές που προσδίδουν εξελικτική επιτυχία, συνήθως μελετάται η παραλλακτικότητα διαφορετικών φαινοτύπων και γενοτύπων ώστε να σχηματιστεί μια γενική εικόνα του πληθυσμού (Futuyma 1995, 1997). Τα επιθυμητά γνωρίσματα τα οποία εξετάζονται μπορεί να εκφράζονται σε φαινότυπους που είναι πολύ εύκολο να αναγνωριστούν αλλά τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται βιοχημικές και μοριακές μέθοδοι με σκοπό να εκτιμήσουν με ακρίβεια την παραλλακτικότητα του πληθυσμού.

Υπάρχουν πολλά είδη οργανισμών που παρουσιάζουν μικρή γενετική παραλλακτικότητα, κυρίως λόγω μείωσης του πληθυσμού και περιορισμού του ενδαιτημάτος τους (Futuyma 1997). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα άτομα τα οποία

απομένουν σε ένα πληθυσμό να είναι στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους και ένας τέτοιος πληθυσμός χαρακτηρίζεται από χαμηλή παραλλακτικότητα. Αυτό είναι ιδιαίτερα επικίνδυνο όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες μεταβάλλονται και ο πληθυσμός δεν έχει τη δυνατότητα να συμβαδίσει με τις αλλαγές αυτές. Ένας τέτοιου είδους πληθυσμός μπορεί να οδηγηθεί πολύ γρήγορα στην εξαφάνιση (Futuyma 1995, Gillespie 2004).

Το παραπάνω παράδειγμα αποτελεί περίπτωση **bottleneck** (φαινόμενο στενωπού), ένα φαινόμενο που έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές που μελετούν την εξέλιξη των ειδών. Το φαινόμενο του στενωπού είναι ένα εξελικτικό γεγονός, κατά το οποίο ένα σημαντικό ποσοστό ενός πληθυσμού θανατώνεται ή για κάποιους λόγους εμποδίζεται να αναπαραχθεί, με αποτέλεσμα ο πληθυσμός να μειώνεται κατά 50 % ή και παραπάνω. Αν αυτή η μείωση του πληθυσμού αναπαραχθεί με γραφική παράσταση, η καμπύλη που προκύπτει μοιάζει με το λαιμό ενός μπουκαλιού που στενεύει. Από αυτή την απεικόνιση πήρε και το όνομα bottleneck (λαιμός μπουκαλιού). Αυτό το φαινόμενο αυξάνει τη γενετική ροή μέσα σε ένα πληθυσμό, κάτι που είναι ιδιαίτερα ανησυχητικό εφόσον η γενετική ροή είναι αντιστρόφως ανάλογη με το μέγεθος του πληθυσμού. Ένα ακόμη χαρακτηριστικό που παρουσιάζουν πληθυσμοί που έχουν υποστεί το φαινόμενο bottleneck, είναι η απώλεια της γενετικής ποικιλότητας. Κάτι τέτοιο παρουσιάζει ενδιαφέρον εφόσον ο μειωμένος πολυμορφισμός μειώνει την ικανότητα ενός πληθυσμού να ανταποκριθεί εξελικτικά σε ενδεχόμενες αλλαγές του περιβάλλοντος (Fisher 1930, Futuyma 1997).

Ένας τρόπος με τον οποίο μπορεί να εκφραστεί η παραλλακτικότητα, είναι μέσω της ανάλυσης γενετικών δεδομένων και στη συνέχεια μετάφραση των δεδομένων αυτών σε γονιδιακές συχνότητες. Κάθε γονίδιο περιέχει τουλάχιστον δυο αλληλόμορφα. Επομένως, η άθροιση των συχνοτήτων εμφάνισης των αλληλομόρφων για όλα τα γονίδια, που εξετάστηκαν σε ένα συγκεκριμένο πληθυσμό, θεωρείται χαρακτηριστικό του συγκεκριμένου πληθυσμού. Οποιοσδήποτε πληθυσμός, για κάθε γονίδιο που εξετάζεται, μπορεί να απαρτίζεται από μεγάλο εύρος συχνοτήτων αλληλομόρφων. Τέλος, δυο πληθυσμοί που αποτελούνται από άτομα του ίδιου είδους δεν είναι απαραίτητο να έχουν τον ίδιο αριθμό γονιδιακών συχνοτήτων (Barker 1990, Berg 1992).

Ως **γενετικός πληθυσμός** περιγράφεται το άθροισμα των συχνοτήτων όλων των γονιδίων που αντιπροσωπεύουν έναν συγκεκριμένο πληθυσμό. Απαραίτητη προϋπόθεση προκειμένου να εξελιχτεί ένα είδος, είναι να υπάρξουν αλλαγές στις

συχνότητες των γονιδίων του πληθυσμού. Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορούν να συντελέσουν στην αλλαγή της **αρμοστικότητας (fitness)** των ατόμων ενός πληθυσμού. Η θνησιμότητα και η γονιμότητα είναι δυο χαρακτηριστικά που σχετίζονται άμεσα με την αρμοστικότητα ενός ατόμου καθώς και με την ικανότητά του να καταφέρει να επιβιώσει μέχρι να αρχίσει να αναπαράγεται. Μεταβάλλοντας την αρμοστικότητα ενός ατόμου μέσα σε ένα πληθυσμό θα αλλάξει και η κατανομή σύζευξης. Το γεγονός αυτό θα συμβεί διότι οι γενότυποι της επόμενης γενιάς δεν θα έχουν άμεση σχέση με τη συχνότητα γονιδίων του αρχικού πληθυσμού (εκείνου πριν από την αλλαγή της αρμοστικότητας). Επομένως οι συχνότητες γονιδίων θα αλλάξουν και ως συνέπεια, ο πληθυσμός θα εξελιχθεί (Barker 1990, Berg 1992, Futuyma 1997).

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

Ένα κλασικό παράδειγμα που υποστηρίζει αυτή τη θεωρία είναι αυτό της πεταλούδας *Biston betularia* (L.) (Lepidoptera: Geometridae) στην Αγγλία. Το έντομο αυτό παρουσιάζει πολυμορφισμό και μπορεί να έχει τόσο σκούρο όσο και ανοιχτό χρώμα. Πριν από τη βιομηχανοποίηση της κεντρικής Αγγλίας, το αλληλόμορφο που επικρατούσε στη μορφή της πεταλούδας ήταν εκείνο που έδινε το ανοιχτό χρώμα. Οι πεταλούδες που είχαν ανοιχτό χρώμα μπορούσαν να κρύβονται στους φλοιούς ανοιχτόχρωμων δέντρων και να αποφεύγουν τα αρπακτικά πουλιά. Αυτό είναι το φαινόμενο του μιμητισμού, όπου κάποια έντομα προσαρμόζουν το σώμα τους ανάλογα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται προκειμένου να μην γίνονται αντιληπτά από τους εχθρούς τους. Στη συγκεκριμένη περίπτωση, η μόλυνση του περιβάλλοντος από την υπερβολική βιομηχανική ανάπτυξη (χρησιμοποίηση κάρβουνου), είχε ως αποτέλεσμα τη μετατροπή του χρώματος των δέντρων σε πιο σκούρο. Μετά από αυτή την αλλαγή το αλληλόμορφο που έγινε επικρατέστερο στη

πεταλούδα ήταν αυτό που της έδινε το σκούρο χρώμα, λόγω του ότι μόνο έτσι μπορούσε πλέον να κρύβεται στους φλοιούς των σκουρόχρωμων δένδρων και να προστατεύεται από τα αρπακτικά.

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

2.1.1 Μετάλλαξη

Οι μεταλλάξεις χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: ωφέλιμες, επιζήμιες και ουδέτερες. Οι επιζήμιες μεταλλάξεις, αν προκαλέσουν μείωση της αρμοστικότητας των ατόμων στα οποία εμφανίζονται, θα χαθούν. Στη περίπτωση που μια μετάλλαξη βελτιώσει την αρμοστικότητα ενός ατόμου, οι συχνότητες των αλληλομόρφων θα αυξάνονται από γενιά σε γενιά μέσω της σεξουαλικής αναπαραγωγής. Μια μετάλλαξη όμως, μπορεί να είναι και η αλλαγή ενός αλληλομόρφου που μοιάζει με κάποιο που υπάρχει ήδη στο γενετικό υλικό του πληθυσμού (π.χ η μετατροπή ενός αλληλομόρφου από κυρίαρχο σε υποτελές). Μια εντελώς διαφορετική μορφή μετάλλαξης, είναι η δημιουργία ενός εξολοκλήρου καινούριου αλληλομόρφου. Από όλα τα παραπάνω είδη μεταλλάξεων, κάποιες θα είναι επιζήμιες και θα χαθούν. Στη περίπτωση όμως που αλλάξουν οι συνθήκες του περιβάλλοντος, το μεταλλαγμένο αλληλόμορφο είναι δυνατόν να ωφεληθεί και τελικά να γίνει αυτό κυρίαρχο στο συγκεκριμένο πληθυσμό. Αν η μετάλλαξη είναι ωφέλιμη για ένα συγκεκριμένο είδος οργανισμού, θα εξαπλωθεί από τον πληθυσμό όπου πρωτοεμφανίστηκε σε άλλους πληθυσμούς μέσω της μετανάστευσης (Futuyma 1997, Beebe & Rowe 2004).

Το πιο κοινό είδος μετάλλαξης παρατηρείται μέσα στο ίδιο το γονίδιο με την αλλαγή ενός μόνο νουκλεοτιδίου. Γενικά οι μεταλλάξεις είναι επιβλαβείς, αλλά μέσα στο γένωμα μπορεί να συμβεί και ένα διαφορετικό είδος αλλαγής το οποίο στην πραγματικότητα ωφελεί τη δημιουργία μεταλλάξεων. Αυτό είναι ο διπλασιασμός του ίδιου του γονιδίου (Futuyma 1997). Αν δηλαδή ένα σημαντικό γονίδιο υποστεί διπλασιασμό, η μετάλλαξη στο διπλό αντίγραφο που θα προκύψει, δεν θα μειώσει απαραίτητα την απόδοση του ατόμου διότι θα υπάρχει ακόμα ένα λειτουργικό αντίγραφο του αυθεντικού γονιδίου. Υπάρχουν πολλές ακόμα αλλαγές που μπορούν να συμβούν σε έναν οργανισμό ώστε να προκύψει ένα καινούριο γονίδιο, το οποίο μπορεί να χρειάζεται σε ένα συγκεκριμένο στάδιο της ανάπτυξης ή σε μια και μόνο

γενετική τοποθεσία. Τέτοιου είδους αλλαγές δημιουργούν τις **πολύ-γονιδιακές οικογένειες**. Πολύ σημαντικά γονίδια, όπως η αιμογλοβίνη των ανθρώπων και τα γονίδια φωτοσύνθεσης των φυτών οργανώνονται σε πολύ-γονιδιακές οικογένειες.

2.1.2 Μετανάστευση

Μια από τις υποθέσεις του νόμου του Hardy-Weinberg είναι ότι ένας πληθυσμός αφού σχηματιστεί, δεν παρουσιάζει αλλαγές από γενιά σε γενιά στη σχετική συχνότητα των αλληλομόρφων, εφόσον βέβαια ισχύουν κάποιες παραδοχές. Στη συνέχεια βέβαια αποδείχτηκε ότι για πολλούς οργανισμούς δεν ισχύει κάτι τέτοιο, με μεγαλύτερο παράδειγμα τον άνθρωπο. Ένας από τους κυριότερους τρόπους με τον οποίο συμβαίνουν αλλαγές στο γονιδίωμα ενός οργανισμού, είναι η μετανάστευση. Στην ουσία με το τρόπο αυτό συμβαίνουν αλλαγές στις συχνότητες των γονιδίων είτε με είσοδο στον πληθυσμό περισσότερων αντιγράφων του ίδιου αλληλομόρφου είτε με είσοδο νέων αλληλομόρφων που προέκυψαν από μεταλλάξεις. Λόγω του ότι οι μεταλλάξεις δεν συμβαίνουν σε όλους τους οργανισμούς, η μετανάστευση είναι απαραίτητη διαδικασία για ένα νέο αλληλόμορφο, ώστε να εξαπλωθεί μέσα στο πληθυσμό. Η μετανάστευση ως κοινωνικός όρος, αποτελεί τη μετακίνηση ατόμων σε καινούριους πληθυσμούς. Αντίθετα, ως γενετικός όρος είναι απαραίτητο η μετακίνηση αυτή να συνοδεύεται με την εισαγωγή νέων αλληλομόρφων στον πληθυσμό. Αυτό θα επιτευχθεί μόνο όταν το άτομο που μεταναστεύσει, καταφέρει να συζευχθεί με ένα άτομο που υπήρχε ήδη στον πληθυσμό. Ο όρος που χρησιμοποιείται για να περιγράψει την εισαγωγή νέων αλληλομόρφων είναι γονιδιακή ροή (gene-flow). Οι δυο μεγάλες επιδράσεις που έχει η μετανάστευση σε ένα πληθυσμό είναι : (1) αυξάνει την παραλλακτικότητα μέσα στον πληθυσμό και (2) εμποδίζει τον πληθυσμό να εξελιχθεί σε ένα εντελώς διαφορετικό είδος. Η πρώτη επίδραση είναι και η σημαντικότερη γιατί, παρέχεται στον πληθυσμό η απαραίτητη παραλλακτικότητα ώστε να επιβιώσει σε περίπτωση που οι περιβαλλοντικές συνθήκες αλλάξουν δραστικά (Avers 1984, Futuyma 1997).

2.1.3 Επιλογή

Ένα φυσικό επακόλουθο των μεταλλάξεων είναι ότι δημιουργούνται καινούριες μορφές στη γενετική δομή ενός οργανισμού, οι οποίες μπορεί να ενσωματωθούν στην αρμοστικότητα του ή μπορεί να μην προσαρμοστούν ποτέ σε αυτή. Σε περίπτωση που η αλλαγή στο γονιδίωμα του οργανισμού, οδηγήσει σε

αναπαραγωγικό πλεονέκτημα τότε τα αλληλόμορφα που είναι παρόντα σε αυτό το άτομο θα γίνουν κυρίαρχα στον πληθυσμό. Κατά αυτό τον τρόπο τα αλληλόμορφα του συγκεκριμένου ατόμου, επιλέγονται και η συγκεκριμένη διαδικασία ονομάζεται επιλογή. Ο Δαρβίνος (Darwin 1872) χρησιμοποίησε τον όρο **φυσική επιλογή** για να περιγράψει την παραπάνω διαδικασία. Οι αλλαγές λοιπόν στις συχνότητες των γονιδίων προκαλούνται από τη **μετανάστευση**, τη **μετάλλαξη** και την **φυσική επιλογή** αλλά σύμφωνα με το Δαρβίνο η εξέλιξη ενός είδους εξαρτάται άμεσα από τη **φυσική επιλογή**.

Η φυσική επιλογή είναι επακόλουθο των αλλαγών που δημιουργεί το περιβάλλον στην επιβίωση και στην αναπαραγωγή ενός οργανισμού. Η θνησιμότητα αποτελεί το εύρος επιβίωσης των ατόμων μέχρι να φτάσουν σε ηλικία αναπαραγωγής ενώ η γονιμότητα αποτελεί την συνολική γενετική συνεισφορά στην επόμενη γενιά. Πρέπει να σημειωθεί, ότι ενώ οι μεταλλάξεις και η γενετική ροή είναι γεγονότα που συμβαίνουν τυχαία, η φυσική επιλογή διαλέγει επιλεκτικά τις μεταλλάξεις που σχετίζονται με την αρμοστικότητα ενός ατόμου. Ο καθοριστικός ρόλος της φυσικής επιλογής στην ανάπτυξη της θεωρίας της εξέλιξης έδωσε σημαντικές πληροφορίες για τη συσχέτιση που υπάρχει μεταξύ της εξέλιξης και της μελέτης της οικολογίας των οργανισμών (Avers 1984, Futuyma 1997).

Η φυσική επιλογή χωρίζεται σε δυο κατηγορίες:

Οικολογική επιλογή: Είναι η αποκλίνουσα φυσική επιλογή σε χαρακτηριστικά μεταξύ πληθυσμών (ή διασπαστική επιλογή μεταξύ φαινοτύπων στον ίδιο πληθυσμό) σε διαφορετικά περιβάλλοντα.

Σεξουαλική επιλογή: Λαμβάνει χώρα όταν κάποιοι οργανισμοί, οι οποίοι είναι πιο ελκυστικοί στο αντίθετο φύλλο λόγω κάποιων χαρακτηριστικών τους, αναπαράγονται περισσότερο και συνεπώς αυξάνουν τη συχνότητα εμφάνισης των γονιδίων που είναι υπεύθυνα για αυτά τα χαρακτηριστικά στη δεξαμενή γονιδίων.

Επίσης η φυσική επιλογή μπορεί να διαχειριστεί τις μεταλλάξεις με πολλούς και διαφορετικούς τρόπους:

- (1) Η **θετική επιλογή** αυξάνει τη συχνότητα εμφάνισης των ωφέλιμων μεταλλάξεων.
- (2) Η **επιλογή σταθεροποίησης ή εκκαθάρισης** ωφελεί το μέσο όρο των χαρακτηριστικών ενός πληθυσμού και γι'αυτό το λόγο μειώνει τη παραλλακτικότητα των γονιδίων αλλά διατηρεί το μέσο όρο τους.

(3) Η **επιλογή ισορροπίας** διατηρεί την παραλλακτικότητα σε ένα πληθυσμό μέσω κάποιων μηχανισμών όπως:

✓ Το πλεονέκτημα της ετεροζυγωτίας ή υπερκυριαρχία, όπου κύτταρα ή τμήματα του οργανισμού που βρίσκονται σε ετεροζύγωτη κατάσταση είναι περισσότερο προσαρμοστικά από άλλα που βρίσκονται σε ομόζυγη κατάσταση. Παράδειγμα αποτελούν τα κύτταρα της δρεπανοκυτταρικής αναιμίας στον άνθρωπο τα οποία παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην προσβολή από ελονοσία.

(4) **Επιλογή εξαρτώμενη από τη συχνότητα**, όπου κάποιες μεταβλητές παρουσιάζουν άλλοτε αυξημένη και άλλοτε μειωμένη αρμοστικότητα, λόγω της σπανιότητας με την οποία εμφανίζονται.

(5) **Επιλογή διάσπασης**, η οποία ωφελεί τα αποτελέσματα της κατανομής συχνοτήτων των γονιδίων. Ο μέσος όρος μπορεί να αλλάζει ανάλογα με την περίπτωση.

(6) **Επιλεκτική εκκαθάριση**, η οποία περιγράφει την επίδραση της επιλογής σε συνδεδεμένα αλληλόμορφα και έχει δυο μορφές:

✓ Επιλογή υποβάθρου: Λαμβάνει χώρα όταν επιλέγεται μια επιβλαβής μετάλλαξη. Τότε οι μεταλλάξεις που συνδέονται μαζί της, αλλά και η ίδια, εξαλείφονται με αποτέλεσμα τη δημιουργία χαμηλού γενετικού πολυμορφισμού στη συγκεκριμένη περιοχή.

✓ Γενετικό hitchhiking: Λαμβάνει χώρα όταν επιλέγεται μια θετική μετάλλαξη. Τότε οι μεταλλάξεις, που συνδέονται μαζί της, ωθούνται για κυριαρχία μαζί με τη θετική μεταβλητή.

2.1.4 Ορισμένα παραδείγματα

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

Οι Wilson et al. (2003) δημοσίευσαν μια εργασία που ασχολήθηκε με την κληρονομική γενετική παραλλακτικότητα και τη δυνατότητα εξέλιξης των αφίδων σε μη σεξουαλικές μορφές. Ο βιολογικός κύκλος των αφίδων μπορεί να περιέχει: κυκλική παρθενογένεση, υποχρεωτική παρθενογένεση, υποχρεωτική παρθενογένεση με ταυτόχρονη παραγωγή αρσενικών ατόμων καθώς και μια ενδιάμεση στρατηγική

όπου ένας γενότυπος διαχειμάζει αναπαραγόμενος με παρθενογένεση και ταυτόχρονα επενδύει σε σεξουαλικά αναπαραγόμενα ωά. Οι αφίδες που απασχόλησαν τη συγκεκριμένη μελέτη αναπαράγονταν εξ ολοκλήρου παρθενογενετικά. Πολλοί βιολόγοι που ασχολούνται με τις αφίδες, έχουν αποδείξει με τη χρήση μοριακών τεχνικών, ότι ορισμένοι παρθενογενετικοί γενότυποι έχουν εξαπλωθεί τόσο χωρικά όσο και χρονικά. Στοιχεία συλλέχθηκαν και επεξεργάστηκαν ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για την εξέλιξη και την επιμονή των συγκεκριμένων γενοτύπων με το πέρασμα του χρόνου. Η συγκεκριμένη μελέτη αποτελεί μια εξαιρετική συγκεντρωτική αναφορά των μελετών, που έχουν γίνει προκειμένου να αναγνωριστούν γενότυποι αφίδων που έχουν εξαπλωθεί γεωγραφικά και χρονικά. Επίσης, αποτελεί μια πολύ χρήσιμη πηγή που βοηθά στην κατανόηση της βιολογίας των αφίδων και στο ρόλο που παίζει η γενετική παραλλακτικότητα (Wilson et al., 2003).

Οι Guillemaud et al. (2003) εξέτασαν τη χωρική και χρονική γενετική παραλλακτικότητα σε πληθυσμούς του εντόμου *M. persicae* από διάφορες περιοχές της Γαλλίας με την ανάλυση **μικροδορυφορικού DNA**. Το συγκεκριμένο έντομο έχει πολύπλοκο βιολογικό κύκλο. Δηλαδή, μερικά άτομα αναπαράγονται με συνεχή παρθενογένεση ενώ κάποια άλλα αναπαράγονται σεξουαλικά μόνο μια φορά το χρόνο. Αυτό που φαίνεται να επηρεάζει περισσότερο αυτή τη συμπεριφορά είναι η σχετική αφθονία της ροδακινιάς στις συγκεκριμένες περιοχές καθώς και οι κλιματικές συνθήκες, εφόσον τα σεξουαλικά ωά είναι η μόνη μορφή που μπορεί να αντέξει την παγωνιά (Blackman 1974, Margaritoroulos et al. 2002, Vorburger et al. 2003). Η σεξουαλική αναπαραγωγή προϋποθέτει υποχρεωτική εναλλαγή ξενιστών, κάτι που μπορεί να καταλήξει σε διασπορά του εντόμου σε μεγάλες αποστάσεις. Αποδείχτηκε ότι ο τρόπος αναπαραγωγής επηρεάζει τη γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών του εντόμου. Οι αφίδες που αναπαράγονται με **κυκλική παρθενογένεση** (δηλαδή, έχουν μια σεξουαλική γενιά το φθινόπωρο) παρουσιάζουν μεγαλύτερη γενετική ποικιλότητα σε σχέση με αυτές που αναπαράγονται μόνο παρθενογενετικά. Επίσης οι ερευνητές διαπίστωσαν εποχική μείωση της γενετικής παραλλακτικότητας και εποχική γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών της αφίδας. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η επιλογή (καλλιεργητικές πρακτικές, χρήση εντομοκτόνων) αποτελεί σημαντικό παράγοντα διαμόρφωσης της γενετικής δομής των πληθυσμών του εντόμου (Guillemaud et al. 2003).

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

3. ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

3.1 Γενικά

Η δραματική αύξηση του προβλήματος της ανθεκτικότητας των εντόμων στα εντομοκτόνα τα τελευταία 25 χρόνια οδήγησε τους επιστήμονες, γεωπόνους και τις βιομηχανίες παραγωγής αγροχημικών, να συνειδητοποιήσουν την αναγκαιότητα της ορθολογικής χρήσης τους και να διαφυλάξουν την αποτελεσματικότητα των πολύτιμων χημικών προϊόντων (Denholm et al. 1998).

Προκειμένου να μελετηθεί η έκταση του προβλήματος της ανθεκτικότητας, είναι απαραίτητο να διερευνηθούν οι μηχανισμοί που είναι υπεύθυνοι. Επίσης, για να γίνει σωστός έλεγχος των πληθυσμών των εντόμων είναι απαραίτητο να εφαρμοστούν σωστές τακτικές, μερικές από τις οποίες θα αναφερθούν παρακάτω.

3.1.1 Παρούσα κατάσταση

Η ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα είναι πάρα πολύ εξαπλωμένη. Μέχρι το 1990 υπήρχαν πάνω από 500 είδη αρθροπόδων στα οποία αναφέρθηκε ανθεκτικότητα σε τουλάχιστον μια χημική ομάδα. Περίπου το 40% αυτών των ειδών είναι είδη υγειονομικού και κτηνιατρικού ενδιαφέροντος και το υπόλοιπο 60% αφορά σε έντομα γεωργικών καλλιεργειών (Denholm et al. 1998).

Από τα είδη των αρθροπόδων για τα οποία έχει αναφερθεί ανθεκτικότητα το 88 % είναι έντομα (κλάση Insecta) και το 12 % είναι ακάρεα και αραχνίδια (κλάση Arachnida, τάξη Acarina). Το 92 % των ανθεκτικών ειδών εντόμων ανήκουν στις εξής τέσσερις τάξεις εντόμων: Coleoptera, Diptera, Hemiptera και Lepidoptera. Το υπόλοιπο ποσοστό περιλαμβάνει κατσαρίδες, θρίπες, ψείρες και ψύλλους.

Αν και πρακτικώς όλα τα εντομοκτόνα επηρεάζονται από την ανθεκτικότητα, η εξάπλωσή της ποικίλει έντονα ανάμεσα στα είδη. Για μερικά έντομα η ανθεκτικότητα εκτείνεται σε λίγες συγγενείς ουσίες της ίδιας ομάδας. Μπορεί επίσης να είναι αδύνατη και περιορισμένη σε μια μικρή γεωγραφικά περιοχή. Στο άλλο άκρο, κάποια πολύ δημοφιλή έντομα, όπως η *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera: Yponomeutidae), ο δορυφόρος της πατάτας, *Leptinotarsa desemlineata* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae), η αφίδα της ροδακινιάς, *M. persicae*, ο αλευρώδης του βαμβακιού, *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae) είναι ανθεκτικά σε

πάρα πολλά ή σχεδόν σε όλα τα διαθέσιμα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμησή τους.

Αν και από την ανθεκτικότητα επηρεάζονται περισσότερο τα παλαιότερα και πιο διαδεδομένα εντομοκτόνα, υπάρχει μια ανησυχητική αύξηση της ανθεκτικότητας και στα πιο καινούρια εντομοκτόνα.

3.1.2 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας

Οι πιο σημαντικοί μηχανισμοί ανθεκτικότητας αφορούν είτε την αυξημένη ικανότητα των εντόμων να αποικοδομούν τα εντομοκτόνα, είτε στη δομική μεταβολή των στόχων που δρουν τα εντομοκτόνα μέσα στο έντομο.

Άλλοι πιθανοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν μειωμένη διείσδυση των εντομοκτόνων μέσω της επιδερμίδας των εντόμων και ιδιαιτερότητα συμπεριφοράς, που καθιστούν ικανούς τους εχθρούς, να μειώνουν ή να αποφεύγουν την έκθεση σε τοξικές ουσίες.

Αυξημένη αποικοδόμηση εντομοκτόνων

Οι τρεις γνωστοί τύποι αποικοδόμησης εντομοκτόνων που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα είναι οι εξής (Denholm et al., 1998):

(1) Αυξημένος οξειδωτικός μεταβολισμός των εντομοκτόνων από το κυτόχρωμα P₄₅₀ της μονοοξυγενάσης. Αυτό μπορεί να προκαλέσει ανθεκτικότητα σε όλες τις σημαντικότερες ομάδες εντομοκτόνων εκτός από τα κυκλοδιένια. Ωστόσο τα περισσότερα στοιχεία για αυτόν τον μηχανισμό είναι έμμεσα και βασίζονται στην ικανότητα του βουτοξειδίου του πιπερονυλίου (Piperonyl Butoxide) ή συγγενών ουσιών που είναι γνωστές ως αναχαιτιστές του κυτοχρώματος P₄₅₀ της μονοοξυγενάσης να καταστέλλουν την ανθεκτικότητα όταν χρησιμοποιούνται σε συνεργιστές σε βιοδοκιμές.

Περιπτώσεις στις οποίες ο αυξημένος οξειδωτικός μεταβολισμός των εντομοκτόνων εξηγήθηκε άμεσα μέσω δέσμευσης ή με μελέτες μεταβολισμού είναι ακόμα σπάνιες.

(2) Αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου γλουταθειόνη τρανσφεράση, το οποίο καταλύει τη γλουταθειόνη σε μια ποικιλία αντιδρώντων υποστρωμάτων. Ο μηχανισμός αυτός είναι ουσιαστικά σοβαρός για την ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά. Λόγω του διαφορετικού στόχου δράσης των πυρεθροειδών εντομοκτόνων είναι απίθανο να προκαλεί αντοχή των εντόμων στη συγκεκριμένη ομάδα εντομοκτόνων.

(3) Η υδρόλυση, η δέσμευση των εντομοκτόνων από εστεράσες είναι σπουδαίος παράγοντας στην ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα οργανοφωσφορικά και πυρεθρίνες. Από τους τρεις μηχανισμούς αποικοδόμησης αυτός είναι ο πιο χαρακτηριστικός βιοχημικά. Ανθεκτικότητα που οφείλεται στην αυξημένη δραστηριότητα των εστερασών μπορεί να προκύπτει ή με ποιοτική αλλαγή του ενζύμου αυξάνοντας την ικανότητα του ενζύμου να δεσμεύει τα εντομοκτόνα ή ποσοτική αλλαγή στη παραγωγή ενός ενζύμου το οποίο ήδη υπάρχει στα ευαίσθητα άτομα.

Μείωση της ευαισθησίας του στόχου δράσης των εντομοκτόνων

Δυο από τους πιο κατανοητούς μηχανισμούς αλλαγής στόχου δράσης είναι αυτοί που προκαλούν ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά στην πρώτη περίπτωση και στις πυρεθρίνες στη δεύτερη.

Οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά θανατώνουν τα έντομα με τη δέσμευση του ενζύμου ακετυλοχολυνεστεράση (AChE) κάτι που έχει ως συνέπεια την αυξημένη παραγωγή νευρικών παλμών στη σύναψη. Περιπτώσεις AChE με μειωμένη δέσμευση από τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά έχει παρατηρηθεί σε πολλά είδη εντόμων και τετρανύχων (Denholm et al. 1998). Βιοχημικός προσδιορισμός μη ευαίσθητης AChE στα εντομοκτόνα έχει αποκαλύψει ότι τα έντομα μπορεί να φέρουν μια μεταλλαγμένη μορφή του ενζύμου, που προσδίδει και διασταυρούμενη ανθεκτικότητα.

Ο κύριος τρόπος δράσης των πυρεθρινών είναι στα σημεία του νευρικού άξονος όπου γίνεται η ανταλλαγή ιόντων Na, δηλαδή στις διόδους νατρίου (sodium channel). Ο μηχανισμός προκαλεί ανθεκτικότητα του στόχου στις πυρεθρίνες με αλλαγή της πρωτεΐνης της διόδου νατρίου στις κυτταρικές μεμβράνες και ονομάζεται **knockdown resistance (kdr)**. Ο συγκεκριμένος τύπος ανθεκτικότητας έχει προσδιοριστεί σε πολλά είδη εντόμων συμπεριλαμβανομένων του δορυφόρου της πατάτας, αφίδων, οικιακής μύγας, κατσαριδών και κουνουπιών (Field et al. 1997, Denholm et al. 1998).

3.1.3 Διασταυρούμενη και πολλαπλή ανθεκτικότητα

Ένα σοβαρό βήμα στην αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας είναι ο προσδιορισμός της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας που δίνει κάποιος μηχανισμός. Ο ορισμός διασταυρούμενη ανθεκτικότητα αναφέρεται στην ικανότητα ενός μηχανισμού να δίνει ανθεκτικότητα σε μια σειρά εντομοκτόνων συνήθως (αλλά όχι

πάντα) της ίδιας χημικής ομάδας. Ο προσδιορισμός κατηγοριών διασταυρούμενης ανθεκτικότητας είναι ουσιώδης για τη χρήση εντομοκτόνων κατά τέτοιο τρόπο (π.χ. εναλλαγή) ώστε να αποφεύγεται η συνεχής επιλογή του ίδιου ανθεκτικού μηχανισμού και χρήση εντομοκτόνων, τα οποία επηρεάζονται λιγότερο από αυτόν το μηχανισμό όταν είναι παρών. Ατυχώς, η διαδικασία για την αντιμετώπιση της ανθεκτικότητας μπορεί να γίνει περίπλοκη από την πολλαπλή ανθεκτικότητα δηλαδή την παρουσία στο έντομο δυο ή περισσότερων μηχανισμών ο καθένας με συγκεκριμένο τύπο διασταυρούμενης ανθεκτικότητας. Ο διαχωρισμός μεταξύ των δυο αυτών τύπων ανθεκτικότητας είναι ένα πολύ ενδιαφέρον θέμα.

Κατηγορίες διασταυρούμενης ανθεκτικότητας είναι δύσκολο να προβλεφθούν εκ των προτέρων. Οι μηχανισμοί που βασίζονται στην αποικοδόμηση ή στην αλλαγή της ευαισθησίας του στόχου δράσης μπορεί να διαφέρουν σημαντικά. Ως παράδειγμα, η ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά που οφείλεται στην αυξημένη δραστηριότητα εστερασών μπορεί να έχει ευρύ φάσμα επιδρώντας σε αρκετά από αυτά τα εντομοκτόνα (π.χ. E4 ανθεκτικότητα στο *M. persicae*, Field et al. 1997) ή πολύ ειδική δράση σε λίγα εντομοκτόνα ή ακόμα σε ένα μόνο μόριο. Ομοίως, οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που οφείλονται στην τροποποίηση του στόχου δράσης μπορεί να διαφέρουν στους τύπους της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας.

Η ανθεκτικότητα μπορεί να είναι πολύ εκτεταμένη επηρεάζοντας μια μεγάλη σειρά από οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά εντομοκτόνα ή να είναι πολύ συγκεκριμένη όπως με το τροποποιημένο ένζυμο AChE που προσδιορίστηκε στο *M. persicae* και δίνει ανθεκτικότητα σε λίγα καρβαμιδικά εντομοκτόνα, όπως το pirimicarb και το triazamate (Field et al. 1997).

3.1.4 Πώς αναπτύσσεται η ανθεκτικότητα;

Η ανθεκτικότητα αναπτύσσεται μέσω της επιλογής των γονιδίων ανθεκτικότητας, τα οποία υπάρχουν από τη φύση ανάμεσα στους πληθυσμούς των εντόμων. Πρίν τη χρήση των συγκεκριμένων εντομοκτόνων, αυτά τα γονίδια απαντώνται σε χαμηλές συχνότητες και κατ' ουσία είναι αδύνατο να ανιχνευθούν με τις διαθέσιμες τεχνικές.

Όταν γίνει εφαρμογή με εντομοκτόνο αρχίζουν να αυξάνουν σε συχνότητα. Κατά τη διάρκεια των πρώτων σταδίων της επιλογής, η ανθεκτικότητα μπορεί να έχει μικρή επίπτωση στο βαθμό αντιμετώπισης των εντόμων, παρά του ότι μπορεί να ανιχνευθεί με λεπτομερείς βιοδοκιμές. Τελικώς, η συχνότητα των γονιδίων

ανθεκτικότητας θα φθάσει σε τέτοιο στάδιο, ώστε οι δυσκολίες αντιμετώπισης να είναι φανερές. Το πόσο γρήγορα αυξάνεται η ανθεκτικότητα και το κατά πόσο μπορεί να γίνει ανεκτή εξαρτάται από ένα μεγάλο αριθμό παραγόντων στους οποίους συμπεριλαμβάνονται το είδος της ζημιάς, το μέγεθος της καταστροφής, η ισχύς των μηχανισμών ανθεκτικότητας, η συχνότητα χρήσης των εντομοκτόνων και ένας μεγάλος αριθμός βιολογικών παραγόντων οι οποίοι πρέπει να μελετηθούν. Το κλειδί της επιτυχίας στον έλεγχο της ανθεκτικότητας βρίσκεται στο να αναγνωριστούν όσο το δυνατό περισσότεροι παράγοντες προτού η ανθεκτικότητα φθάσει σε επίπεδα οικονομικής καταστροφής.

3.1.5 Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας

Οι παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση ανθεκτικότητας μπορεί να ταξινομηθούν σε γενετικούς ή βιολογικούς, σε συσχέτιση με τις γενετικές και οικολογικές ιδιότητες των εχθρών ή τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας. Μπορεί επίσης να ταξινομηθούν και σε λειτουργικούς, συνδυάζοντάς τους με τον τύπο του εντομοκτόνου που χρησιμοποιείται και με το πώς εφαρμόζεται.

Οι γενετικοί και βιολογικοί παράγοντες είναι πολύ πέραν του δικού μας ελέγχου, όμως, μπορεί να γίνεται εκτίμηση του κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικότητας κάτω από συγκεκριμένες στρατηγικές ελέγχου.

Οι οικολογικοί παράγοντες, όπως η μετανάστευση ή το μέγεθος των πληθυσμών των εντόμων, μπορούν να ερευνηθούν πριν από την εμφάνιση της ανθεκτικότητας προκαταβολικά και να τους εκμεταλλευτούμε ώστε να βελτιωθούν οι γνώσεις των στρατηγικών διαχείρισης της ανθεκτικότητας. Αντίθετα, οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας μπορούν να μελετηθούν μόνο όταν έχει αναπτυχθεί η ανθεκτικότητα και έχει χαρακτηριστεί στο εργαστήριο (Denholm 1998). Ωστόσο, αυτή η γνώση μπορεί να χρησιμοποιηθεί για σωστή διαχείριση της ανθεκτικότητας και επιπλέον να κατανοηθούν πιο πολύπλοκα φαινόμενα όπως αυτό της διασταυρούμενης ανθεκτικότητας.

Οι λειτουργικοί παράγοντες όπως ο τύπος, οι δόσεις, η συχνότητα των εφαρμογών με εντομοκτόνα είναι άμεσα ελεγχόμενοι και μπορεί να γίνεται χειρισμός τους με πολλούς τρόπους προκειμένου να μειωθεί η πίεση για επιλογή ανθεκτικών γονιδίων.

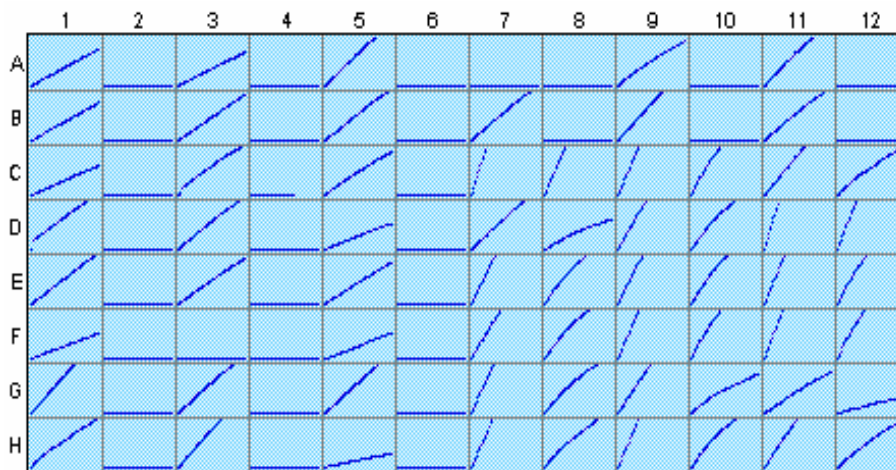
3.1.6 Μέθοδοι ελέγχου ανθεκτικότητας

Όπως ήδη αναφέρθηκε, η ανθεκτικότητα αποτελεί ένα από τα μεγαλύτερα προβλήματα της γεωργίας σε παγκόσμιο επίπεδο. Για την αντιμετώπισή της είναι απαραίτητο να διαγνωστεί στους πληθυσμούς του εντόμου που μας ενδιαφέρει. Για το λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι με τις οποίες μπορεί να γίνει σωστός έλεγχος της ανθεκτικότητας.

Οι κυριότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στα περισσότερα ερευνητικά κέντρα και εργαστήρια χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες. Τις κλασικές, βιοχημικές και μοριακές μεθόδους.

Οι κλασικές μέθοδοι είναι οι πιο διαδεδομένες και περιλαμβάνουν κυρίως βιοδοκιμές με διαφορετικές δόσεις του εντομοκτόνου που εξετάζεται κάθε φορά. Οι βιοδοκιμές αυτές μπορεί να γίνουν με: τοπική εφαρμογή, ακριβή ψεκασμό πρότυπων διαλυμάτων, έκθεση των ουσιών σε φιλμ, χαρτί ή γυαλί και εμβάπτιση του εντόμου. Η επιλογή της μεθόδου εξαρτάται κυρίως από το είδος και το μέγεθος του εντόμου. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι πληθυσμοί των εντόμων δέχονται τις δόσεις των εντομοκτόνων και στη συνέχεια υπολογίζεται το LD₅₀ ώστε να διαπιστωθεί η ανθεκτικότητα και σε συγκεκριμένη δόση. Οι κλασικές μέθοδοι ελέγχου της ανθεκτικότητας είναι αποτελεσματικές και απαντούν στο ερώτημα του ερευνητή για το αν ο πληθυσμός που εξετάζεται είναι ανθεκτικός. Παρόλα αυτά απαιτούν πολύ χρόνο και δεν είναι ακριβείς ώστε να απαντήσουν σε βαθύτερα ερωτήματα όπως π.χ ποίος είναι ο υπεύθυνος μηχανισμός για την ανθεκτικότητα. Για μεγαλύτερη λεπτομέρεια, υπάρχουν οι βιοχημικές και οι μοριακές μέθοδοι.

Οι βιοχημικές και μοριακές μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν τους μηχανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την ανθεκτικότητα εξετάζοντας έντομα σε ατομικό επίπεδο. Για αυτό ακριβώς το λόγο μπορούν να επιβεβαιώσουν την ύπαρξη ανθεκτικότητας χρησιμοποιώντας έναν πολύ μικρό αριθμό εντόμων. Η αναγνώριση των μηχανισμών ανθεκτικότητας είναι πολύ σημαντική γιατί: (α) βοηθάει στον καθορισμό του φάσματος της διασταυρωτής ανθεκτικότητας που αποτελεί ένα από τα σοβαρότερα προβλήματα στην αντιμετώπιση των εντόμων, (β) διευκολύνει την επιλογή εναλλακτικών εντομοκτόνων, και (γ) επιτρέπει τη λεπτομερή χαρτογράφηση περιοχών με ανθεκτικούς πληθυσμούς (Denholm et al., 1998). Πολλές βιοχημικές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για όλους τους γνωστούς μηχανισμούς ανθεκτικότητας εκτός από εκείνων της kdr και των υποδοχέων του GABA (π.χ. Brogdon 1989, Brogdon et al. 1990, Brogdon & McAllister 1997). Οι βιοχημικές μέθοδοι



Εικόνα 1. Η κινητικότητα του ενζύμου AChE μετράται σε φασματοφωτόμετρο και μετά από επεξεργασία των αποτελεσμάτων σε Η.Υ προκύπτει η παραπάνω εικόνα. Κάθε τετράγωνο δείχνει την κινητικότητα του ενζύμου σε κάθε δείγμα με μορφή διαγράμματος.

χρησιμοποιούν κυρίως σπεκτροφωτόμετρο ή φθορισμόμετρο για διαπίστωση μορφών ανθεκτικότητας που έχουν σχέση με κινητικότητα, υπερπαραγωγή ή τροποποίηση ενζύμων. Τέτοιου είδους μηχανισμοί ανθεκτικότητας είναι η τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση (MACE) (Εικόνα 1), η αυξημένη παραγωγή εστερασών (Εικόνα 2), ο οξειδωτικός μεταβολισμός από το κυτόχρωμα P₄₅₀ της μονοοξυγενάσης και η αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου γλουταθειόνη-τρανσφεράση. Οι μέθοδοι αυτές είναι γρήγορες και αποτελεσματικές. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται ευρέως από τους ερευνητές, παρά το γεγονός ότι δίνουν ποσοστά ανθεκτικότητας για τα άτομα των εντόμων που εξετάστηκαν χωρίς να παρέχουν ακριβή στοιχεία.

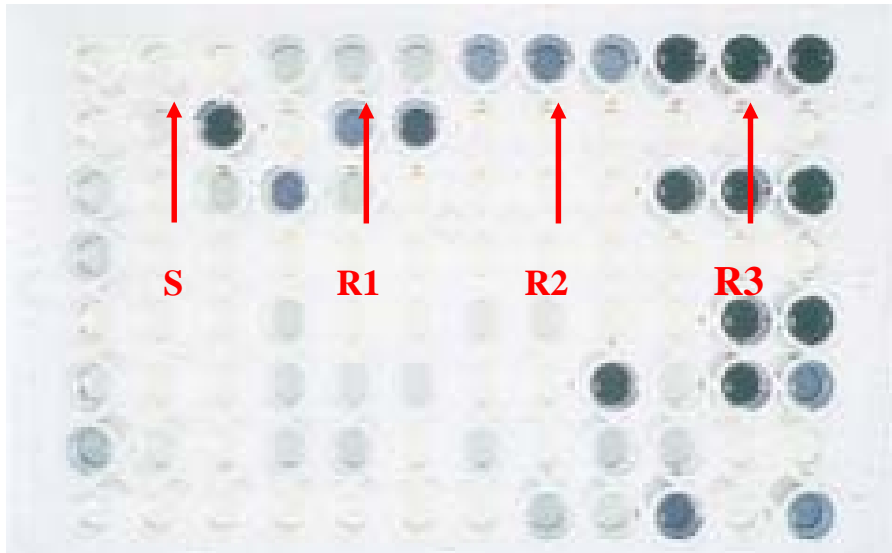
Οι μέθοδοι που προτιμώνται λόγω της ακρίβειας των αποτελεσμάτων τους είναι οι μοριακές. Οι πληροφορίες που αντλούνται από τις μοριακές τεχνικές, για τους μηχανισμούς ανθεκτικότητας αποτελούν σίγουρη διάγνωση. Με τις μεθόδους αυτές ανιχνεύονται σημειακές μεταλλάξεις που σχετίζονται με τους μηχανισμούς αλλαγής του στόχου δράσης των εντομοκτόνων ή αποτοξίκωση των ενζύμων. Συγκεκριμένα οι μηχανισμοί αλλαγής στόχου μπορούν να προσδιοριστούν με τη χρήση PCR σε συνδυασμό με συγκεκριμένους μοριακούς δείκτες (π.χ. Field & Devonshire 1996, Steichen et al. 1994).

3.1.7 Ανθεκτικότητα και αφίδες

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

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

Μια άλλη αφίδα που έχει απασχολήσει αρκετά τους επιστήμονες για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας είναι η *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae). Η αφίδα αυτή παρουσίασε ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, με αποτέλεσμα η αντιμετώπισή της να παρουσιάζει αποτυχίες. Οι Ono et al. (1999) με τη βοήθεια μοριακών μεθόδων ανακάλυψαν ότι ο υπεύθυνος μηχανισμός ήταν η υπερπαραγωγή εστερασών, οι οποίες ταξινομούνται σε δύο τύπους (Τύπος 1 και Τύπος 2) και παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα με τα γονίδια των εστερασών E4 και FE4 που είναι υπεύθυνα για την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο *M. persicae*.

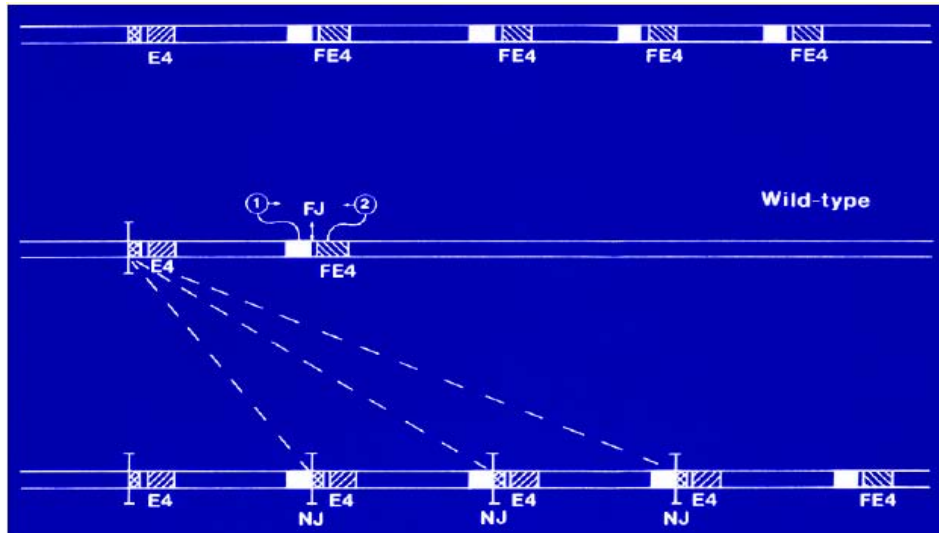


Εικόνα 2. Επίπεδα ανθεκτικότητας στο μηχανισμό υπερπαραγωγής εστερασών.
(S=ευαίσθητα, R1= λίγο ανθεκτικά, R2= μέτρια ανθεκτικά, R3= πολύ ανθεκτικά)

3.2 Ανθεκτικότητα και *Myzus persicae*

3.2.1 Αποτοξίκωση εντομοκτόνων από εστεράσες

Για πολλά χρόνια ο μοναδικός μηχανισμός ανθεκτικότητας, που είχε αναγνωριστεί στο *M. persicae*, ήταν η παραγωγή μεγάλης ποσότητας εστερασών οι οποίες αποτοξικώνουν τα εντομοκτόνα. Αυτή η μορφή ανθεκτικότητας παρουσιάστηκε πρώτη φορά την δεκαετία του '60 και όλες οι ανθεκτικές φυλές του εντόμου μπορούσαν να υδρολύουν το υπόστρωμα των εστερασών, που είναι το 1-ναφθυλ-υδροξείδιο. Αργότερα διαπιστώθηκε, με ηλεκτροφόρηση, ότι η ανθεκτικότητα των ατόμων οφείλεται σε μεγάλη παραγωγή δυο ειδών εστερασών, της E4 και της FE4. Αυτές οι εστεράσες αποτελούν το 1% των συνολικών πρωτεϊνών της αφίδας και το αποτέλεσμα της υδρόλυσης και της δέσμευσης των μορίων είναι η ανθεκτικότητα σε ένα ευρύ φάσμα εντομοκτόνων όπως οργανοφωσφορικά, καρβαμικά και πυρεθροειδή. Παρά το γεγονός ότι η FE4 υδρολύει πιο γρήγορα από την E4 τα εντομοκτόνα, η υπερπαραγωγή οποιασδήποτε από τις δυο μορφές προσδίδει υψηλή ανθεκτικότητα. Η ανθεκτικότητα με την αυξημένη παραγωγή εστερασών, αποτελεί δευτερεύοντα μηχανισμό ανθεκτικότητας των αφίδων στα πυρεθροειδή, εφόσον ο βασικός μηχανισμός ανθεκτικότητας σε αυτά τα εντομοκτόνα είναι η αλλαγή του στόχου δράσης, όπως θα αναλυθεί παρακάτω (Devonshire et al. 1998).



Εικόνα 3. Υπερπαραγωγή αντιγράφων των γονιδίων E4 και FE4 σε σχέση με τον ευαίσθητο γενότυπο (Field & Devonshire 1998)

3.2.2 Ενίσχυση των γονιδίων των εστερασών

Η παρατήρηση ότι οι κλώνοι με αυξημένα επίπεδα εστερασών παρουσίασαν διπλασιασμό της ενζυμικής δραστηριότητας, οδήγησε στην υπόθεση ότι η αιτία της ανθεκτικότητας ήταν η **ενίσχυση των γονιδίων** (Εικόνα 3) και όχι ο έλεγχος της μεταγραφής. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώθηκε αργότερα αλλά το φαινόμενο αποδείχθηκε ότι ήταν πολύ πιο περίπλοκο. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τις δυο μορφές των εστερασών (E4 και FE4) έχουν μέγεθος 5kb και είναι παρόμοια. Διαφέρουν μόνο σε εννιά αμινοξέα και στο ότι η FE4 έχει 12 αμινοξέα στο τέλος της αλυσίδας, με αποτέλεσμα να αλλάζουν τα κωδικόνια λήξης, τα οποία βρίσκονται στα γονίδια της E4. Όλοι οι κλώνοι που εξετάστηκαν μέχρι σήμερα έχουν τα ίδια γονίδια για τις E4 και FE4, συμπεριλαμβανομένων και των ιντρονίων. Στο *Myzus persicae nicotianae* (Blackman), που τρέφεται στον καπνό, παρατηρήθηκε υπερπαραγωγή των ίδιων γονιδίων κάτι που αποδεικνύει την απόκτησή τους από το *M. persicae* s.str.

Τόσο στο *M. persicae nicotianae* όσο και στο *M. persicae*, η ενίσχυση των γονιδίων της E4 παρατηρείται μαζί με μια μετατόπιση των αυτοσωμάτων 1 και 3 ενώ οι αφίδες που έχουν μόνο τα ενισχυμένα γονίδια της FE4 έχουν φυσιολογικό καρύοτυπο. Θεωρείται ότι είναι πολύ σπάνιο να βρεθούν σε μια αφίδα τα ενισχυμένα γονίδια και των δυο εστερασών κάτι που αποδεικνύει ότι τα άτομα που φέρουν διαφορετικά γονίδια δεν αναπαράγονται μεταξύ τους. Πρώτη φορά τα δυο ενισχυμένα γονίδια βρέθηκαν μαζί στους απογόνους εργαστηριακών πληθυσμών ενώ

εμφανίστηκε ένας μικρός αριθμός αφίδων και με τα δυο γονίδια σε χωράφια της Ελλάδας (Blackman et al. 1995, 1996, 1999).

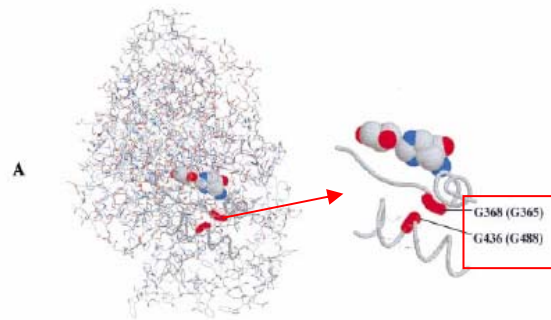
Μετά από πολλές έρευνες αποδείχθηκε ότι η υπερπαραγωγή των γονιδίων E4 και FE4, εξαρτάται από διαφορετικά γεγονότα τα οποία συμβαίνουν μια φορά και στη συνέχεια επιλέγονται οι ανθεκτικές αφίδες μετά την επέμβαση με τα εντομοκτόνα. Η εξάπλωση των γονιδίων γίνεται με την μετανάστευση του είδους. Το 5' άκρο των δυο γονιδίων διαφέρει, κάτι που αποδεικνύει ότι η έκφρασή τους γίνεται με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα, το γονίδιο FE4 έχει μια συνηθισμένη αλληλουχία υποκινητή, ενώ το E4 έχει μια απομονωμένη περιοχή με κυτοσίνη και γουανίνη (CpG) κάτι που μπορεί να επηρεάσει την έκφραση του γονιδίου μέσω αλλαγών στη μεθυλίωση του DNA.

3.2.3 Μηχανισμοί ανθεκτικότητας που δρουν στο στόχο δράσης των εντομοκτόνων

Ανθεκτική ακετυλοχολινεστεράση (AChE)

Η τροποποίηση της AChE, του στόχου δράσης των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών εντομοκτόνων, είναι ένας σημαντικός μηχανισμός ανθεκτικότητας σε πολλά είδη εντόμων. Στο *M. persicae* δεν είχε ανιχνευτεί μέχρι το 1990 (Moore et al. 1994a). Αρχικά εντοπίστηκε σε πληθυσμούς του εντόμου από την Ελλάδα και στη συνέχεια βρέθηκε σε πληθυσμούς από την Ιαπωνία, την Νότια Αφρική και την Ευρώπη (Moore et al. 1994b). Πληθυσμοί αφίδων με τροποποιημένη AChE πρωτοπαρουσιάστηκαν στην Αγγλία το 1995, αλλά τότε η αλλαγή αυτή δεν προκάλεσε προβλήματα στον έλεγχο του εντόμου. Το 1996 παρουσιάστηκαν μεγάλοι πληθυσμοί αφίδων, με ανθεκτική AChE, στην Ανατολική Αγγλία και το έτος εκείνο απέτυχε ο έλεγχος του πληθυσμού των εντόμων με το pirimicarb, που μέχρι τότε αποτελούσε το κύριο μέσο αντιμετώπισης των αφίδων (Foster et al. 1998).

Το γεγονός ότι ο μηχανισμός της τροποποιημένης AChE εντοπίστηκε πρόσφατα και λαμβάνει χώρα μαζί με τον μηχανισμό των ενισχυμένων εστερασών (E4 FE4), δηλώνει ότι ο μηχανισμός αυτός εξελίχτηκε πιο πρόσφατα. Το γονίδιο της AChE είναι το ίδιο στις αφίδες με γονίδιο E4 ή FE4, κάτι που δηλώνει ότι αρχικά παρουσιάστηκε σε ολοκυκλικούς γενότυπους και στη συνέχεια εξαπλώθηκε μέσα στο είδος. Αν το τροποποιημένο γονίδιο της AChE εμφανίστηκε ως μετάλλαξη, η μεταφορά του σε αφίδες που είχαν στο γονιδιώμα τους την μετατόπιση των

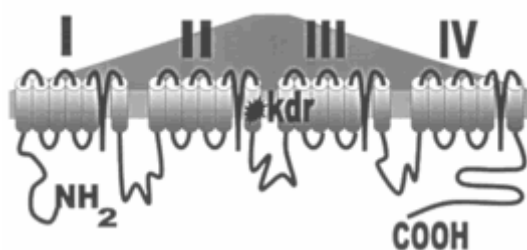


Εικόνα 4. Μεταλλάξεις που έχουν εντοπιστεί στο ένζυμο AChE
(Vontas et. al. 2002)

αυτοσωμάτων 1 και 3 (ανολοκυκλικά ή ανδροκυκλικά άτομα) πρέπει να έγινε με σύζευξη θηλυκού ατόμου με αρσενικό που προερχόταν από ανδροκυκλικό κλώνο με το ενισχυμένο γονίδιο E4. Η συνεχής παρθενογενετική αναπαραγωγή των απογόνων αυτής της διασταύρωσης, είχε ως αποτέλεσμα τη διατήρησή της σε ετεροζυγωτία. Παρόλα αυτά τροποποιημένο γονίδιο AChE, έχει βρεθεί και σε ομοζυγωτία σε συνδυασμό με τα ενισχυμένα γονίδια E4 και FE4. Αυτό δείχνει ότι έγινε σύζευξη αρσενικών με το γονίδιο E4 και θηλυκών με φυσιολογικό καρυότυπο και το ανθεκτικό γονίδιο της AChE. Στην Αγγλία τα άτομα που φέρουν το ανθεκτικό γονίδιο της AChE έχουν κόκκινο χρώμα και έχουν το ενισχυμένο γονίδιο E4. Στην Ελλάδα όπου το γονίδιο FE4 είναι επικρατέστερο, τα άτομα που φέρουν το ανθεκτικό γονίδιο της AChE, εμφανίζονται τόσο με την πράσινη όσο και με την κόκκινη μορφή (Moore et al. 1994b, Devonshire et al. 1998).

Η ανθεκτική AChE, προσδίδει στο *M. persicae* ανθεκτικότητα στο pirimicarb και το triazamate. Πρόκειται για δυο αποτελεσματικά αφιδοκτόνα, που ανήκουν στην οικογένεια των διμεθυλοκαρβαμιδικών. Λόγω όμως της ανθεκτικότητας που έχει αναπτυχθεί δεν μπορούν να χρησιμοποιούνται πλέον με αποτελεσματικότητα. Παρατηρήθηκε ότι άτομα με το γονίδιο της ανθεκτικής AChE, δεν είναι ανθεκτικά σε ένα μεγάλο εύρος οργανοφωσφορικών και μεθυλο-καρβαμιδικών εντομοκτόνων. Το χαρακτηριστικό λοιπόν που προάγει την ανθεκτικότητα είναι η παρουσία δυο διπλών δεσμών αζώτου στα μόρια των εντομοκτόνων (Devonshire et al. 1998).

Παρά το γεγονός ότι σε άλλα είδη εντόμων, έχει εντοπιστεί ότι η αλλαγή της AChE οφείλεται σε μια ή περισσότερες μεταλλάξεις που αλλάζουν τη σειρά των αμινοξέων κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, οι αλλαγές που συμβαίνουν στο



Εικόνα 5. Απεικόνιση της διόδου νατρίου και της μετάλλαξης kdr όπου η φαινυλανίνη αντικαταστάθηκε από λευκίνη (Brogdon et al. 1998)

ένζυμο στην περίπτωση του *M. persicae* δεν έχουν εντοπιστεί ακόμα. (Εικόνα 4)

Τροποποιημένη διόδος νατρίου (kdr ανθεκτικότητα)

Ο σπουδαιότερος μηχανισμός ανθεκτικότητας του *M. persicae* στα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, είναι η τροποποίηση της διόδου νατρίου στο νευρικό σύστημα. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω ο μηχανισμός με τις αυξημένες εστεράσες προσδίδει και αυτός ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή αλλά είναι δευτερεύουσας σημασίας σε σχέση με την kdr. Η kdr ανθεκτικότητα ανιχνεύτηκε πρόσφατα στο *M. persicae* και το γεγονός ότι μπορεί να συνυπάρχει με το μηχανισμό των ενισχυμένων εστερασών οφείλεται στη στενή τους σχέση, σε κάποιους κλώνους (Martinez-Torres et al. 1999, Devonshire et al. 1998).

Μετά από πειράματα που έγιναν για την εκτίμηση της ανθεκτικότητας του *M. persicae* στο deltamethrin, βρέθηκε ότι σε άτομα που δεν είχαν τον kdr μηχανισμό, παρά τα υψηλά επίπεδα των εστερασών, η ανθεκτικότητα ήταν πολύ μικρή. Σε άτομα που υπήρχε μόνο ο μηχανισμός kdr η ανθεκτικότητα εξαπλασιάστηκε (Martinez-Torres et al. 1999).

Μετά από ανάλυση κλώνων της αφίδας, που είχαν συλλεχθεί πριν από πολλά χρόνια και διατηρούνταν στο εργαστήριο, βρέθηκε ότι ο μηχανισμός της τροποποιημένης διόδου νατρίου υπήρχε πολύ καιρό πριν αλλά ανιχνεύτηκε με την εξέλιξη των μοριακών μεθόδων. Ο μηχανισμός ανθεκτικότητας kdr οφείλεται σε μια μετάλλαξη, όπου το αμινοξύ λευκίνη αντικαταστάθηκε από το αμινοξύ φαινυλανίνη στην περιοχή της IIS6 μεταμεμβράνης του γονιδίου του παράτυπου της διόδου νατρίου (Εικόνα 5). Αυτή η μετάλλαξη πρώτη φορά διαπιστώθηκε σε οικιακές μύγες

και κατασαρίδες και στη συνέχεια βρέθηκε σε πολλά είδη εντόμων μέσα στα οποία είναι και το *M. persicae* (Martinez-Torres et al. 1999).

Σε Αγγλικούς πληθυσμούς της αφίδας, βρέθηκε ότι υπάρχει μεγάλη συσχέτιση μεταξύ του μηχανισμού kdr και της ενίσχυσης του γονιδίου E4. Κάτι τέτοιο δεν ίσχυε όμως για το γονίδιο FE4. Αυτό το συμπέρασμα όμως δεν μπορεί να γενικευτεί. Σε αφίδες που προέρχονταν από 15 χώρες βρέθηκε ότι 5 στους 30 κλώνους με ενισχυμένα γονίδια E4, δεν είχαν το μηχανισμό ανθεκτικότητας kdr (Field et al. 1997). Γενικά δεν είναι γνωστό αν η σχέση μεταξύ των δυο μηχανισμών ανθεκτικότητας υποδηλώνει στενή σύνδεση σε ένα χρωμόσωμα. Είναι πιθανότερο η μετάλλαξη στη δίοδο νατρίου να συνέβη σε ένα άτομο που είχε ήδη ενισχυμένο το γονίδιο E4. Το άτομο αυτό μετέφερε στους απογόνους του το μεγάλο πλεονέκτημα της επιλογής, δηλαδή να επιζούν αναπτύσσοντας ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα ανάλογα με την περίπτωση. Το χαρακτηριστικό αυτό μεταφέρθηκε και καθιερώθηκε μέσα σε έναν κλώνο. Τα αρσενικά από τον κλώνο αυτό πέρασαν τη μετάλλαξη της δίοδου νατρίου, μέσω της σεξουαλικής αναπαραγωγής σε γενότυπους που είχαν ενισχυμένο γονίδιο FE4 (Devonshire et al. 1998).

4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΕ ENTOMA

4.1 Γενικά

Η γενετική παραλλακτικότητα και η ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα, όπως ήδη αναφέρθηκε, είναι δυο μεγάλα θέματα που απασχόλησαν και απασχολούν τους επιστήμονες. Η περισσότερη έρευνα που γίνεται σε αυτούς τους τομείς επικεντρώνεται στην εξέταση των εκάστοτε οργανισμών σε μοριακό επίπεδο (DNA), ώστε να γίνει λεπτομερέστερη ανάλυση και σαφώς πιο ακριβής εξαγωγή συμπερασμάτων. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί πολλές τεχνικές που χρησιμοποιούνται σε τέτοιου είδους μελέτες. Συγκεκριμένα, υπάρχει μεγάλο εύρος μεθόδων και προσεγγίσεων για τον καθορισμό και την αποκρυπτογράφηση των αλληλουχιών του DNA. Ο βαθμός επιτυχίας της κάθε μεθόδου βασίζεται στο επίπεδο της τεχνολογίας που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων και σε αυτό ακριβώς βασίζεται η αξιοπιστία της από τον ερευνητή που τη χρησιμοποιεί.

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

Οι μοριακοί δείκτες που είναι γενετικά χαρτογραφημένοι είναι χρήσιμοι για τη μελέτη της κληρονομικότητας γενετικών χαρακτηριστικών και της ποικιλομορφίας μεταξύ των ατόμων πληθυσμών και ως σύγχρονα εργαλεία χρησιμοποιούνται και στο χρωμοσωμικό βάδισμα για απομόνωση γονιδίων. Οι γενετικοί χάρτες είναι μια

συλλογή στατιστικών εκτιμήσεων πολλών δεδομένων από τη κατανομή των δεικτών σε πολλούς γονιδιακούς τόπους. Οι γενετικοί δείκτες που χρησιμοποιούνται είναι λειτουργικά γονίδια, τα οποία επηρεάζουν το φαινότυπο ενώ οι μοριακοί δείκτες είναι τυχαία επιλεγμένα τμήματα του DNA χωρίς άμεση επίδραση στο φαινότυπο και δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον μια και αξιοποιούν τον πολυμορφισμό που παρουσιάζεται στην αλληλουχία των βάσεων του DNA, χωρίς αναγκαία επίπτωση στα προϊόντα που τυχόν κωδικοποιούν. Επιπλέον, δεν εξαρτώνται από το αναπτυξιακό στάδιο του οργανισμού και δύνανται να καλύψουν ολόκληρο το γονιδίωμα σε προβλεπόμενες γενετικές αποστάσεις (Χατζόπουλος 2001).

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

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

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

ανάπτυξης των οργανισμών και συγκεκριμένα όταν αυτοί αναπτυχθούν τόσο, ώστε να απομονωθεί ικανοποιητική ποσότητα DNA.

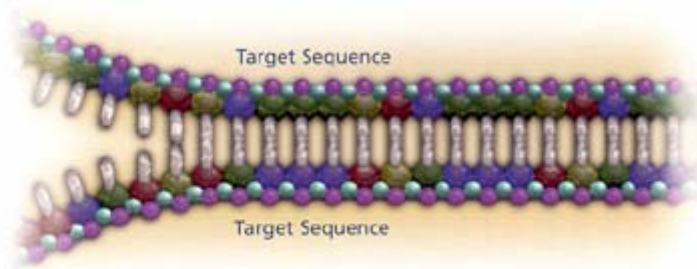
Η φύση των μοριακών δεικτών εξαρτάται άμεσα από τη μεθοδολογία που χρησιμοποιείται για την αξιοποίησή τους. Οι μεθοδολογίες που χρησιμοποιούνται εξελίσσονται συνεχώς και η χρήση της μιας ή της άλλης εξαρτάται από το ποσοστό επιθυμίας σάρωσης των χρωμοσωμάτων με τους μοριακούς δείκτες, από το χρόνο, από το κόστος, αλλά επίσης και από το βαθμό ετεροζυγωτίας. Παρακάτω αναφέρονται οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθοδολογίες μέχρι σήμερα που δίνουν ένα καλό βαθμό επαναληψιμότητας.

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

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

Η αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι μια μοριακή τεχνική που χρησιμοποιείται για την *in vitro* ενίσχυση (δημιουργία πολλών αντιγράφων) ενός τμήματος DNA. Η PCR επιτρέπει σε μια μικρή ποσότητα DNA να αντιγραφεί πολλές φορές ώστε να είναι αρκετή και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ανάλυση. Η τεχνική αυτή είναι πολύ διαδεδομένη στις βιολογικές επιστήμες και χρησιμοποιείται σε πολλές και διαφορετικές περιπτώσεις όπως: ανίχνευση κληρονομήσιμων ασθενειών, διάγνωση μολυσματικών ασθενειών, κλωνοποίηση γονιδίων, test πατρότητας κ.α. (Sambrook & Russell 2001, McPherson & Moller 2000, Higuchi et al. 1992, Higuchi et al. 1993, Wong 2005)

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



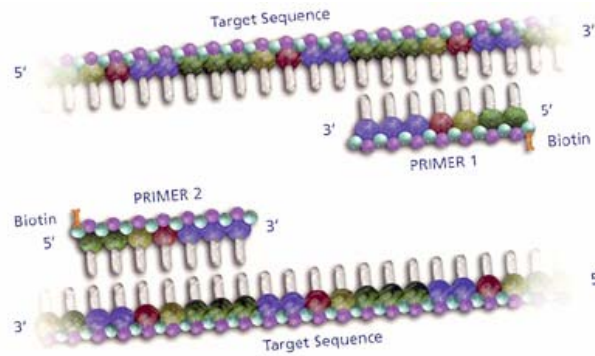
Εικόνα 6. Διαχωρισμός της δίκλωνης αλυσίδας DNA.

Η DNA πολυμεράση βρίσκεται στη φύση σε ζωντανούς οργανισμούς και η λειτουργία της είναι ο διπλασιασμός του DNA στη φάση του διαχωρισμού των κυττάρων κατά τη διάρκεια της μίτωσης και της μείωσης. Στο εργαστήριο, με την τεχνική PCR το ένζυμο καθοδηγείται στην αλληλουχία που επιδιώκεται να αντιγραφεί από βραχέα ολιγονουκλεοτίδια που δρουν ως εκκινητές (primers), τα οποία υβριδίζονται με την αρχή και το τέλος του εκμαγείου της επιθυμητής αλληλουχίας του DNA. Οι εκκινητές σχεδιάζονται έτσι ώστε να υποβοηθούν την εκκίνηση της αντιγραφής του DNA σε κάθε κλώνο του αρχικού δίκλωνου DNA. Οι εκκινητές παρασκευάζονται με χημική σύνθεση και για αυτό η τεχνική PCR χρησιμοποιείται μόνο για την κλωνοποίηση κλασμάτων DNA με γνωστή αλληλουχία των δυο άκρων τους. Υπό την καθοδήγηση των εκκινητών η DNA πολυμεράση παράγει πολλά αντίγραφα της επιλεγμένης αλληλουχίας. Η τεχνική PCR είναι εξαιρετικά ευαίσθητη: μπορεί να ανιχνεύσει, έστω και ένα αντίγραφο μιας αλληλουχίας DNA σε ένα δείγμα, επαυξάνοντας το τόσο πολύ ώστε να μπορεί να ανιχνευθεί με κατάλληλη χρώση μετά από διαχωρισμό με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή (Alberts et al. 1998).

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

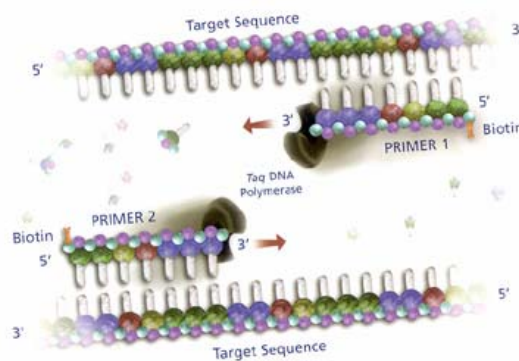
(1) Το δίκλωνο μόριο του DNA πρέπει να θερμανθεί στους 94-96°C έτσι ώστε να χωριστεί σε δυο μονόκλωνες αλυσίδες (Εικόνα 6). Η υψηλή θερμοκρασία σπάει τους δεσμούς υδρογόνου που συνδέουν τις δυο αλυσίδες μεταξύ τους και έτσι διαχωρίζονται. Αυτό το στάδιο ονομάζεται **αποδιάταξη** και ο χρόνος που συνήθως διαρκεί είναι 1-2 λεπτά

(2) Αφού γίνει ο διαχωρισμός των δυο αλυσίδων του DNA, η θερμοκρασία χαμηλώνει ώστε οι εκκινητές να μπορούν να προσκολληθούν σε κάθε μια από τις



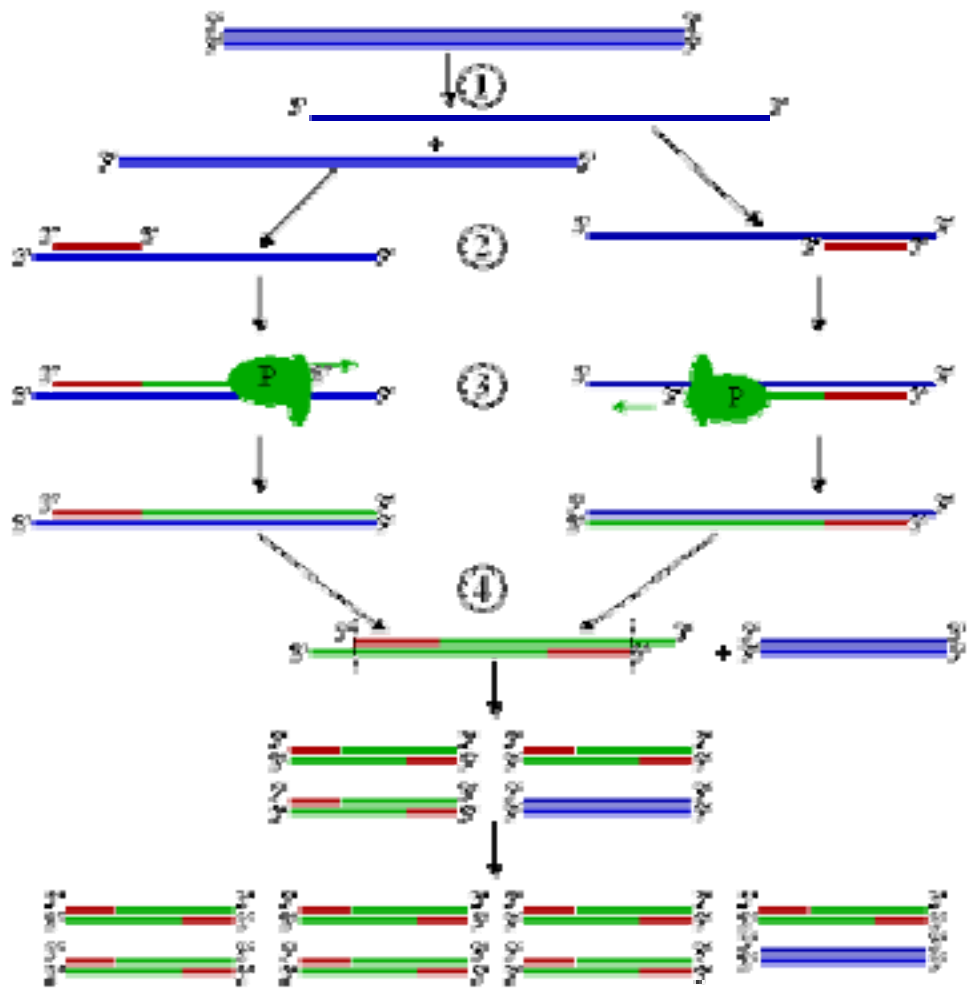
Εικόνα 7. Συγκόλληση των εκκινητών σε κάθε μια από τις μονές αλυσίδες του DNA.

μονές αλυσίδες (Εικόνα 7). Αυτό το στάδιο ονομάζεται **συγκόλληση**. Η θερμοκρασία αυτού του σταδίου εξαρτάται από τους εκκινητές και είναι συνήθως 5 °C χαμηλότερα από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (T_m). Συνήθως η θερμοκρασία αυτή κυμαίνεται από 45 μέχρι 60°C και έχει μεγάλη σημασία γιατί αν δεν είναι η ιδανική για τον εκάστοτε εκκινητή που χρησιμοποιείται, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη μη συγκόλληση του εκκινητή στη μονόκλωνη αλυσίδα του DNA ή την συγκόλλησή του σε τυχαία θέση. Η διάρκεια του σταδίου της συγκόλλησης κυμαίνεται από 1 έως 2 λεπτά.



Εικόνα 8. Συγκόλληση των εκκινητών και δημιουργία δυο δίκλωνων μορίων DNA.

(3) Τέλος, η DNA-πολυμεράση πρέπει να συμπληρώσει τις αντίστοιχες αλληλουχίες στη κάθε αλυσίδα που συγκολλήθηκαν οι εκκινητές. Ξεκινάει από τον εκκινητή και συνεχίζει κατά μήκος της αλυσίδας (Εικόνα 8). Αυτό το στάδιο ονομάζεται **επέκταση** και η θερμοκρασία εξαρτάται από τη DNA-πολυμεράση.



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

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

Όλα τα στάδια της PCR και η λογική της μεθόδου παρουσιάζονται αναλυτικά στο Σχήμα 4.

4.2 Μέθοδοι

4.2.1 Αλλοένζυμα

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

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

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

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

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

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

- (1) αλλαγές βάσεων της θέσης υβριδισμού καθιστώντας τη μη αναγνωρίσιμη από τον εκκινητή,
- (2) απάλειψη της θέσης υβριδισμού,
- (3) προσθήκες ή ελλείψεις τμημάτων DNA που διαφοροποιούν το μέγεθος της αλληλουχίας που ενισχύεται με αποτέλεσμα να εμφανίζονται διαφορετικές ζώνες στην ηλεκτροφόρηση.

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

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

Λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζουν τα RAPD ως μέθοδος μοριακής ανάλυσης, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτατα σε μελέτες γενετικής πληθυσμών αλλά και διαχωρισμού μεταξύ ειδών. Χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία 5 εκκινητές RAPD, για να διαχωρίσουν το είδος αφίδας *Sitobion avenae* (Fabricius) από το *Sitobion fragariae* (Walker) (Hemiptera: Aphididae) καθώς και για μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας των ειδών αυτών (Figuera et al. 1999). Σε μια διαφορετική μελέτη που έγινε το 2000, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RAPD σε αφίδες προκειμένου να διαχωριστούν άτομα που ανήκουν στο σύμπλοκο *M. persicae* (*M. persicae nicotiana* και *M. persicae* s.str.) από τρία διαφορετικά είδη του γένους *Myzus* (*M. cerasi* (F.), *M. hemerocallis* Takahashi, και *M. varians* Davinson) (Clements et al. 2000). Ένα χρόνο αργότερα, από μια διαφορετική επιστημονική ομάδα χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RAPD με σκοπό να εκτιμηθεί η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ πληθυσμών της αφίδας *M. persicae* (Zitoudi et al. 2001).

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

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

Πολυμορφισμός παρατηρείται σε ένα πρότυπο περιορισμένων τμημάτων DNA όταν συμβεί κάποια μετάλλαξη, έλλειψη ή προσθήκη βάσης στη συγκεκριμένη θέση αναγνώρισης από το ένζυμο περιορισμού. Επίσης πολυμορφισμός μπορεί να συμβεί και από τη δημιουργία ή εξάλειψη μιας νέας θέσης αναγνώρισης από ένθεση ή απαλοιφή περιοχών DNA. Όλες αυτές οι περιπτώσεις οδηγούν σε αλλαγές του μεγέθους του τμήματος του DNA μετά από τη δράση του ενζύμου περιορισμού. Όταν γονιδιωματικό DNA κόβεται με ένα ένζυμο περιορισμού το πρότυπο τμημάτων στην πηκτή αгарόζης δεν είναι διακριτό αλλά διάχυτο, οπότε χρησιμοποιείται η μέθοδος του υβριδισμού με ραδιενεργά σημασμένο ή χημικά τροποποιημένο ανιχνευτή ώστε να εμφανιστεί το πρότυπο των πολυμορφικών ζωνών (Wicker 1974, Allen & Bodowle 1994, Beebe & Rowe 2004).

Οι δείκτες RFLP χρησιμοποιούνται επίσης για την ταυτοποίηση περιοχών του γονιδιώματος καθώς και στην εκτίμηση της ποικιλομορφίας σε τράπεζες γενετικού

υλικού. Γενικά πρόκειται για μια απλή και αξιόπιστη μέθοδο με υψηλή επαναληψιμότητα. Δεν παύει όμως να έχει κάποια μειονεκτήματα όπως το ότι πρόκειται για μια χρονοβόρο διαδικασία, έχει υψηλό κόστος ανάλυσης και ορισμένες φορές για καλύτερα αποτελέσματα χρησιμοποιείται ραδιενέργεια (Χατζόπουλος, 2001). Το 1999 χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP για την ανάλυση μιτοχονδριακού DNA και πλασμιδίων συμβιωτικών βακτηρίων του είδους *Buchnera*, προκειμένου να μελετηθεί η γενετική παραλλακτικότητα της αφίδας *Acyrtosiphon pisum* (Harris) (Hemiptera: Aphididae). Μέσω αυτής της μεθόδου διαπιστώθηκε ότι η διαφοροποίηση βιοτύπων της συγκεκριμένης αφίδας έχει γίνει εδώ και 100.000 χρόνια (Birkle et al. 1999). Με τη χρήση της μεθόδου RFLP μπορεί επίσης να γίνει αναγνώριση μεταλλάξεων ή άλλων λειτουργιών του γενώματος όπως π.χ. έγινε από τους Cassanelli et al. (2005) όπου χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος RFLP για τη διάγνωση μηχανισμών ανθεκτικότητας στην αφίδα *M. persicae*.

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

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

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

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

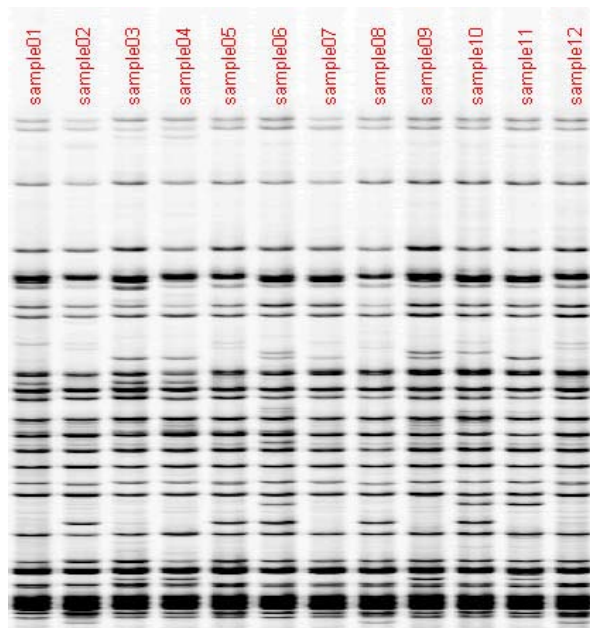
Για το λόγο αυτό, μια επιπρόσθετη επιλογή ενίσχυσης μιας υποομάδας τμημάτων DNA επιτρέπει την ελάττωση της πολυπλοκότητας του προτύπου των ζωνών. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικά σχεδιασμένων εκκινητών PCR που έχουν μια αλληλουχία ομόλογη με τον προσαρμοστή και επιπλέον «επιλεκτικά νουκλεοτίδια»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

Ο πολυμορφισμός των μοριακών δεικτών με τη μέθοδο AFLP εντοπίζεται από την παρουσία ή απουσία κάποιας ζώνης που οφείλεται: (α) στις διαφορές των θέσεων

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

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

Τα ενισχυμένα προϊόντα όλων των παραπάνω μεθοδολογιών, διαβάζονται όπως ήδη είπαμε ως ζώνες διαφορετικού μεγέθους, σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (Εικόνα 9). Πρόκειται για ζώνες που προέκυψαν μετά από επεξεργασία με τη μέθοδο AFLP αλλά και οι υπόλοιπες μεθοδολογίες παρουσιάζουν παρόμοια μοτίβα.



Εικόνα 9. Εμφάνιση ενισχυμένων τμημάτων με τη μέθοδο AFLP, σε πηκτή πολυακρυλαμίδης.

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

Όλες αυτές οι μεθοδολογίες αναφέρονται σε μικρές συνεχείς επαναλήψεις απλών αλληλουχιών 2, 3, ή 4 νουκλεοτιδίων. Τέτοιες επαναλαμβανόμενες αλληλουχίες παρουσιάζουν υψηλό πολυμορφισμό σε πολλά γονιδιώματα και συχνά έχουν αρκετά ευδιάκριτη αλληλομορφία ανά τόπο και επίσης υψηλή συχνότητα ετεροζυγωτίας στους διάφορους πληθυσμούς. Έτσι, μοριακοί δείκτες που προέρχονται από αυτές τις μεθοδολογίες είναι αρκετά χρήσιμοι. Οι πολυμορφισμοί εντοπίζονται με την ενίσχυση γνωστών γενετικών τόπων με συγκεκριμένους εκκινητές συμπληρωματικούς των αλληλουχιών εκατέρωθεν των άκρων τους. Εμφανίζονται σαν ζώνες ηλεκτροφόρησης με διαφορετικό μέγεθος που οφείλεται στις διαφορές των επαναλαμβανόμενων απλών αλληλουχιών και χαρακτηρίζονται από συγκυριαρχία. Το πλεονέκτημα αυτό επιτρέπει την εύκολη διάκριση των ετεροζύγων ατόμων. Η ταυτοποίηση κατάλληλων γενετικών τόπων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μοριακοί δείκτες με τις μεθοδολογίες αυτές, απαιτεί εξειδικευμένες διαδικασίες κλωνοποίησης συγκεκριμένων τμημάτων DNA και προσδιορισμό της αλληλουχίας εκατέρωθεν των άκρων ώστε να σχεδιαστούν

κατάλληλοι εκκινητές. Αυτό είναι ένα σοβαρό μειονέκτημα γιατί: (α) έχει αυξημένο κόστος, (β) απαιτεί σχετικά σημαντικό χρόνο και (γ) απαιτεί εξειδικευμένο προσωπικό (Wicker 1974, Ansorge et al. 1997, Χατζόπουλος 2001, Beebee & Rowe 2004).

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

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

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

ηλεκτροφόρηση και έτσι να εντοπιστεί ο πολυμορφισμός (Wicker 1974, Alen & Budowle 1994, Sunnucks 2000).

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

4.3 Πλεονεκτήματα-μειονεκτήματα μεθόδων

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

5. ΜΙΚΡΟΔΟΡΥΦΟΡΟΙ (MICROSATELLITES)

5.1 Γενικά

Στους απλούς οργανισμούς, όπως τα βακτήρια και οι ιοί, το DNA παρουσιάζεται ως ένα απλό μόριο το οποίο αποτελείται από χιλιάδες εκατομμύρια ζεύγη νουκλεοτιδίων που είναι απαραίτητα για να κωδικοποιήσουν τις πληροφορίες που καθορίζουν τους μικροοργανισμούς. Σε ανώτερους οργανισμούς, όπως είναι τα πουλιά και τα θηλαστικά, δισεκατομμύρια ζεύγη νουκλεοτιδίων καθορίζουν τις γενετικές πληροφορίες και υποδιαιρούνται σε πολλά μόρια. Το γονιδίωμα των πολυκύτταρων ευκαρυωτών, εκτός από ιντρόνια, περιέχει επιπλέον και μια μεγάλη ποσότητα φαινομενικά μη απαραίτητων αλληλουχιών DNA. Οι περισσότερες από αυτές τις αλληλουχίες δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες αλλά ούτε και μεταφράζονται (Beridze 1986, Alberts et al. 1998)

Στο ανθρώπινο γονιδίωμα, περίπου το 70 % του συνολικού DNA αποτελείται από το αποκαλούμενο DNA με μοναδική αλληλουχία (unique sequence DNA). Σε αυτό περιλαμβάνεται το DNA που κωδικοποιεί πρωτεΐνες, τα περισσότερα είδη του RNA και το DNA των ιντρονίων. Στο υπόλοιπο 30 % περιλαμβάνονται αλληλουχίες νουκλεοτιδίων που επαναλαμβάνονται πολλές φορές στο γονιδίωμα. Το μεγαλύτερο μέρος αυτού του επαναλαμβανόμενου DNA δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες και διακρίνεται σε δυο είδη. Περίπου το ένα τρίτο αποτελείται από επαναληπτικές βραχείες αλληλουχίες που σχηματίζουν μια σειρά από συστοιχίες επαναλήψεων του DNA γνωστές ως **δορυφορικό DNA** (satellite DNA). Το δορυφορικό DNA δεν έχει κάποια γνωστή λειτουργία και συνήθως συγκεντρώνεται στα κεντρομερίδια και στα άκρα των χρωμοσωμάτων. Η ακριβής διάταξη του δορυφορικού DNA ποικίλει πολύ μεταξύ οργανισμών του ίδιου είδους. Στο δορυφορικό DNA υπάρχουν συνδυασμοί ζευγών νουκλεοτιδίων, οι οποίοι επαναλαμβάνονται και σχηματίζουν ομάδες γνωστές ως **μικροδορυφόροι** (microsatellites). Μέσα στο γένωμα μπορεί να υπάρχουν τυχαία κατανεμημένοι, χιλιάδες ή εκατοντάδες χιλιάδες μικροδορυφόροι (Alberts et al. 1998, Sunnucks 2000, Beebees & Rowe 2004).

Οι μικροδορυφόροι είναι μικρά τμήματα DNA που αποτελούνται από μια επαναλαμβανόμενη αλληλουχία νουκλεοτιδίων, όπως π.χ. CACACACA και συνήθως υπάρχουν σε μη κωδικοποιημένες περιοχές του DNA. Πολλά από τα επαναλαμβανόμενα τμήματα έχουν τη τάση να συγκεντρώνονται σε ένα

συγκεκριμένο γονιδιακό τόπο (locus). Σε κάθε μικροδορυφόρο η επαναλαμβανόμενη αλληλουχία είναι πολύ απλή και αποτελείται από δυο, τρία ή τέσσερα νουκλεοτίδια τα οποία μπορεί να επαναλαμβάνονται από 10 έως 100 φορές. Στους διπλοειδείς οργανισμούς, όπως τα θηλαστικά, κάθε ένα άτομο πρέπει να έχει δυο αντίγραφα του ίδιου μικροδορυφόρου (Beridze 1986, Goldstein & Schlotterer 1999, Beebe & Rowe 2004).

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

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

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

Σε σπάνιες περιπτώσεις το ένζυμο DNA πολυμεράση, σε συνδυασμό με τη δράση των μικροδορυφόρων, μπορεί να φτιάξει ένα επιπλέον αντίγραφο CA (ή οποιοδήποτε άλλο συνδυασμό ανάλογα με τη περίπτωση). Αν αυτό το αντίγραφο προσκολληθεί στην υπόλοιπη αλληλουχία του μικροδορυφόρου, ολόκληρο το τμήμα

που θα είναι κατά ελάχιστα μεγαλύτερο του αρχικού, μπορεί να μεταφερθεί στους απογόνους. Αυτή η διαδικασία επαναλαμβάνεται από γενιά σε γενιά και με το πέρασμα του χρόνου, εφόσον τα άτομα ενός πληθυσμού αναπαράγονται σεξουαλικά, γίνεται ανασυνδυασμός των μικροδορυφόρων. Έτσι ο πληθυσμός διατηρεί μια ποικιλία μικροδορυφόρων που είναι χαρακτηριστική για το συγκεκριμένο πληθυσμό και επιπλέον τον διαχωρίζει από άλλους πληθυσμούς που δεν αναπαράγονται σεξουαλικά (Beridze 1986, Beebe & Rowe 2004).

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

Ένα άτομο που είναι ομοζύγωτο, έχει τον ίδιο αριθμό επαναλαμβανόμενων τμημάτων και στα δυο χρωμοσώματα ενώ ένα ετεροζύγωτο έχει διαφορετικό αριθμό επαναλαμβανόμενων τμημάτων στα δυο χρωμοσώματα. Οι περιοχές του γενώματος που βρίσκονται γύρω από τον μικροδορυφόρο ονομάζονται πλευρικές (**flanking regions**) και έχουν την ίδια αλληλουχία ανάμεσα σε διαφορετικά άτομα (**Εικόνα 10**). Αν οι περιοχές αυτές είναι γνωστές μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν βάση για το σχεδιασμό εκκινητών για τη PCR ενίσχυση της περιοχής του μικροδορυφόρου. Επιπλέον οι περιοχές αυτές μπορούν να διατηρηθούν μεταξύ ατόμων του γένους και πολλές φορές ακόμα και μεταξύ οικογενειών. Παρακάτω παρουσιάζεται η αλληλουχία δυο ομόλογων χρωμοσωμάτων ενός διπλοειδούς οργανισμού (ένας κλώνος από κάθε χρωμόσωμα) (Goodman & Simon 1998, Kashi & Soller 1999, Moxon & Wills 1999, Schlotterer & Christian 2000).

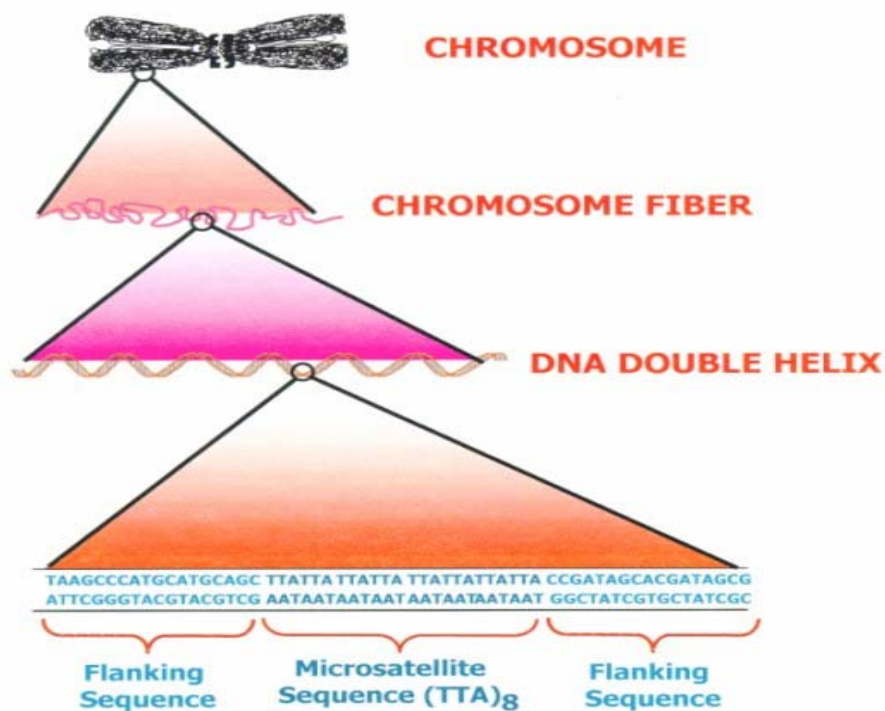
✓ **Ομοζυγώτης:** Και οι δυο κλώνοι των χρωμοσωμάτων έχουν 7 επαναλήψεις CT.

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTA**CT**ACGTGG...
...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTA**CT**ACGTGG...

5' πλευρική περιοχή μικροδορυφόρος 3' πλευρική περιοχή

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

...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTA**CT**ACGTGG...
...CGTAGCCTTGCATCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTATCGGTA**CT**ACGTGG...



Εικόνα 10. Ανατομία ενός μικροδορυφόρου.

Όταν εξεταστεί ένας συγκεκριμένος μικροδορυφόρος σε πολλά άτομα π.χ. του *M. persicae* που προήλθαν από διαφορετικές περιοχές, είναι πιθανό να παρουσιαστεί, σε ορισμένα, μεγάλος βαθμός παραλλακτικότητας στην τοποθεσία του μικροδορυφόρου. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι πολύ καλό γιατί επιτρέπει στους επιστήμονες να χρησιμοποιήσουν τη συγκεκριμένη περιοχή του μικροδορυφόρου ως έναν δυνητικό δείκτη και επιπλέον να εκμεταλλευτούν την παραλλακτικότητα της περιοχής αυτής προκειμένου να διαχωρίσουν είδη, οικογένειες ή ακόμα και πληθυσμούς ζώων. Η παραλλακτικότητα που παρουσιάζει ένας μικροδορυφόρος οφείλεται στο διαφορετικό αριθμό νουκλεοτιδίων που απαρτίζουν μια αλληλουχία. Έτσι κάθε περιοχή με διαφορετικό αριθμό επαναλαμβανόμενων μονάδων, απαρτίζει ένα **αλληλόμορφο**. Τέλος η περιοχή που εμφανίζει παραλλακτικότητα ως προς ένα μικροδορυφόρο είναι γνωστή σαν **πολυμορφική περιοχή** (Beridze 1986, Beebe & Rowe 2004).

Μια πολυμορφική περιοχή χαρακτηρίζεται κατάλληλη, όταν από αυτή μπορούν να καθοριστούν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ατόμων, ενός είδους. Δηλαδή όταν η περιοχή αυτή δείχνει ότι μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη σχέση που μπορεί να έχουν τα άτομα που εξετάζονται μεταξύ τους. Για παράδειγμα, να μπορεί να

διαχωρίζει: αδέρφια μεταξύ τους, ετεροθαλείς από αμφιθαλείς συγγενείς, γονείς από απογόνους ή γενικότερα να δίνει πληροφορίες για την ποικιλομορφία και τη συγγένεια που μπορεί να υπάρχει μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού (Beridze 1986, Beebee & Rowe 2004).

Οι μικροδορυφόροι στις γενετικές μελέτες χρησιμοποιούνται ως μοριακοί δείκτες. Αυτό σημαίνει ότι ειδικά σχεδιασμένοι εκκινητές στις πλευρικές περιοχές του μικροδορυφόρου ενισχύουν μέσω αντίδρασης PCR τον μικροδορυφορικό τόπο. Τα προϊόντα της PCR εξετάζονται μετά από ηλεκτροφόρησή τους σε πηκτή πολυακρυλαμίδης. Στην πηκτή τα προϊόντα αυτά εμφανίζονται σαν ζώνες. Συνήθως, στην πηκτή διακρίνονται και κάποιες επιπλέον αχνές ζώνες που είναι ελαφρώς μεγαλύτερου μεγέθους από τις κανονικές. Αυτό συμβαίνει γιατί κατά τη διάρκεια της PCR δεν γίνεται σωστός διαχωρισμός και κάποια αντίγραφα αποκτούν ένα ή περισσότερα επαναλαμβανόμενα τμήματα και γίνονται μεγαλύτερα σε μήκος. Σε εξελιγμένα εργαστήρια υπάρχουν και μηχανήματα αλληλούχισης (sequencer) στα οποία μπορεί επίσης να γίνει η ανάλυση των ενισχυμένων προϊόντων (Beridze 1986, Allen & Budowle 1994, Beebee & Rowe 2004).

Στη αναζήτηση βιβλιογραφίας, βρέθηκε ότι οι μικροδορυφόροι συχνά αναφέρονται με διαφορετικά ονόματα όπως **STR** (Short Tandem Repeats) και **VNTR** (Variable Number Tandem Repeats). Οι δυο αυτές έννοιες εννοούν τους μικροδορυφόρους αλλά έχουν μια μικρή διαφορά όσον αφορά το μέγεθος των επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων. Γενικά, ο όρος της συνεχούς επανάληψης (**Tandem Repeat**), που αναφέρεται και στις δυο ονομασίες είναι γενετικός και περιγράφει ένα πρότυπο το οποίο χρησιμοποιείται στον καθορισμό κληρονομήσιμων γνωρισμάτων μεταξύ ατόμων. Οι συνεχείς επαναλήψεις του DNA στην ουσία είναι δυο ή περισσότερα νουκλεοτίδια τα οποία βρίσκονται σε μια σειρά μέσα στο γένωμα και επαναλαμβάνονται χωρίς να διακόπτονται από διαφορετικές βάσεις. Ένα παράδειγμα συνεχούς επανάληψης αποτελεί η αλληλουχία ATTCGATTCGATTCG, όπου η ομάδα ATTCG επαναλαμβάνεται τρεις φορές. Στην περίπτωση των STR το πρότυπο των επαναλαμβανόμενων νουκλεοτιδίων μπορεί να έχει μήκος από 2 έως 10 ζεύγη βάσεων (bp) και το τελικό μέγεθος πρέπει να είναι μικρότερο από 100 bp. Τέτοιου είδους συνεχόμενες επαναλήψεις νουκλεοτιδίων είναι πολύ χρήσιμες σε πολλές ερευνητικές διαδικασίες, όπως ο καθορισμός των γονέων και ο γενεαλογικός προσδιορισμός των ατόμων (Goodman & Simon 1998, Kashi & Soller 1999, Moxon & Wills 1999, Schlotterer & Christian 2000).

Ο μεταβλητός αριθμός συνεχών επαναλήψεων (VNTR) πρόκειται για μια μικρή αλληλουχία νουκλεοτιδίων, τα οποία βρίσκονται σε ομάδες συνεχόμενων επαναλήψεων και ο αριθμός τους κυμαίνεται από 14 έως 100. Τέτοιου είδους ομάδες βρίσκονται διασκορπισμένες σε πολλά χρωμοσώματα. Κάθε ομάδα αποτελεί ένα αλληλόμορφο και κληρονομούνται με συγκυριαρχία. Σε συνδυασμό με τη PCR, η χρήση των VNTRs είναι πολύ αποτελεσματική στις έρευνες που διεξάγονται στην εγκληματολογία. Μια άλλη πολύ χρήσιμη μεθοδολογία είναι ο συνδυασμός των VNTRs με ένζυμα περιορισμού. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την πέψη των ενζύμων δημιουργούν πρότυπα ζωνών μοναδικά για το κάθε άτομο που εξετάζεται και αναγνωρίζονται οπτικά με τη μέθοδο Southern blotting (Goodman & Simon 1998, Kashi & Soller 1999, Moxon & Wills 1999, Schlotterer & Christian 2000).

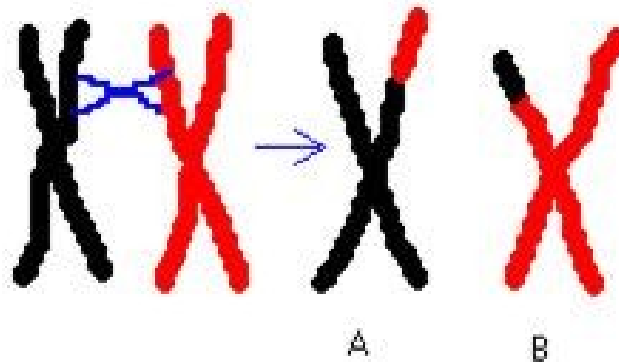
Οι μικροδορυφόροι βρίσκονται σε όλα τα φυτά και τα ζώα καθώς και σε πολλά είδη βακτηρίων. Κάποιοι μπορεί να βρίσκονται στην ίδια τοποθεσία του γονιδιώματος, όταν πρόκειται για ίδια ή πολύ στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους είδη. Αυτό σημαίνει ότι αν βρεθεί ένας κατάλληλος μικροδορυφόρος π.χ. για το *M. persicae*, μπορεί να γίνει αναγνώριση και διαχωρισμός ατόμων αυτού του είδους άσχετα με την τοποθεσία από την οποία προήλθαν οι συγκεκριμένες αφίδες (Beridze 1986, Beebe & Rowe 2004).

5.2 Μοντέλα που χρησιμοποιούνται για τις μεταλλάξεις των μικροδορυφόρων

Το γεγονός ότι οι μικροδορυφόροι μεταλλάσσονται πάρα πολύ γρήγορα και σε μεγάλο εύρος, απασχόλησε πάρα πολλούς επιστήμονες. Έτσι μετά από πολυετή έρευνα αναπτύχθηκαν κάποιες υποθέσεις που εξηγούν τους τρόπους με τους οποίους συμβαίνουν οι μεταλλάξεις και κάποια μοντέλα τα οποία επεξεργάζονται αυτές τις μεταλλάξεις (Jarne & Lagoda 1996).

5.2.1 «Γλίστρημα» της πολυμεράσης

Κατά τη διαδικασία αντιγραφής του DNA, η πολυμεράση χάνει τον προσανατολισμό της και είτε προσθέτει πολλές επαναλήψεις είτε προσπερνάει το σημείο αντιγραφής χωρίς να προσθέσει τίποτα. Το αποτέλεσμα αυτού του λάθους είναι η δημιουργία ενός θυγατρικού κλώνου με διαφορετικό αριθμό επαναλήψεων από το μητρικό. Το φαινόμενο αυτό εξηγεί μικρές αλλαγές στον αριθμό των



Εικόνα 11. Άνισος επιχιασμός χρωμοσωμάτων κατά τη διάρκεια της μείωσης
(<http://www.woodrow.org>)

επαναλαμβανόμενων τμημάτων καθώς και το πώς δημιουργούνται οι μικροδορυφόροι. Είναι πιθανό αλληλουχίες με δυο ή τρία επαναλαμβανόμενα τμήματα να κατανέμονται τυχαία μέσα στο γένωμα. Με το πέρασμα των χρόνων και την αλλαγή των γενεών αυτά τα μικρά τμήματα μπορούν να μετατραπούν, χάρη στο γλίστρημα της πολυμεράσης, σε πολύ μεγαλύτερα.

5.2.2 Άνισος επιχιασμός κατά τη διάρκεια της μείωσης

Αυτή η θεωρία εξηγεί περισσότερο δραστικές αλλαγές στον αριθμό των επαναλαμβανόμενων τμημάτων. Η Εικόνα 11 δείχνει ότι κατά τη διάρκεια του επιχιασμού των χρωμοσωμάτων, το χρωμόσωμα A διατήρησε πολλές επαναλήψεις ενώ το χρωμόσωμα B πολύ λίγες.

5.2.3 Μοντέλο βηματικής μετάλλαξης (Stepwise Mutation Model, SMM)

Αυτό το μοντέλο βασίζεται στο γεγονός ότι όταν οι μικροδορυφόροι μεταλλάσσονται αποκτούν ή χάνουν ένα επαναλαμβανόμενο τμήμα. Αυτό συνεπάγεται ότι όταν δυο αλληλόμορφα διαφέρουν μόνο κατά ένα επαναλαμβανόμενο τμήμα είναι πιο στενά συνδεδεμένα μεταξύ τους (έχουν ένα πρόσφατο κοινό πρόγονο) από ότι αλληλόμορφα που διαφέρουν κατά πολλά τέτοια τμήματα. Το μέγεθος των αλληλομόρφων σε αυτό το μοντέλο έχει πολύ μεγάλη σημασία. Η γενετική απόσταση που χρησιμοποιεί στη στατιστική ανάλυση αυτό το μοντέλο ονομάζεται **Rst**. Το SMM είναι το μοντέλο που συνήθως χρησιμοποιείται σε μελέτες οι οποίες εξετάζουν τις σχέσεις μεταξύ ατόμων και τη δομή πληθυσμών.

5.2.4 Μοντέλο των αλληλομόρφων "K"

Αυτό το μοντέλο βασίζεται στο γεγονός ότι ένας μικροδορυφόρος μπορεί να μεταλλαχτεί τυχαία σε ένα οποιοδήποτε αλληλόμορφο "K". Δέχεται το γεγονός ότι ένας μικροδορυφόρος που αποτελείται π.χ. από 8 επαναλαμβανόμενα τμήματα δεν είναι απαραίτητο να μεταλλαχτεί σε μια αλληλουχία που να περιέχει 7 ή 9 επαναλήψεις. Μπορεί με την ίδια ευκολία να μεταλλαχτεί σε μια οποιαδήποτε αλληλουχία που μπορεί να περιέχει π.χ 15 επαναλήψεις.

5.2.5 Μοντέλο απεριόριστων αλληλομόρφων (Infinite Alleles Model, IAM)

Κάθε μετάλλαξη μπορεί να δημιουργήσει τυχαία ένα νέο αλληλόμορφο. Έτσι, ένα αλληλόμορφο με 15 επαναλαμβανόμενα τμήματα μπορεί να έχει συγγένεια τόσο με κάποιο που έχει 10 όσο και με κάποιο άλλο που έχει 11. Αυτό που έχει σημασία είναι ότι πρόκειται για διαφορετικά αλληλόμορφα. Επομένως σε αυτό το μοντέλο το μέγεθος των αλληλομόρφων δεν έχει σημασία. Η στατιστική ανάλυση που χρησιμοποιεί αυτό το μοντέλο ονομάζεται **Fst**.

5.3 Οι μικροδορυφόροι ως γενετικό εργαλείο

Οι μικροδορυφόροι, όπως ήδη αναφέρθηκε, παρουσιάζουν μεγάλη παραλλακτικότητα. Σε μια τοποθεσία του γονιδιώματος, ένα άτομο μπορεί να έχει 10 επαναλήψεις ενός μικροδορυφόρου ενώ ένα άλλο άτομο του ίδιου είδους να έχει 15 ή 20. Η εξήγηση αυτού του φαινομένου δίνεται μέσω της ιδιότητας που έχουν οι μικροδορυφόροι να αλλάζουν μορφή πάρα πολύ γρήγορα. Οι αλλαγές αυτές οφείλονται κυρίως σε μεταλλάξεις που συμβαίνουν με την πάροδο του χρόνου. Έχει υπολογιστεί ότι οι μικροδορυφόροι μεταλλάσσονται 100 με 10.000 φορές, δηλαδή τόσο γρήγορα όσο διαρκεί η υποκατάσταση των ζευγών βάσεων σε μια αλληλουχία. Αυτή η ιδιότητα καθιστά τους μικροδορυφόρους χρήσιμο εργαλείο σε μελέτες εξέλιξης των ειδών, όταν αυτή έχει διαδραματιστεί σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα (εκατοντάδες ή χιλιάδες χρόνια). Αντίθετα η υποκατάσταση των ζευγών βάσεων δίνει χρήσιμες πληροφορίες για την εξέλιξη των ειδών σε μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα (εκατομμύρια χρόνια) (Beridze 1986, Beebe & Rowe 2004).

Οι μικροδορυφόροι, οι οποίοι καθορίζουν την παραλλακτικότητα σε κάθε τοποθεσία του γενώματος, χαρακτηρίστηκαν από τους επιστήμονες σαν νέα αλλοένζυμα. Συνεπώς χρησιμοποιούνται κυρίως σε εργασίες όπου παλιότερα

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

Οι Wilson et al. (2002) στην Αυστραλία, μελέτησαν τη γενετική δομή πληθυσμών της αφίδας *M. persicae*, συλλέγοντας πληθυσμούς του εντόμου από τον κύριο ξενιστή του, τη ροδακινιά *Prunus persicae* L. (Rosaceae). Το *M. persicae* βρίσκεται στην Αυστραλία από το 1893. Τα δείγματα συλλέχθηκαν την άνοιξη του 1998 από δυο περιοχές της ενδοχώρας και τρεις περιοχές της Τασμανίας. Οι ερευνητές εξέτασαν το βιολογικό κύκλο των αφίδων, τον καρυότυπό τους και τη γενετική δομή τους χρησιμοποιώντας 17 μικροδορυφόρους. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όλοι οι πληθυσμοί διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους ακόμη και αυτοί που προέρχονταν από κοντινές γεωγραφικές αποστάσεις (<50 km). Όλοι οι κλώνοι είχαν φυσιολογικό καρυότυπο εκτός από μια ομάδα κλώνων οι οποίοι μια εβδομάδα πριν συλληχθούν δέχτηκαν την επίδραση του καρβαμιδικού εντομοκτόνου pirimicarb. Οι συγκεκριμένοι κλώνοι ήταν ετεροζυγώτες και παρουσίαζαν A1, 3 χρωμοσωμική μετατόπιση, φαινόμενο που στο συγκεκριμένο έντομο είναι πολύ στενά συνδεδεμένο με ανθεκτικότητα σε εντομοκτόνα.

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

Υπάρχουν πολλές μελέτες οι οποίες έγιναν παλιότερα με βιοχημικούς και μοριακούς δείκτες αλλά για επαλήθευση των αποτελεσμάτων επαναλήφθηκαν με τη πιο ακριβή μέθοδο των μικροδορυφόρων. Κάποιοι ερευνητές εκμεταλλευόμενοι την υψηλή παραλλακτικότητα των μικροδορυφόρων, εξετάζουν ξανά είδη που σε προηγούμενες μελέτες δεν είχαν δείξει παραλλακτικότητα. Όπως π.χ. οι Sunnucks et al. (1997) εξέτασαν δείγματα της αφίδας *S. avenae* με μικροδορυφόρους. Σε μια παλαιότερη μελέτη τα ίδια δείγματα είχαν εξεταστεί με μια διαφορετική και πιο απλή τεχνική. Η μικροδορυφορική ανάλυση απέδειξε την ύπαρξη γενετικής και γενοτυπικής παραλλακτικότητας μεταξύ των ατόμων, κάτι το οποίο δεν είχε διαπιστωθεί στην προηγούμενη μελέτη.

Κάποιες άλλες εργασίες αφορούν διαειδικές εφαρμογές των μικροδορυφόρων. Οι πρώτες μελέτες που έγιναν με μικροδορυφόρους περιορίστηκαν στην εξέταση ενός μόνο taxon, εκείνου για το οποίο είχαν σχεδιαστεί οι εκκινητές. Αυτό συνέβαινε γιατί επικρατούσε η αντίληψη ότι οι μικροδορυφόροι δεν μπορούσαν να ενισχύσουν τμήματα DNA ειδών διαφορετικών από αυτά για τα οποία είχαν σχεδιαστεί. Αργότερα όμως με κάποιες δημοσιευμένες εργασίες, αποδείχτηκε ότι κάποιοι εκκινητές SSR μπορούν να ενισχύσουν την ίδια περιοχή μεταξύ συγγενικών taxa. Αυτό το γεγονός κίνησε το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων να ασχοληθούν με φυλογενετικά θέματα καθώς και με την εύρεση γενετικών αποστάσεων και συσχετίσεων μεταξύ συγκεκριμένων ειδών (Goodman & Simon 1998, Kashi & Soller 1999, Moxon & Wills 1999, Schlotterer & Christian 2000).

Μια τέτοιου είδους μελέτη έγινε από τους Wilson et al. (2004). Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν 48 γνωστοί μικροδορυφόροι αφίδων στις ακόλουθες κατηγορίες: Aphidinae: Aphidini: *Aphis* και *Rhopalosiphum*, Aphidinae: Macrosiphini: *Acyrtosiphum*, *Brevicoryne*, *Diuraphis*, *Illinoia*, *Macrosiphoniella*, *Macrosiphum*, *Metopeurum*, *Metopolophium*, *Myzus*, *Phorodon*, *Sitobion* και *Uroleucon* και Neucuenaphidinae: *Neucuenaphis*. Τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας έδειξαν ότι η διαειδική εφαρμογή γνωστών μικροδορυφόρων είναι μια πολλά υποσχόμενη τεχνική. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελέτες γενετικής πληθυσμών καθώς και σε εξελικτικές μελέτες αφίδων.

Η περισσότερη έρευνα που γίνεται σήμερα, επικεντρώνεται στη δημιουργία γενετικών χαρτών. Πρόκειται για μια χρονοβόρα διαδικασία, εφόσον η αποκωδικοποίηση της αλληλουχίας του DNA, ακόμη και για έναν πολύ μικρό οργανισμό, μπορεί να χρειαστεί χιλιάδες χρόνια για να ολοκληρωθεί. Ένας γενετικός

χάρτης δείχνει τις περιοχές γονιδίων ή τμημάτων DNA που έχουν αναγνωρισθεί και εκφράζονται ως επιθυμητά γνώρισμα. Παρόλα αυτά είναι πιθανό να βρεθούν μικροδορυφόροι στο γένωμα π.χ των αφίδων χωρίς να υπάρχει η απαραίτητη γνώση για το γένωμα ή τις γενετικές λειτουργίες ή τους μηχανισμούς που καθιστούν τα γονίδια λειτουργικά μέσα στην αφίδα. Όταν αυτοί οι δείκτες αναγνωριστούν και χαρακτηριστούν μπορούν να χρησιμοποιηθούν στον εντοπισμό γονιδίων που περιέχουν ένα επιθυμητό γνώρισμα.

5.4 Πλεονεκτήματα

Όπως και με τη μέθοδο AFLP, το μεγάλο πλεονέκτημα της μικροδορυφορικής ανάλυσης είναι ο μεγάλος πολυμορφισμός που παρουσιάζει. Σε ένα γενετικό τόπο στη σόγια *Glycine max* έχει αναφερθεί ότι έχουν βρεθεί 26 αλληλόμορφα (Cregan et al. 1994). Η ικανότητα της μεθόδου να διαχωρίζει άτομα όταν εξετάζεται ένας συνδυασμός τοποθεσιών του γενώματος καθιστά την τεχνική πολύ χρήσιμη για μελέτες γονιδιακής ροής και αναλύσεων πατρότητας. Εφόσον οι μικροδορυφόροι αξιολογούν μόνο μια τοποθεσία κάθε φορά, δεν μπορούν να συγκριθούν με τη μέθοδο AFLP η οποία δεν κάνει κάτι τέτοιο. Έχει βρεθεί π.χ. από τους Maughan et al. (1996) ότι η τεχνική AFLP μπορεί να παράγει περισσότερους πολυμορφικούς τύπους από ότι η μέθοδος των SSR. Πρόκειται όμως για δυο εντελώς διαφορετικές τεχνικές. Συγκρίσεις των μικροδορυφόρων, όσον αφορά την ακρίβειά τους, πρέπει να γίνονται μόνο με μοριακές μεθόδους που αξιολογούν επίσης μια μόνο τοποθεσία του γονιδιώματος. Τέτοιου είδους τεχνικές όπως είναι τα RFLP και τα ισοένζυμα σαφώς και παρουσιάζουν πολύ μικρότερο ποσοστό πολυμορφισμού έναντι των μικροδορυφόρων (Robinson & Harris 1999).

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

Ένα άλλο βασικό πλεονέκτημα της μεθόδου, εφόσον βασίζεται στο DNA των οργανισμών, είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν νεκροί ιστοί. Μπορούν επομένως

να αναλυθούν ακόμη και ιστοί που διατηρούνται σε ορισμένες συνθήκες για αρκετά χρόνια.. Έτσι, λοιπόν, η μικροδορυφόροι χρησιμοποιούνται ευρέως και σε φυλογενετικές μελέτες.

Τέλος, άλλα δυο μεγάλα πλεονεκτήματα της χρήσης των μικροδορυφόρων είναι ότι η γενοτύπηση είναι μια σχετικά οικονομική διαδικασία και επιπλέον ότι η διαειδική εφαρμογή τους τους καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμους μεταξύ συγγενικών taxa. Δηλαδή, αν ένας μικροδορυφόρος αποκαλύπτει π.χ. 20 αλληλόμορφα σε μια συγκεκριμένη περιοχή του γενώματος ενός είδους, μπορεί κάποιο από αυτά να τα εντοπίσει και σε ένα συγγενικό είδος.

5.5 Μειονεκτήματα

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

5.5.1. Πρακτικά προβλήματα

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

"Slippage". Αυτό μπορεί να αποτελέσει σημαντικό πρόβλημα στην ανάλυση, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται μικροδορυφόροι που περιέχουν επαναλήψεις μόνο- και δι-νουκλεοτιδίων. Κατά τη διάρκεια της ενίσχυσης των τμημάτων του DNA το θερμοανθεκτικό ένζυμο πολυμεράση μπορεί να «γλυστρίσει» και να δώσει προϊόντα διαφορετικού μεγέθους από τα αναμενόμενα (Ciofi et al. 1998). Τα προϊόντα που προκύπτουν από τα λάθη της πολυμεράσης διαφέρουν από τα σωστά ελάχιστα, δηλαδή 1-5 επαναλαμβανόμενες μονάδες. Τέτοιου είδους προϊόντα έχουν μικρότερη ένταση ζωνών από τις αναμενόμενες, όπως φαίνονται στην πηκτή πολυακρυλαμίδης, οπότε πρακτικά απορρίπτονται αμέσως κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Παρόλα αυτά, αν σε ένα ετερόζυγο άτομο αυτού του είδους τα προϊόντα επικαλύψουν τα πραγματικά, τότε είναι πολύ δύσκολο να γίνει διαχωρισμός μεταξύ λανθασμένων και σωστών προϊόντων.

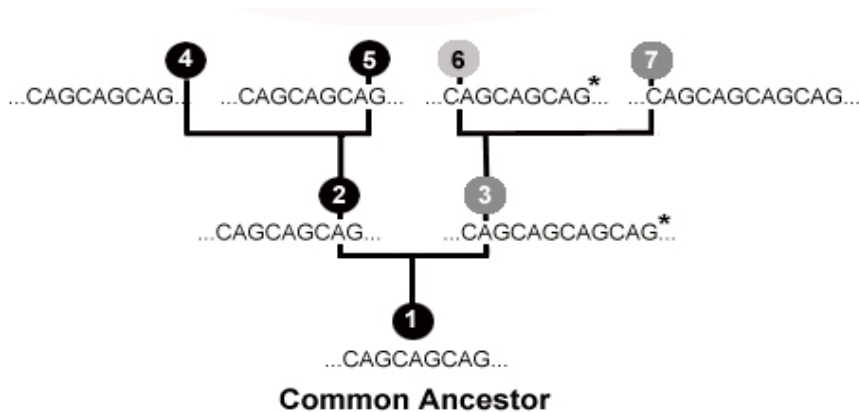
Διάφορα πρακτικά προβλήματα. Ένα ακόμη μειονέκτημα, που αφορά τη μικροδορυφορική ανάλυση με αυτόματο μηχάνημα αλληλούχισης (sequencer), είναι η διαφορά που παρουσιάζεται ορισμένες φορές στο μέγεθος των αλληλομόρφων. Δηλαδή υπάρχει διαφορά μεταξύ του μεγέθους που εκτιμάει το μηχάνημα και του μεγέθους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

Ανακριβή αποτελέσματα μπορεί επίσης να οφείλονται, στη τάση που έχει η *Taq* πολυμεράση να προσθέτει νουκλεοτίδια αδερίνης στο 3' άκρο του ενισχυμένου προϊόντος (Ciofi et al. 1998). Αν τα επιπλέον νουκλεοτίδια προστίθενται συνέχεια στα προϊόντα, δεν υπάρχει πρόβλημα στην ανάλυση. Σοβαρά λάθη στην εκτίμηση του μεγέθους των αλληλομόρφων γίνονται μόνο όταν το επιπλέον νουκλεοτίδιο προστίθεται περιστασιακά στο κάθε προϊόν που εξετάζεται.

5.5.2 Προβλήματα στην εξαγωγή αποτελεσμάτων

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

Ας υποθέσουμε ότι εξετάζεται ένας πληθυσμός και επιλέγονται 4 διαφορετικά άτομα. Τρία από αυτά έχουν τον ίδιο γενότυπο και ένα έχει διαφορετικό. Αυτό θα οδηγούσε τους επιστήμονες στο συμπέρασμα, ότι τα τρία άτομα με τον ίδιο γενότυπο έχουν πιο στενή σχέση μεταξύ τους από ότι έχουν με το τέταρτο. Αυτή η άποψη όμως δεν είναι απαραίτητα σωστή. Για να καταλάβουμε το λόγο μπορούμε να δούμε το παρακάτω σχήμα (οι αστερίσκοι δηλώνουν τις μεταλλάξεις των μικροδορυφόρων).



Σχήμα 5. Υποθετικό παράδειγμα εξέλιξης ενός πληθυσμού
(<http://www.woodrow.org>)

Σε αυτό το σχήμα παρατηρούμε ότι από τον πληθυσμό **1** προέκυψαν οι πληθυσμοί **2** και **3**. Στον πληθυσμό **3**, υπήρξε μια βηματική μετάλλαξη και επομένως υπάρχουν 4 επαναλήψεις της αλληλουχίας CAG αντί για τρεις. Από τον πληθυσμό **3** προέκυψαν δυο ακόμη πληθυσμοί οι **6** και **7**. Ο πληθυσμός **6** έχασε ένα επαναλαμβανόμενο τμήμα και επομένως έχει τρεις επαναλήψεις CAG. Το πρόβλημα που προκύπτει είναι ότι οι πληθυσμοί **4**, **5** και **6** έχουν το ίδιο αλληλόμορφο παρά το γεγονός ότι έχουν διαφορετική εξελικτική πορεία. Μπορούμε να πούμε ότι τα αλληλόμορφα είναι ταυτόσημα κατά τύχη και όχι λόγω κοινής προέλευσης. Αν όμως ένας επιστήμονας εξέταζε αυτούς τους 4 πληθυσμούς (4, 5, 6, 7) χωρίς να γνωρίζει τη προέλευσή τους, θα συμπεραίνε λανθασμένα ότι ο πληθυσμός **6** είναι πιο στενά συνδεδεμένος με τους πληθυσμούς **4** και **5** από ότι είναι με τον **7**. Πρόκειται λοιπόν για ένα συνηθισμένο λάθος γιατί οι επιστήμονες έχουν πρόσβαση μόνο στους τελικούς γενότυπους χωρίς να γνωρίζουν την προέλευσή τους.

Ένα άλλο πρόβλημα που παρουσιάζεται με την ομολογία, είναι κατά την ανάλυση σύνθετων επαναλαμβανόμενων τμημάτων. Συγκεκριμένα αν ένας μικροδορυφόρος έχει την αλληλουχία 5'-(CT)₁₀CA(CT)₈-3' και κατά τη διάρκεια της ανάλυσης προκύψει ένα δεύτερο αλληλόμορφο μεγαλύτερο κατά δυο ζεύγη βάσεων, χωρίς να γίνει αλληλούχιση, είναι αδύνατο να διαπιστωθεί ποιο ακριβώς τμήμα αυξήθηκε σε μέγεθος. Αν δηλαδή π.χ. το αλληλόμορφο έχει την αλληλουχία 5'-(CT)₁₁CA(CT)₈-3' ή 5'-(CT)₁₀CA(CT)₉-3'. Όταν εξετάζονται σύνθετοι μικροδορυφόροι αναμένεται μεγάλο ποσοστό μη ομόλογων τμημάτων. Αυτό λοιπόν που συνιστάται από τους επιστήμονες για να περιοριστούν τα λάθη κατά τη

διαδικασία της γενοτύπισης, είναι η χρήση μικροδορυφόρων με απλά επαναλαμβανόμενα τμήματα.

Η τρίτη και πιο σημαντική ανακρίβεια που μπορεί να προκύψει από την ομολογία εντοπίζεται μέσα στην επαναλαμβανόμενη μονάδα. Υπάρχει δηλαδή πάντα η απορία για το αν δυο τμήματα που συν-μεταναστεύουν είναι όμοια λόγω προέλευσης ή απλά γιατί έτυχε λόγω μετάλλαξης. Δεν υπάρχει απλή απάντηση σε αυτό το θέμα και φαίνεται ότι δεν απασχολεί ιδιαίτερα τους επιστήμονες αν και θα έπρεπε διότι κάτι τέτοιο μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα. Υποθέτοντας ότι το **μοντέλο βηματικής μετάλλαξης (SMM)** περιγράφει την εξέλιξη των μικροδορυφόρων, ας εξετάσουμε την περίπτωση δυο αλληλομόρφων που έχουν την αλληλουχία (CA)₆. Τα αλληλόμορφα αυτά μπορούν να προκύψουν από δυο ειδών μεταλλάξεις, από το αλληλόμορφο (CA)₇ ή από το αλληλόμορφο (CA)₅. Υπάρχουν έξι πιθανές μεταλλάξεις που μπορούν να μετατρέψουν το αλληλόμορφο (CA)₅ σε (CA)₆ αλλά υπάρχουν επίσης και επτά μεταλλάξεις που μπορούν να μετατρέψουν το αλληλόμορφο (CA)₇ σε (CA)₆.

Το πρόβλημα της ομολογίας εξαρτάται από το εύρος μεταλλάξεων των επαναλαμβανόμενων τμημάτων. Αν το εύρος είναι χαμηλό τότε υπάρχει μεγάλη πιθανότητα η μετάλλαξη να είναι μοναδική και επιπλέον τα αλληλόμορφα να είναι ταυτόσημα. Αντίθετα αν το εύρος είναι υψηλό, αυξάνεται η πιθανότητα για δυο συνμεταναστεύοντα αλληλόμορφα να είναι ταυτόσημα λόγω τυχαίου γεγονότος. Επιπλέον τα αλληλόμορφα αυτά είναι μη ομόλογα. Το εύρος των μεταλλάξεων έχει υπολογιστεί για αρθρόποδα και ανθρώπους από 10⁻⁵ έως 10⁻² (Jarne & Lagoda 1996) και η πιθανότητα της μη ομολογίας από συνμεταναστεύοντα αλληλόμορφα είναι υψηλή.

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

Αυτού του είδους τα αλληλόμορφα μπορεί να μην εμφανίζονται καθόλου ή να παρουσιάζονται ως αλληλόμορφα μικρότερου μεγέθους, με αποτέλεσμα να γίνεται λανθασμένη εξαγωγή αποτελεσμάτων (Morgante et al. 1998). Στη περίπτωση λοιπόν

ενός ετεροζυγώτη, μετά από την ενίσχυση με PCR, αναμένεται να εμφανιστούν δυο διαφορετικά αλληλόμορφα στην πηκτή πολυακρυλαμίδης. Αν κάποιο από τα αλληλόμορφα αυτά δεν μπορεί να ενισχυθεί λόγω δυσκολιών στο στάδιο της συγκόλλησης των εκκινητών, τότε στην πηκτή θα φαίνεται μια ζώνη και το άτομο που εξετάζεται θα χαρακτηριστεί λανθασμένα σαν ομοζυγώτης.

Το θέμα των άκυρων αλληλομόρφων απασχόλησε πολύ τους επιστήμονες και έτσι έγιναν πάρα πολλές μελέτες επάνω σε αυτό. Οι Rossetto et al. (1999) είχαν την άποψη ότι αν χρησιμοποιηθούν ομόλογοι εκκινητές σε μια γενετική μελέτη, τότε υπάρχουν πολύ μικρές πιθανότητες να εμφανιστούν μηδενικά αλληλόμορφα. Σε μια προηγούμενη μελέτη όμως, οι Callen et al. (1993) αναγνώρισαν την ύπαρξη άκυρων αλληλομόρφων παρά το γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν ομόλογοι εκκινητές. Ακόμη η χρήση ετερόλογων εκκινητών είναι πιθανό να αυξήσουν την ύπαρξη άκυρων αλληλομόρφων.

Το συμπέρασμα των περισσότερων ερευνών για τα μηδενικά αλληλόμορφα είναι ότι η παρουσία τους προκαλεί εσφαλμένη εκτίμηση των γενοτύπων καθώς και των συχνοτήτων των αλληλομόρφων. Σε περιπτώσεις διαειδικών ερευνών έχει αποδειχτεί ότι όσο αυξάνονται οι αποστάσεις μεταξύ των taxa τόσο αυξάνεται και η ύπαρξη άκυρων αλληλομόρφων. Πάντως τα μηδενικά αλληλόμορφα αποτελούν ένα θέμα που χρειάζεται ακόμα πολύ μελέτη.

5.5.3 Προβλήματα στην ανάλυση

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

Παρουσία/Απουσία. Καμία από τις μεθόδους που εμπλέκονται με την παρουσία ή απουσία αλληλομόρφων δεν χρησιμοποιείται στην εκτίμηση σχέσεων. Ακόμη και στην περίπτωση των μεθόδων μεγίστης φειδολότητας (parsimony) υπάρχει η πιθανότητα να βρεθούν λιγότερες φυλογενετικές σχέσεις (parsimonious). Επίσης, οι μικροδορυφόροι έχουν επιπρόσθετες πηγές σφάλματος, όπως είναι η μη ομολογία των ζωνών τους καθώς και η παρουσία των άκυρων αλληλομόρφων (Murphy 1993).

Συχνότητα αλληλομόρφων. Ο υπολογισμός της συχνότητας εμφάνισης των αλληλομόρφων σε κάθε γενετική τοποθεσία δεν χρησιμοποιείται εκτενώς σε φυλογενετικές αναλύσεις, λόγω κυρίως των δυσκολιών που υπάρχουν στη κωδικοποίηση των δεδομένων. Η συχνότητα των αλληλομόρφων είναι ένα χαρακτηριστικό των μικροδορυφόρων που έχει απασχολήσει πολλούς ερευνητές. Ο Crother (1990) κατέληξε στο συμπέρασμα ότι η ίδια η φύση της συχνότητας των αλληλομόρφων είναι αυτή που εμποδίζει τη χρήση τους σε φυλογενετικές μελέτες. Επιπλέον, οι συχνότητες αυτές παραμένουν σταθερές μόνο προσωρινά και για αυτό το λόγο δεν μπορούν να είναι συναπομορφικές (synapomorphic). Τέλος οι επιδράσεις των μη ομόλογων και άκυρων αλληλομόρφων, δυο αρνητικών στοιχείων των μικροδορυφόρων, στις φυλογενετικές μελέτες δεν είναι γνωστές.

6. *MYZUS PERSICAE* (SULZER)

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

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

Ξενιστές. Είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος και προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών σε όλες τις ηπείρους. Από τα καλλιεργούμενα προσβάλλει είδη των οικογενειών Rosaceae, Solanaceae, Malvaceae, Compositae, Chenopodiaceae, Umbelliferae, Papilionaceae, Cruciferae. Μερικές από τις καλλιέργειες που προσβάλλει είναι: καπνός, πατάτα, τομάτα, μαρούλι, καρότο, κουκιά, τεύτλα, σπανάκι, λάχανο κ.α. Τα χειμερινά αυγά γεννιούνται στη ροδακινιά *Prunus. persica*. (Blackman & Eastop 2000).

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



Εικόνα 12. Πράσινη, κιτρίνη, κόκκινη και πτερωτή μορφή του *M. persicae*

Βιολογία. Έχει περισσότερες από πέντε γενεές το έτος. Σε περιοχές με σχετικά ψυχρό χειμώνα το είδος διαχειμάζει ως χειμερινό ωά στο φλοιό των κύριων ξενιστών (ροδακινιάς ή άλλων πυρηνοκάρπων). Τα χειμερινά ωά, συνήθως 4-6 ανά θηλυκό, βρίσκονται στους οφθαλμούς ή σε εσοχές αδρών μερών του φλοιού. Στο τέλος του χειμώνα με αρχές ανοίξεως τα ωά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά τα λεγόμενα θεμελιωτικά. Ακολουθεί μικρός αριθμός παρθενογενετικών γενεών στη ροδακινιά και έπειτα πτερωτά άτομα μεταναστεύουν σε ποώδη φυτά (δευτερεύοντες ξενιστές), όπου η μία παρθενογενετική γενιά διαδέχεται την άλλη. Το φθινόπωρο παράγονται στα ποώδη φυτά πτερωτά θηλυτόκα και αρσενικά, τα οποία μεταναστεύουν στον πρωτεύοντα ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα γεννούν τα ωοτόκα, τα οποία εναποθέτουν τα χειμερινά ωά, μετά από σύζευξη με τα αρσενικά. Σε περιοχές με σχετικά ζεστό χειμώνα το έντομο αναπαράγεται παρθενογενετικά όλες τις εποχές του έτους. Επίσης υπάρχουν γενότυποι που χρησιμοποιούν και τις δυο στρατηγικές διαχείμασης. Το φθινόπωρο οι ανδροκυκλικοί κλώνοι παράγουν παρθενογενετικές μορφές, που θα διαχειμάσουν σε αυτοφυή φυτά ή χειμερινές καλλιέργειες και αρσενικά που συμμετέχουν στη σεξουαλική φάση του είδους (Müller 1954, 1958, Waldhauer 1953, 1957, van Emden *et al.* 1969, Blackman 1971, 1974). Οι ενδιάμεσοι κλώνοι γεννούν την ίδια εποχή πολλά άπτερα και πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά και λίγα αρσενικά και «ενδιάμεσα» πτερωτά. Τα «ενδιάμεσα» πτερωτά παράγουν κυρίως παρθενογενετικές μορφές και αριθμό ωοτόκων θηλυκών (Blackman 1971,

1972). Ο χρωμοσωμικός αριθμός του είδους είναι $n=12$. Έχει βρεθεί μια A1,3 χρωμοσωμική μετατόπιση που συνδέεται με το E4 μηχανισμό ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα βασιζόμενο στην εστεράση (Blackman & Takada 1975). Η χρωμοσωμική μετατόπιση παρουσιάζει ευρεία διάδοση σε όλο τον κόσμο (Blackman et al. 1978) και εμφανίζεται κυρίως στην κόκκινη μορφή του είδους ενώ στην πράσινη εμφανίζεται περιστασιακά (Blackman 1987). Επίσης ο E4 μηχανισμός ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, βασιζόμενος στην εστεράση, συνδέεται με τον ανολοκυκλικό τρόπο αναπαραγωγής ενώ ο EF4, όμοιας δράσης μηχανισμός που παρατηρείται στο είδος, συνδέεται με τον ολοκυκλικό τρόπο αναπαραγωγής. Ωστόσο, πρόσφατα στην Ελλάδα έχουν βρεθεί κλώνοι που παρουσιάζουν και τους δυο μηχανισμούς ανθεκτικότητας (Blackman et al., 1999, Margaritoroulos et al. 2005). Το είδος είναι ανθεκτικό στο κρύο και μπορεί να αναπτύσσεται σε θερμοκρασίες μεταξύ 5 °C και 30 °C. Στους 25 °C τα θηλυκά ζουν κατά μέσο όρο 25 ημέρες και γεννούν 60 νύμφες (Rivnay 1962).

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

Το *M. persicae* αποτελεί ένα κλασικό παράδειγμα ετερόουικου είδους αφίδας. Στο δευτερεύοντα ξενιστή που είναι ο καπνός καθώς και άλλα ποώδη φυτά, κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου όπου μειώνεται το μήκος της ημέρας, υπάρχουν άτομα που είναι ολοκυκλικά άπτερα και ζωοτόκα. Τα άτομα αυτά παράγουν θηλυτόκα και αρσενικά τα οποία με τη σειρά τους μεταναστεύουν στο κύριο ξενιστή που είναι η

ροδακινιά *P. persica*. Στη ροδακινιά, τα θηλυτόκα γεννούν ωτόκα τα οποία ύστερα από σύζευξη με αρσενικά άτομα παράγουν τα διαχειμάζοντα ωά (van Emden *et al.*, 1969). Ο βιολογικός κύκλος του *M. persicae* παρουσιάζει πολυμορφισμό. Εκτός από την περίπτωση του ολοκυκλικού βιολογικού κύκλου, έχουν περιγραφεί ακόμη τρεις κατηγορίες που έχουν άμεση σχέση με τη φωτοπερίοδο: οι ανολοκυκλικοί, οι ανδροκυκλικοί και οι ενδιάμεσοι. Οι ανολοκυκλικοί κλώνοι δεν μπορούν να παράγουν σεξουαλικές μορφές και διαχειμάζουν σε ζιζάνια ή σε χειμερινές καλλιέργειες, ως παρθενογενετικά θηλυκά. Οι ανδροκυκλικοί κλώνοι, όταν εκτίθενται σε συνθήκες μικρής ημέρας, παράγουν παρθενογενετικές μορφές και αρσενικά τα οποία μπορούν να συζευχθούν με ωτόκα άτομα που προέρχονται από ολοκυκλικούς ή ενδιάμεσους κλώνους. Οι ενδιάμεσοι γενότυποι παράγουν πολλά άπτερα και παρθενογενετικά πτερωτά, μερικά αρσενικά και πτερωτά θηλυκά τα οποία γεννούν τόσο παρθενογενετικά άτομα όσο και ωτόκα (Blackman, 1971, 1972).

Η διαφορετικές στρατηγικές διαχείμασης, προσφέρουν στις αφίδες ένα βιολογικό πλεονέκτημα όσον αφορά την εξάπλωση και την επιβίωσή τους, εφόσον μπορούν να προσαρμοστούν σε ποικίλες κλιματικές συνθήκες. Η γνώση του βιολογικού κύκλου των αφίδων από επιστήμονες γεωπόνους και όχι μόνο κρίνεται απαραίτητη προκειμένου να εφαρμοστεί ένα σωστό πρόγραμμα για την προστασία των καλλιεργειών. Με αυτό το τρόπο μπορεί να αναγνωριστεί η πηγή προέλευσης των αφίδων και να γίνει πρόβλεψη για την εμφάνισή τους κατά τη διάρκεια της άνοιξης.

Ο Blackman (1974) σε μια εργασία όπου μελέτησε τη παραλλακτικότητα που παρουσιάζει ο βιολογικός κύκλος του *M. persicae* σε διαφορετικά μέρη του κόσμου, παρατήρησε ότι η ικανότητα για σεξουαλική αναπαραγωγή μπορεί να διατηρηθεί στις περισσότερες περιοχές του εύρους εξάπλωσης του είδους. Η παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε στο βιολογικό κύκλο εξηγήθηκε σύμφωνα με τις διαφορές που υπάρχουν στη θερμοκρασία μεταξύ των περιοχών. Έτσι, σε εύκρατες περιοχές μπορούν να συνυπάρξουν κλώνοι με διαφορετικές στρατηγικές αναπαραγωγής και επιπλέον η συχνότητα εμφάνισης ολοκυκλικών και ανολοκυκλικών πληθυσμών κατά τη διάρκεια της άνοιξης εξαρτάται από τη δριμύτητα του προηγούμενου χειμώνα. Στη ίδια εργασία ο Blackman (1974) επισημαίνει ότι η απουσία κατάλληλων χειμερινών καλλιεργειών και ζιζανίων μπορεί να αποτελέσει περιοριστικό παράγοντα για την εμφάνιση ανολοκυκλικών κλώνων. Από την άλλη πλευρά, υπάρχει δυνατότητα οι

ολοκυκλικοί πληθυσμοί να μειωθούν λόγω της σπανιότητας των κύριων ξενιστών τους.

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

Σε πρόσφατες μελέτες αποδείχτηκε, με τη χρήση μοριακών τεχνικών, ότι οι αφίδες που τρέφονται στο καπνό δεν αποτελούν ξεχωριστό είδος σε σχέση με άλλους πληθυσμούς του *M. persicae* (Field et al. 1994, Margaritopoulos et al. 1998, Clements et al. 2000). Παρόλα αυτά μικροδορυφορική ανάλυση DNA σε άτομα του *M. persicae* που συλλέχθηκαν από ροδακινιά, καπνό και άλλους ξενιστές σε περιοχές της Ελλάδας και της Ιταλίας (Blackman et al. 2001; Blackman et al. submitted, Margaritopoulos et al. submitted) καθώς και ανάλυση με τη χρήση μοριακών δεικτών RAPD σε κλώνους που προήλθαν από καπνό και άλλα φυτά ξενιστές σε περιοχές της Ελλάδας (Margaritopoulos et al. 1998, Zitoudi et al. 2001) έδωσαν αποτελέσματα που επαλήθευσαν την ύπαρξη μιας ξεχωριστής φυλής του *M. persicae* που τρέφεται στον καπνό. Σε αυτό το συμπέρασμα έχουν καταλήξει και διάφορες μορφομετρικές μελέτες (Margaritopoulos et al. 2000, 2003). Πρόσφατα, οι πληθυσμοί που τρέφονται στον καπνό έχουν χαρακτηριστεί ως ξεχωριστό υποείδος το *Myzus persicae nicotianae* Blackman (Margaritopoulos et al. 2003, Eastop & Blackman, 2005). Ο βιολογικός κύκλος του *M. persicae nicotianae* που τρέφεται στο καπνό φαίνεται να είναι πολυμορφικός. Σε πολλές περιοχές ανά τον κόσμο, όπου καλλιεργείται ο καπνός, έχει αναφερθεί ότι αφίδες που τρέφονται σε αυτόν, δεν παρουσιάζουν σεξουαλική αναπαραγωγή (Blackman 1987, Blackman & Spence 1992). Οι μοναδικές αναφορές που έγιναν για εμφάνιση ολοκυκλικών και ανδροκυκλικών πληθυσμών του *M. persicae* που τρέφονται στο καπνό, ήταν στη Κεντρική Ασία και στην Ιαπωνία (Zagorovskii 1947, Kolesova et al. 1980, Takada 1986).

Οι γνώσεις που υπάρχουν σχετικά με τον τρόπο αναπαραγωγής που υιοθετούν τα είδη σε διαφορετικά μέρη του κόσμου, βασίζονται στη μελέτη σχετικά μικρού μεγέθους δειγμάτων, τα οποία δεν επιτρέπουν τη γενίκευση των συμπερασμάτων ή την καλύτερη κατανόηση της παραλλακτικότητας του βιολογικού τους κύκλου. Οι εργασίες των Blackman (1971) και Takada (1986) βασίζονται σε ικανοποιητικό

αριθμό κλώνων. Συγκεκριμένα ο Blackman μελέτησε την αντίδραση σε διακυμάνσεις της φωτοπεριόδου σε 119 κλώνους που προήλθαν από τρεις διαφορετικές περιοχές της Βόρειας Αγγλίας και ο Takada εξέτασε 150 κλώνους που συλλέχθηκαν σε διαφορετικές περιοχές της Ιαπωνίας. Ένας βασικός παράγοντας που επηρεάζει τη στρατηγική διαχείμασης που ακολουθούν οι αφίδες σε διαφορετικές περιοχές του κόσμου, είναι η θερμοκρασία. Παρόλα αυτά, δεν έχει μελετηθεί επαρκώς ο ρόλος που παίζει ο κύριος ξενιστής στο διαχωρισμό γενοτύπων, οι οποίοι επιλέγουν διαφορετικές στρατηγικές διαχείμασης. Σε μελέτες που έγιναν σε πληθυσμούς της αφίδας από περιοχές της Ελλάδας, βρέθηκε ότι η φυλή που αποικίζει τον καπνό βρίσκεται εκεί ύστερα από μετανάστευση από τη ροδακινιά (Blackman & Spence, 1992). Οι σχετικές συχνότητες των αφίδων που τρέφονται στο καπνό αλλά και σε άλλους δευτερεύοντες ξενιστές και ταυτόχρονα παρουσιάζουν διαφορετικές κατηγορίες βιολογικού κύκλου, είναι ακόμη άγνωστες σε πολλές περιοχές του πλανήτη. Οι Margaritopoulos et al. (2002) μελέτησαν τις αντιδράσεις στη φωτοπερίοδο 2997 κλώνων του *M. Persicae*, οι οποίοι συλλέχθηκαν από τον κύριο αλλά και από δευτερεύοντες ξενιστές σε περιοχές της Ελλάδας κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του φθινοπώρου προκειμένου να διαπιστωθεί η ύπαρξη παραλλακτικότητας στον βιολογικό κύκλο. Οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η σχετική αφθονία του πρωτεύοντα ξενιστή, σε αντίθεση με τα μονόοικα είδη αφίδων (π.χ. *S. avenae*, Parura et al. 2003), είναι σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη γεωγραφική κατανομή των ολοκυκλικών γενοτύπων. Ένας ακόμη σκοπός της παραπάνω εργασίας ήταν η διερεύνηση των σχέσεων μεταξύ αφίδων και διαφορετικών κατηγοριών βιολογικού κύκλου. Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει ροή γονιδίων μεταξύ των ολοκυκλικών και των ανολοκυκλικών γενοτύπων μέσω των λίγων σεξουαλικών ατόμων που παράγουν περιστασιακά οι τελευταίοι.

7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΑΡΟΥΣΑΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο βιολογικός κύκλος, η γενετική παραλλακτικότητα καθώς και η ύπαρξη μηχανισμών ανθεκτικότητας στην αφίδα *M. persicae*. Αρχικά έγινε συλλογή των δειγμάτων από αρκετές περιοχές της Ελλάδος όπου καλλιεργείται καπνός και ροδακινιά, τα οποία μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και εκεί μελετήθηκε ο βιολογικός τους κύκλος. Συγκεκριμένα για τη κατηγορία βιολογικού κύκλου εξετάστηκαν 74 κλωνικές σειρές που προήλθαν από ροδακινιά και 110 που συλλέχθηκαν από καπνό. Στη συνέχεια μελετήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα σε 7 πληθυσμούς (4 από Ελλάδα, 2 από Σερβία και 1 από Ζιμπάμπουε) του *M. persicae* με τη χρήση μικροδορυφόρων. Συνολικά εξετάστηκαν 137 κλωνικές σειρές με τρεις μικροδορυφορικούς τόπους. Οι μηχανισμοί ανθεκτικότητας που μελετήθηκαν ήταν η υπερπαραγωγή εστερασών, τόσο με βιοχημικές όσο και με μοριακές μεθόδους, καθώς και η *kdr*. Το επίπεδο εστερασών με βιοχημικό τρόπο εξετάστηκε σε 193 κλωνικές σειρές που προερχόταν από 5 διαφορετικούς πληθυσμούς (4 από Ελλάδα και 1 από Σερβία), ενώ με τη χρήση μοριακών τεχνικών εκτιμήθηκε η συχνότητα εμφάνισης των γενοτύπων E4 και FE4 σε 181 σειρές που προήλθαν από 8 διαφορετικούς πληθυσμούς (5 από Ελλάδα, 2 από Σερβία και 1 από Ζιμπάμπουε). Τέλος για την εύρεση ανθεκτικών γονιδίων που προσδίδουν την *kdr* ανθεκτικότητα, εξετάστηκαν με μοριακές μεθόδους 221 σειρές από 8 διαφορετικούς πληθυσμούς (5 από Ελλάδα, 2 από Σερβία και 1 από Ζιμπάμπουε). Όλοι οι πληθυσμοί που εξετάστηκαν συλλέχθηκαν από ροδακινιά και καπνό.

'B. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αφίδες αποτελούν ιδανικά μοντέλα μελέτης της εξελικτικής σχέσης μεταξύ φυτών και εντόμων. Παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση στον ξενιστή με αποτέλεσμα το 99% των ειδών να περιορίζεται σε ένα ή μερικά είδη φυτών που είναι συγγενικά μεταξύ τους (Eastop 1973). Υπάρχουν πολλές δημοσιεύσεις στη διεθνή βιβλιογραφία, που αποδεικνύουν βιότυπους, φυλές αλλά και υποείδη αφίδων προσαρμοσμένα σε έναν ή λίγους ξενιστές (Blackman 1990, Via 1991a, b, Puterka et al. 1993, Sunnucks et al. 1997, Vanlerberghe-Masutti & Chavigny 1998, Haack et al. 2000).

Η παραλλακτικότητα του βιολογικού κύκλου (ικανότητα για σεξουαλική αναπαραγωγή ή συνεχής απομικτική παρθενογένεση) των αφίδων είναι ένα σημαντικό στοιχείο που πρέπει να λαμβάνεται υπόψη σε όλες τις μελέτες γενετικής πληθυσμών καθώς και για να γίνει κατανοητή η σχέση των αφίδων με τα φυτά ξενιστές. Ο πρωταρχικός λόγος για τον οποίο πρέπει να συμβαίνει αυτό, είναι ότι η μέθοδος αναπαραγωγής καθορίζει τον τρόπο με τον οποίο παράγεται και οργανώνεται η γενετική παραλλακτικότητα μέσα σε έναν πληθυσμό, κάτι που μπορεί να έχει σημαντικές συνέπειες στην εξελικτική ανάπτυξη γνωρισμάτων που συνδέονται με την προσαρμογή του εντόμου στο φυτό ξενιστή. Έχουν διατυπωθεί αντικρουόμενες θεωρίες στο κατά πόσο η κυκλική ή η υποχρεωτική παρθενογένεση προάγουν την προσαρμογή σε ξενιστή (Lynch 1984, Hales et al. 1997). Παρόλα αυτά, πρόσφατες εργασίες στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν μικροδορυφόροι ως μοριακοί δείκτες έδειξαν ότι ο τρόπος αναπαραγωγής επηρεάζει σημαντικά τη γενετική δομή των πληθυσμών πολλών ειδών αφίδων όπως οι: *S. avenae* (Simon et al. 1999), *Rhopalosiphum padi* L. (Hemiptera: Aphididae) (Delmotte et al. 2002) και *M. persicae* (Vorburger et al. 2003, Guillemaud et al. 2003, Margaritopoulos et al. submitted).

Η αφίδα *M. persicae*, που αποτελεί το αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος (Blackman & Eastop 2000). Ωστόσο, υπάρχουν ενδείξεις γενετικής παραλλακτικότητας σε σχέση με το φυτό ξενιστή που επιλέγει. Για αρκετό καιρό υπήρχε η υποψία ότι οι πληθυσμοί που αποικίζουν τον καπνό *Nicotiana tabaccum* L. (Solanaceae), είναι διαφορετικοί από εκείνους που αποικίζουν άλλα είδη φυτών (de Jong 1929, Brain 1942, Müller 1958). Η άποψη αυτή επιβεβαιώθηκε έπειτα από μορφομετρικές μελέτες (Blackman 1987), που διαδοχικά έδειξαν ότι η μορφή της αφίδας που τρέφεται στον καπνό με το πέρασμα του χρόνου

διατηρεί τη χαρακτηριστική της μορφολογία ακόμα και σε περιοχές (Ελλάδα και Ιαπωνία) όπου υπάρχουν αμφισεξουαλικές γενιές λόγω του κύριου ξενιστή που είναι η ροδακινιά *P. persica* (Margaritopoulos et al. 2000; 2003; Takada et al. unpublished data).

Η μελέτη και η ανάλυση κλωνικών σειρών του *M. persicae*, κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες στο ίδιο φυτό ξενιστή απέδειξε ότι οι μορφολογικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών που αποικίζουν τον καπνό και αυτών που τρέφονται σε άλλους ποώδεις ξενιστές έχουν γενετική βάση. Η προσαρμογή πληθυσμών της αφίδας στον καπνό έχει ως αποτέλεσμα τη μειωμένη απόδοσή τους σε άλλα φυτά ξενιστές (Nikolakakis et al. 2003). Βρέθηκε επίσης, επιλογή κατά των μεταναστευτικών ατόμων η οποία οδήγησε στην ανάπτυξη μηχανισμού αναγνώρισης του σωστού ξενιστή από τα πτερωτά μεταναστευτικά θηλυκά. (Margaritopoulos et al. 2005, Troncoso et al. 2005). Έτσι η μορφή του *M. persicae* που τρέφεται στον καπνό, χαρακτηρίστηκε ως υποείδος και του δόθηκε το όνομα *Myzus persicae nicotianae* (Blackman) (Margaritopoulos et al., 2003; Eastop & Blackman 2005). Παρόλα αυτά, μοριακές μελέτες σε πληθυσμούς του *M. persicae* από καπνό και άλλους ξενιστές, δεν κατάφεραν να αναδείξουν γενετικούς δείκτες ικανούς να διακρίνουν τα δυο taxa, ίσως γιατί δεν χρησιμοποιήθηκαν ακριβείς μοριακοί δείκτες (Margaritopoulos et al. 1998, Clements et al. 2000a, b, Zitoudi et al. 2001). Η αλληλούχηση του DNA όμως, έδειξε ότι η προσαρμογή στον καπνό πρέπει να έλαβε χώρα πολύ πρόσφατα και επιπλέον ότι υπάρχει μεταφορά γονιδίων από πληθυσμούς που δεν τρέφονται σε καπνό (Field et al. 1994, Clements et al. 2000a). Στις παραπάνω μελέτες βέβαια για τη σύγκριση μεταξύ *persicae* και *nicotianae* δεν χρησιμοποιήθηκαν ως μοριακοί δείκτες οι μικροδορυφόροι, οι οποίοι είναι ισχυρά πολυμορφικοί κατάλληλοι για μελέτες γενετικής πληθυσμών. Οι Terradot et al. (1999) συμπεριέλαβαν μόνο δυο κλώνους από καπνό και σε αντίστοιχη μικροδορυφορική ανάλυση πληθυσμών από την Αυστραλία δεν υπήρχε το υποείδος *nicotianae* καθώς προφανώς δεν υπάρχει στη συγκεκριμένη χώρα (Wilson et al. 2002; Vorburger et al. 2003).

Σε πρόσφατη μελέτη οι Blackman et al. (submitted) χρησιμοποίησαν μικροδορυφόρους προκειμένου να εξετάσουν την προέλευση κοινών γενοτύπων (αυτών δηλαδή που βρέθηκαν περισσότερο από μια φορά και/ή σε περισσότερους από ένα πληθυσμό και είναι απίθανο να δημιουργήθηκαν από την εποχιακή σεξουαλική αναπαραγωγή στη ροδακινιά) σε σχέση με το φυτό ξενιστή (ροδακινιά, καπνός και άλλα φυτά) και την παραλλακτικότητα του βιολογικού κύκλου σε

περιοχές της Ελλάδας και της Νότιας Ιταλίας. Μετά την ανάλυση των δεδομένων βρέθηκε ότι οι κοινοί γενότυποι έφταναν το 49% και όπως ήταν αναμενόμενο η προέλευσή τους ήταν από ανολοκυκλικούς κλώνους, δηλαδή εκείνους που αναπαράγονται συνεχώς παρθενογενετικά. Οι περισσότεροι από τους κοινούς γενότυπους βρέθηκαν σε περιοχές όπου καλλιεργείται καπνός και συλλέχθηκαν από καπνό και άλλα φυτά ενώ κάποιοι άλλοι βρέθηκαν σε περιοχές όπου δεν καλλιεργείται καπνός και συλλέχθηκαν αποκλειστικά από ζιζάνια. Προκειμένου να κατανοηθεί η εξέλιξη της διαδικασίας ειδίκευσης στον ξενιστή, που υπάρχει στην ομάδα της αφίδας *M. persicae*, καθώς και η έκταση της γενετικής διαφοροποίησης και της γενετικής ροής μεταξύ πληθυσμών που τρέφονται στο καπνό και εκείνων που δεν τον προτιμάνε, είναι απαραίτητο να επικεντρωθεί το ενδιαφέρον σε γενότυπους που συμμετείχαν σε σεξουαλική αναπαραγωγή.

Ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα της *M. persicae* είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας σε πολλές ομάδες εντομοκτόνων. Οι κύριοι μηχανισμοί που εμπλέκονται στην ανθεκτικότητα είναι οι εξής: (1) αυξημένη παραγωγή καρβοξυλεστερασών που οφείλεται σε πολλαπλά αντίγραφα των γονιδίων E4 και FE4), (2) τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση (MACE) και (3) τροποποιημένη δίοδος νατρίου (knockdown resistance, kdr) (για άρθρο επισκόπησης βλέπε Devonshire et al. 1998). Η πίεση επιλογής από τα εντομοκτόνα και η δομή της γενετικής πληθυσμών του *M. persicae* είναι πιθανόν να μεταβάλλονται στο χώρο και στο χρόνο, κάτι που μπορεί να οδηγήσει στην παραλλακτικότητα των επιπέδων ανθεκτικότητας σε φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου. Συγκεκριμένα, όταν ένα μικρό ποσοστό γενοτύπων του κύριου πληθυσμού μπορέσει να εγκατασταθεί με επιτυχία σε μια καινούρια γεωγραφική περιοχή, τα χαρακτηριστικά της ανθεκτικότητας αυτού του πληθυσμού είναι πιθανό να επηρεαστούν από τη διαθέσιμη γενετική παραλλακτικότητα των μεταναστευτικών ατόμων (Fuentes et al. 2004).

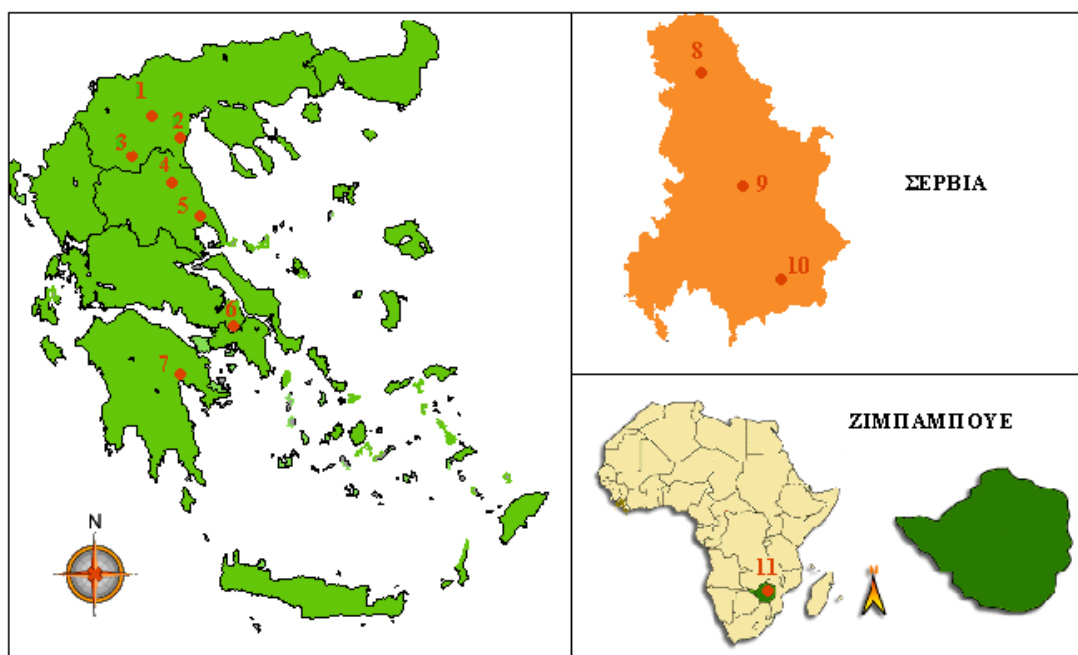
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Δειγματοληψίες αφίδων

Οι δειγματοληψίες έγιναν σε οπωρώνες ροδακινιάς και σε αγρούς καπνοκαλλιέργειας σε περιοχές της Νότιας, Κεντρικής και Βόρειας Ελλάδας τα έτη 2003 και 2004. Κάθε δείγμα αποτελούταν από 2-3 φύλλα και συλλέχθηκε από ένα δέντρο ή φυτό καπνού. Στους οπωρώνες ροδακινιάς τα δείγματα συλλέχθηκαν κάθε 2-3 γραμμές και κάθε 2-3 δέντρα επί της γραμμής. Τα δείγματα από τον καπνό συλλέχθηκαν κάθε 3-4 φυτά ανά γραμμή σε αποστάσεις 3-4 γραμμών. Κάθε δείγμα τοποθετούταν σε ειδικό αεροστεγές σακουλάκι δειγματοληψίας διογκωμένο με αέρα μαζί με απορροφητικό χαρτί για την απορρόφηση της υγρασίας. Η μεταφορά τους στο εργαστήριο γινόταν σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία με φορητά ψυγεία μικρού μεγέθους που περιείχαν παγοκύστες για την καλύτερη διατήρηση των δειγμάτων. Στο εργαστήριο δημιουργήθηκαν κλωνικές αποικίες με την τοποθέτηση ενός άπτερου παρθενογενετικού θηλυκού από κάθε δείγμα σε ειδικό κουτί εκτροφής αφίδων τύπου Blackman (1971). Με τον ίδιο τρόπο έγινε και η συλλογή των δειγμάτων από περιοχές της Σερβίας το έτος 2004, μόνο που από κάθε δείγμα 10 άπτερα θηλυκά τοποθετήθηκαν σε περιέκτες (erpendorf) στους -20°C για μοριακή ανάλυση, χωρίς να δημιουργηθούν κλωνικές αποικίες. Τέλος, για τις ανάγκες του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν και κάποια άτομα από τη Ζιμπάμπουε που ήταν αποθηκευμένα στους -20°C , από το έτος 2002. Οι περιοχές προέλευσης των αφίδων φαίνονται στην Εικόνα 1.

2.2 Έλεγχος βιολογικού κύκλου

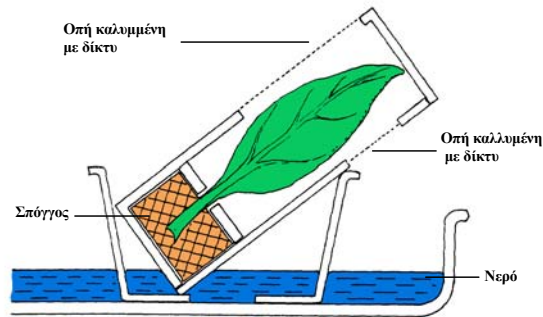
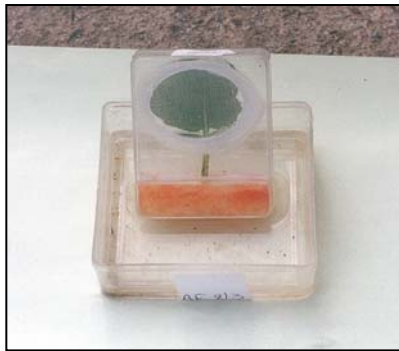
Οι δειγματοληψίες για τη συλλογή αφίδων που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του βιολογικού κύκλου, πραγματοποιήθηκαν σε οπωρώνες ροδακινιάς της Βόρειας Ελλάδας (Μελίκη, Κατερίνη, Κρύα Βρύση) και της Μαγνησίας (Λεχώνια) καθώς και σε καπνοκαλλιέργειες της Βόρειας, Κεντρικής (Καρδίτσα) και Νότιας Ελλάδας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



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

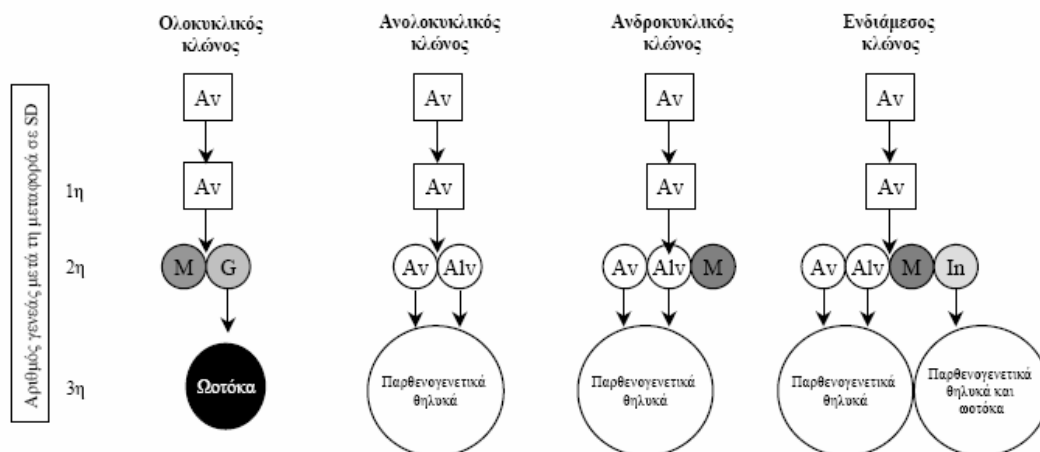
Για τη διατήρηση των κλώνων χρησιμοποιήθηκαν ειδικά κουτιά εκτροφής αφίδων (Blackman 1971) διαστάσεων 7,7 cm x 4,5 cm x 2 cm, στη βάση των οποίων υπήρχε τεμάχιο από σφουγγάρι. Σε αυτό τοποθετήθηκε φύλλο πατάτας *Solanum tuberosum* (Solanaceae) ποικιλίας Sprunta πάνω στο οποίο τρέφονταν οι αφίδες. Τα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

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



Εικόνα 2. Κουτί εκτροφής αφίδων τύπου Blackman.

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



Σχήμα 1. Διαφορετικές μορφές απογόνων στις τέσσερις κατηγορίες βιολογικού κύκλου του *M. persicae*. Av: άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά, M: αρσενικά, G: θηλυτόκα, Alv: πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά, In: ενδιάμεσα πτερωτά θηλυκά.

Αναγνωρίστηκαν τρεις κατηγορίες πτερωτών θηλυκών από τις μορφές των απογόνων τους, που μορφολογικά είναι όμοια. Τα θηλυτόκα γέννησαν σχεδόν

αποκλειστικά ωοτόκα θηλυκά, ενώ τα πτερωτά παρθενογενετικά παρήγαν παρθενογενετικές μορφές. Η τρίτη κατηγορία πτερωτών ήταν τα ενδιάμεσα που γέννησαν παρθενογενετικές μορφές και λίγα ωοτόκα. Οι ολοκυκλικοί κλώνοι στη δεύτερη γενιά σε SD παράγουν κυρίως θηλυτόκα, που γεννούν ωοτόκα (τρίτη γενιά). Αντίθετα, οι ανολοκυκλικοί κλώνοι στη δεύτερη γενιά παράγουν κυρίως άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά και αριθμό πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών. Βρέθηκαν και κλώνοι που χαρακτηρίστηκαν ως ενδιάμεσοι καθώς στη δεύτερη γενιά σε SD γέννησαν κυρίως άπτερα και πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά, λίγα αρσενικά και πτερωτά θηλυκά, που γέννησαν κυρίως παρθενογενετικές μορφές και λίγα ωοτόκα θηλυκά. Τα πτερωτά αυτά αποτελούν μια ενδιάμεση μορφή μεταξύ των θηλυτόκων των ολοκυκλικών κλώνων και των πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών των ανολοκυκλικών κλώνων. Αναπαράσταση όλων των κατηγοριών βιολογικού κύκλου του *Myzus persicae*, που μπορεί να προκύψουν ύστερα από τη διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω, δίνεται στο Σχήμα 1.

2.3 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA

Για την μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας χρησιμοποιήθηκαν τρεις πολυμορφικοί μικροδορυφορικοί τόποι (Myz2, Myz25 και Myz35) σε 137 κλωνικές σειρές του *M. persicae* που προέρχονταν από 7 διαφορετικούς πληθυσμούς (Πίνακας 2). Οι Myz2 και Myz25 απομονώθηκαν και κατασκευάστηκαν για πρώτη φορά από τον G. Malarky (Μουσείο Φυσικής Ιστορίας, Λονδίνο, Blackman et al. submitted) ενώ ο Myz35 από τους Sloane et al (2001). Οι συγκεκριμένοι μικροδορυφόροι έχουν χρησιμοποιηθεί και σε άλλες μελέτες γενετικής πληθυσμών του *M. persicae*, στις οποίες αποδείχτηκε ότι μπορούν να αναγνωρίσουν κλωνικούς γενότυπους με μεγάλη ακρίβεια (Wilson et al 2002, Sloane et al 2001, Fuentes et al. 2004, Blackman et al. submitted, Margaritopoulos et al. submitted). Η αλληλουχία των μικροδορυφόρων (εκκινητών) παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.

Μετά τη δημιουργία κλωνικών σειρών στο εργαστήριο, συλλέχθηκαν περίπου 10 άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά από κάθε κλώνο, τοποθετήθηκαν σε περιέκτη (ependorf) και στη συνέχεια σε καταψύκτη στους -20 °C. Ακολούθησε απομόνωση DNA χρησιμοποιώντας μόνο μια αφίδα από κάθε κλώνο εφαρμόζοντας τη μέθοδο των Sunnucks & Hales (1996). Σε ορισμένες αφίδες εφαρμόστηκε με επιτυχία και η μέθοδος απομόνωσης DNA των Martinez-Torres et al. (1997). Τα ακριβή πρωτόκολλα των απομονώσεων δίνονται στο Παράρτημα (σελ 135-136).

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

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

Η ενίσχυση των μικροδορυφορικών τόπων έγινε με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης (PCR). Ετοιμάστηκαν αντιδράσεις των 20 μl που περιείχαν 1 μl DNA (50-100 ng), 0,6 U *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech, Heraklion, Greece), πρότυπο διάλυμα απαλλαγμένο από ιόντα Mg^{++} , 25 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTPs και 1 μM από κάθε εκκινητή. Οι αντιδράσεις έλαβαν χώρα σε συσκευή PCR erppendorf (Mastercycler personal) (Εικόνα 3), που περιελάμβανε διαφορετικές συνθήκες για κάθε εκκινητή. Συγκεκριμένα, για τον Myz 2 εφαρμόστηκε το εξής πρόγραμμα: Ένας κύκλος που περιελάμβανε αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 2 min, 40 κύκλοι που περιείχαν: αποδιάταξη στους 94 °C για 40 sec, συγκόλληση των εκκινητών στους 52 °C για 45 sec, επέκταση στους 72 °C για 45 sec και 1 κύκλος στους 72 °C για 4 min που αποτέλεσε την τελική επέκταση. Στους άλλους δυο εκκινητές εφαρμόστηκε το ίδιο πρόγραμμα με κάποιες μετατροπές. Στην περίπτωση του Myz 25 άλλαξε η θερμοκρασία συγκόλλησης από 52 °C σε 55 °C, ενώ στην περίπτωση του Myz 35 άλλαξε ο αριθμός των κύκλων από 40 σε 30. Το πολλαπλασιαζόμενο DNA, μέχρι να χρησιμοποιηθεί παρέμεινε στους 4 °C.

Η αναγνώριση των αλληλομόρφων έγινε σε πηκτή πολυακρυλαμίδης 8% (τα συστατικά παρασκευής της παρατίθενται στο Παράρτημα σελ 141). Παράλληλα με τη διαδικασία παρασκευής του διαλύματος της πολυακρυλαμίδης, έγινε και η προετοιμασία του υποδοχέα της συσκευής κάθετης αλληλούχισης στον οποίο έγχυση του διαλύματος, λίγο πριν στερεοποιηθεί. Ο υποδοχέας αποτελείται από δυο υάλινες πλάκες διαστάσεων 35X40 cm. Στην υάλινη πλάκα όπου θα κολλήσει η πηκτή, τοποθετείται

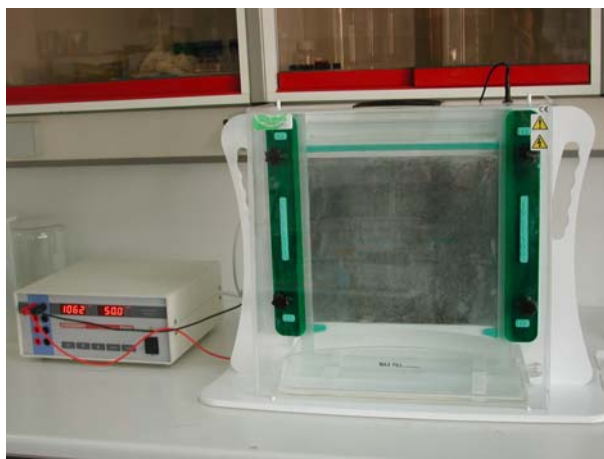


Εικόνα 3. Αριστερά η συσκευή PCR, eppendorf (Mastercycler personal).

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

Περιοχή	Ημερομηνία Συλλογής	Ξενιστής	Αριθμός δειγμάτων που εξετάστηκαν		
			Microsatellites	kdr	E4, FE4
Μαγνησία (CEGP)		Ροδακινιά		41	35
Λεχώνια	2003		-	16	8
Λεχώνια	2004		21	25	27
Β. Ελλάδα (NGP)		Ροδακινιά	33	43	39
Μελίκη	2003		13	20	12
Μελίκη	2004		20	23	27
Κ. Σερβία (SERP)	2004	Ροδακινιά	10	11	8
Κ. Ελλάδα (CGT)		Καπνός	33	39	32
Καρδίτσα	2003		17	15	13
Καρδίτσα	2004		16	24	19
Β. Ελλάδα (NGT)		Καπνός		40	29
Μελίκη	2004		15	16	12
Κατερίνη	2004		-	11	7
Κρύα Βρύση	2004		-	13	10
Ν. Ελλάδα (SGT)		Καπνός		21	16
Αμφίκλεια	2004		-	10	6
Ναύπλιο	2004		-	11	10
Β. Σερβία (SERT)	2004	Καπνός	10	12	10
Ζιμπάμπουε (ZIMT)	2002	Καπνός	15	14	5

με ένα απαλό χαρτομάντιλο επάνω στο τζάμι 1 ml διαλύματος που περιέχει 950 μl αιθανόλη 100%, 50 μl οξικό οξύ και 3 μl Bind Silane (3-(Trimethoxysilyl) propyl methacrylate minimum 98 %, 25 ml, Sigma - Aldrich). Στην άλλη υάλινη πλάκα τοποθετείται με τον ίδιο τρόπο 1 ml της ουσίας Sigmacote (Sigma – Aldrich, 25 ml, Lot: 103K4360) ένα είδος σιλικόνης που αποτρέπει την πηκτή να κολλήσει πάνω στην υάλινη πλάκα. Σε 6 μl από κάθε αντίδραση της PCR έγινε προσθήκη 2 μl



Εικόνα 4. Συσκευή ηλεκτροφόρησης σε λειτουργία.

διαλύματος φόρτωσης (loading buffer) και το μίγμα τοποθετήθηκε στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 3 λεπτά, αφού προηγουμένως υπέστη αποδιάταξη στους $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 5 λεπτά. Στη συνέχεια έγινε τοποθέτηση των δειγμάτων στην πηκτή πολυακρυλαμίδης 8 %. Έγινε ηλεκτροφόρηση στα 1.500 V (Εικόνα 4) μέσα σε διάλυμα TBE 1X για ~3 ώρες. Μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης ακολούθησε η διαδικασία της χρώσης της πηκτής με μια μέθοδο που είναι βασισμένη στη χρήση νιτρικού αργύρου (AgNO_3).

Συνοπτικά, η πηκτή σταθεροποιήθηκε με την τοποθέτησή του σε διάλυμα οξικού οξέος 10 % για 20 λεπτά, ακολούθησε πλύσιμο με νερό διπλής απόσταξης και στη συνέχεια τοποθετήθηκε στο διάλυμα χρώσης που περιείχε AgNO_3 . Το χρώμα της πηκτής και τα αλληλόμορφα με τη μορφή ζωνών, εμφανίστηκαν όταν αυτό τοποθετήθηκε σε διάλυμα ανθρακικού νατρίου/ φορμαλδεΰδης/ θειοσουλφιδίου του νατρίου (30 gr/L NaCO_3 , 1.5 ml/L φορμαλδεΰδη 37 % και 200 ml/L θειοσουλφιδίου του νατρίου 10 mg/ml). Η αντίδραση τερματίστηκε με τη χρήση διαλύματος οξικού οξέος 10 % και η πηκτή ξεπλύθηκε με νερό διπλής απόσταξης. Στη συνέχεια στέγνωσε σε θερμοκρασία δωματίου και ακολούθησε η διαδικασία αξιολόγησης του μεγέθους των αλληλομόρφων. Η εμφάνιση της πηκτής μετά από το τέλος της διαδικασίας παρουσιάζεται στην Εικόνα 5. Η εκτίμηση των αλληλομόρφων έγινε με τη βοήθεια της κλίμακας που παρέχει ένας μάρτυρας, ιδανικός για τον υπολογισμό μεγέθους αλληλομόρφων, που ανταποκρίνεται στην αλληλουχία του φορέα pGEM-3Zf(+) (Promega, USA). Αναλυτικά τα πρωτόκολλα της χρώσης και των διαλυμάτων φαίνονται στο Παράρτημα.σελ 137-138 και 142 αντίστοιχα.

2.3.1 Στατιστική ανάλυση

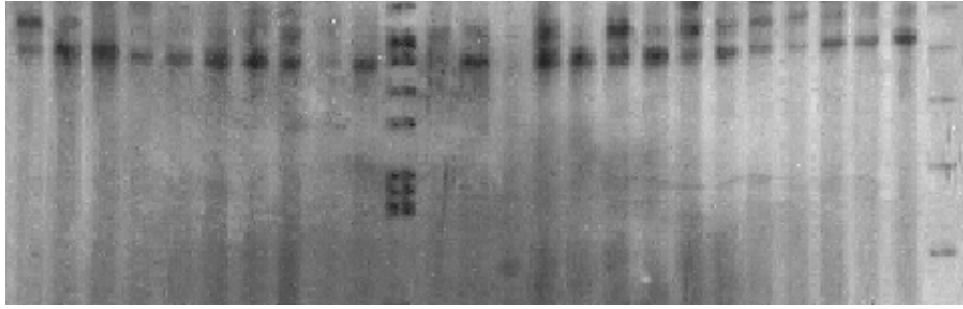
Συχνότητες αλληλομόρφων, ισορροπία Hardy-Weinberg και ανισορροπία σύνδεσης

Για τη στατιστική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ένα αντίγραφο από κάθε γενότυπο σε κάθε πληθυσμό. Αυτό αποτελεί κοινή πρακτική στην ανάλυση δεδομένων όταν χρησιμοποιούνται μικροδορυφόροι ως μοριακοί δείκτες, γιατί η κλωνική αναπαραγωγή των γενοτύπων μπορεί να οδηγήσει σε εσφαλμένα συμπεράσματα.

Οι συχνότητες των αλληλομόρφων, ο μέσος όρος των αλληλομόρφων που βρέθηκαν σε κάθε έναν από τους γενετικούς τόπους και πληθυσμούς που εξετάστηκαν καθώς και η ετεροζυγωτία υπολογίστηκαν με τη χρήση του προγράμματος GENEPOP έκδοση 3.4 (Raymond & Rousset, 1995a; <http://wbiomed.curtin.edu.au/generop/>). Η τυχόν απόκλιση από την ισορροπία Hardy-Weinberg εξετάστηκε με το ακριβές test (exact Hardy-Weinberg test) όπως προτάθηκε από τους Guo & Thompson (1992), ξεχωριστά για κάθε γενετικό τόπο. Για την εκτίμηση της ακριβούς τιμής της πιθανότητας P του συγκεκριμένου test χρησιμοποιήθηκε η αλυσιδωτή μέθοδος του Markov και επιπλέον εφαρμόστηκε ένα γενικό (global) test για όλους τους γενετικούς τόπους που εξετάστηκαν (Raymond & Rousset 1995b). Η ανάλυση ανεξαρτησίας των μικροδορυφορικών τόπων έγινε με τη χρήση test πιθανοτήτων για την εύρεση γενετικής ανισορροπίας καθώς και με τη χρήση της αλυσιδωτής μεθόδου του Markov.

Ανάλυση μεταξύ των πληθυσμών

Η γενετική διαφοροποίηση των πληθυσμών που εξετάστηκαν εξακριβώθηκε με βάση τις τιμές του συντελεστή παρέκκλισης F_{ST} , που υπολογίστηκαν για όλους τους γενετικούς τόπους (Weir & Cockerman 1984). Οι συγκρίσεις μεταξύ πληθυσμών έγινε με τη χρήση του προγράμματος Arlequin 2.0 (Schneider et al., 2000). Το σφάλμα που μπορεί να υπήρξε κατά τον υπολογισμό των τιμών F_{ST} μεταξύ των δειγμάτων, που βασίστηκε στην υπόθεση ότι δεν υπάρχουν διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, ελαχιστοποιήθηκε με τη διαδικασία μεταφοράς απλοτύπων μεταξύ των πληθυσμών. Η τιμή της πιθανότητας P του παραπάνω test, είναι η αναλογία των



Εικόνα 5. Πηκτή πολυακρυλαμίδης μετά από το τέλος της χρώσης (οι μαύρες ζώνες είναι τα αλληλόμορφα).

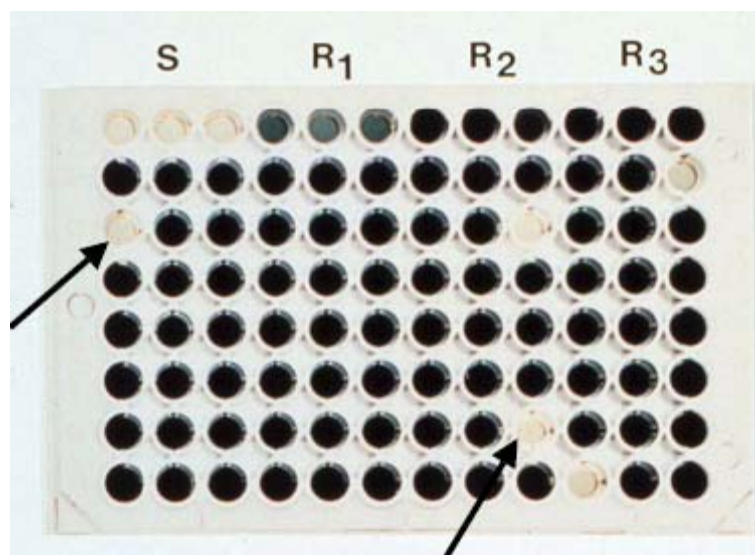
100.000 μεταθέσεων απλοτύπων οι οποίες οδήγησαν σε μια τιμή του F_{ST} πολύ υψηλότερη από την παρατηρούμενη. Επίσης, τα δεδομένα αναλύθηκαν με την Ανάλυση Μοριακής Παραλλακτικότητας (AMOVA, Excoffier et al. 1992) χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα Arlequin 2.0.

Ανάλυση γενετικής απόστασης

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

2.4 Βιοχημική μέθοδος εκτίμησης ενζυματικής δράσης ολικής εστεράσης

Η ολική δραστηριότητα των εστερασών, εκτιμήθηκε με τη χρωματομετρική μέθοδο (Εικόνα 6) όπως περιγράφηκε από τους Devonshire et al. (1992) καθώς και από τους Foster et al. (2002). Συνολικά εξετάστηκαν 193 κλωνικές σειρές από 5 διαφορετικούς πληθυσμούς (Μαγνησία-Ροδακινιά, Κ. Ελλάδα-Καπνός, Β. Ελλάδα-



Εικόνα 6. Αποτελέσματα χρωματομετρικής μεθόδου ανίχνευσης δραστηριότητας ολικών εστερασών (S = ευαίσθητος γενότυπος-μικρή δραστηριότητα εστερασών, R1-R3 = μετρίως – πολύ ανθεκτικοί γενότυποι-μέτρια ως υψηλή δραστηριότητα εστερασών).

Ροδακινιά, Β. Ελλάδα-Καπνός και Ν. Ελλάδα-Καπνός). Κάθε αφίδα ομογενοποιήθηκε με τη βοήθεια πολυομογενοποιητή (Εικόνα 7) σε πλάκα 96-βοθρίων. Σε κάθε βοθρίο υπήρχαν 100 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Na_2HPO_4 0,02 M, Ph 7,0, Triton X-100 0.1%). Στη συνέχεια 25 μl από το ομογενοποιημένο μίγμα μεταφέρθηκαν σε μια δεύτερη πλάκα η οποία περιείχε 25 μl ρυθμιστικού διαλύματος (Na_2HPO_4 0,02 M, Ph 7,0, Triton X-100 0.1%) σε κάθε βοθρίο. Η αντίδραση άρχισε με την προσθήκη 150 μl 1-naphthyl-acetate (0.3 mM) και ακολούθησε επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Μετά την επώαση προστέθηκαν 25 μl dodecylsulfate sodium salt (5%) σε κάθε βοθρίο και η πλάκα τοποθετήθηκε για 20 min σε χώρο με πλήρες σκοτάδι. Τελικά η αντίδραση μετρήθηκε με φασματοφωτόμετρο στα 620 nm και εκτιμήθηκε το επίπεδο της ανθεκτικότητας των αφίδων σύμφωνα με τις κλίμακες των Devonshire et al. (1992) και των Foster et al. (2002). Λεπτομέρειες της διαδικασίας που ακολουθήθηκε για την εκτίμηση της ενζυματικής δράσης της ολικής εστεράσης, δίνονται στο Παράρτημα (σελ 139-140).

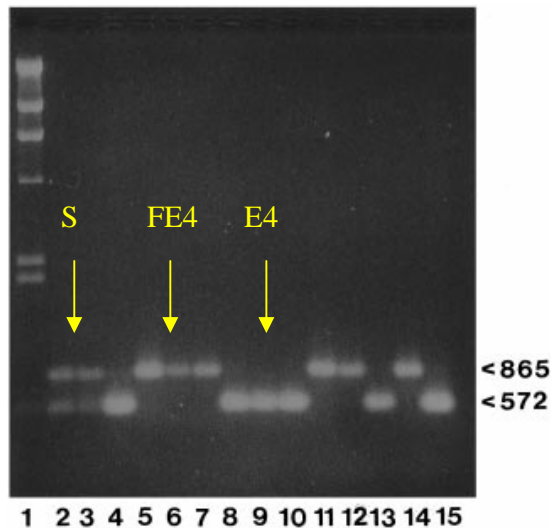


Εικόνα 7. Πολυμογενοποιητής που χρησιμοποιείται στη βιοχημική μέθοδο εκτίμησης ενζυματικής δράσης ολικής εστεράσης

2.5 Συχνότητα εμφάνισης γενοτύπων FE4 και E4

Στην αφίδα *M. persicae* η ανθεκτικότητα σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα προκύπτει με την ενίσχυση γονιδίων αποκωδικοποίησης των εστερασών E4 και FE4 που είναι υπεύθυνες για την αποτοξίκωση των εντομοκτόνων. Έχει αποδειχτεί ότι τα γονίδια E4 και FE4 ανήκουν σε μια οικογένεια γονιδίων που βρίσκεται κοντά στο τελομερίδιο του αυτοσώματος 1. Τα ενισχυμένα γονίδια E4 βρίσκονται σε αφίδες που έχουν την μετατόπιση του χρωμοσώματος A1,3. Σε όλες τις περιπτώσεις των αφίδων που εξετάστηκαν με τη μέθοδο FISH (Fluorescence *in situ* Hybridization) έχει αποδειχτεί ότι τα ενισχυμένα γονίδια βρίσκονται σε ένα ετερόζυγο τμήμα του αυτοσώματος 3T, το οποίο πιθανότατα μετακινήθηκε εκεί, από το αυτόσωμα 1 κατά τη διάρκεια της αμοιβαίας ανταλλαγής. Τα ενισχυμένα γονίδια E4 και FE4 περιέχουν στην αλληλουχία τους την 5-μεθυλοκυτοσίνη (5mC). Στην περίπτωση του γονιδίου E4, η απώλεια της 5mC σχετίζεται με την απώλεια έκφρασης και των δυο γονιδίων καθώς και με την ανθεκτικότητα στα εντομοκτόνα (Field et al. 1999).

Στη συγκεκριμένη μελέτη εκτιμήθηκε η συχνότητα εμφάνισης των γενοτύπων E4 και FE4 σε 181 κλωνικές σειρές που προήλθαν από 8 διαφορετικούς πληθυσμούς (5 από Ελλάδα, 2 από Σερβία και 1 από Ζιμπάμπουε, βλέπε Πίνακα 3). Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος PCR. Έγινε απομόνωση DNA χρησιμοποιώντας



Εικόνα 8. Φωτογραφία αγαρόζης που δείχνει τη παρουσία γενοτύπων E4, FE4 και ευαίσθητων (S).

μόνο μια αφίδα με τη μέθοδο των Sunnucks & Hales (1996). Χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (Field et al. 1999) με στόχο την εξακρίβωση ύπαρξης των γονιδίων E4 και/ή FE4. Οι εκκινητές ήταν οι Oligo 1, Oligo 2 και Oligo3. Από αυτούς ο Oligo 1 (5-GGGAATTTTGGATTCT-3) είναι ένας κοινός εκκινητής και για τα δυο γονίδια, ο Oligo 2 (5-GGCGGACCTGACGACTC-3) είναι ένας εκκινητής ο οποίος θα σηματοδοτήσει την ύπαρξη του γονιδίου E4 (572 bp) και ο Oligo3 (5-TGGTTGGGATCTAGGG-3) θα σηματοδοτήσει την ύπαρξη του γονιδίου FE4 (865 bp). Ετοιμάστηκαν αντιδράσεις των 25 µl που περιείχαν 1 µl DNA (50-100 ng), 1 U *Taq* DNA πολυμεράση (Minotech, Heraklion, Greece), ρυθμιστικό διάλυμα 1 X χωρίς ιόντα Mg^{++} , 25 mM $MgCl_2$, 200 mM dNTPs και 15-30 ng από κάθε εκκινητή. Οι αντιδράσεις έγιναν σε συσκευή PCR eppendorf (Mastercycler personal). Οι συνθήκες πολλαπλασιασμού του DNA στόχου ήταν οι εξής: 1 κύκλος με αρχική αποδιάταξη στους 94 °C για 30 sec, 35 κύκλοι που περιελάμβαναν: αποδιάταξη στους 94 °C για 30 sec, συγκόλληση των εκκινητών στους 45 °C για 120 sec και επέκταση στους 72 °C για 60 sec.

Το πολλαπλασιαζόμενο DNA παρέμεινε στους 4 °C μέχρι να γίνει ηλεκτροφόρηση σε 1 % πηκτή αγαρόζης, που περιείχε 0,5 µl/50 ml βρωμιούχο αιθίδιο σε διάλυμα TAE (40 mM Tris base-Acetic acid-1 mM EDTA, βλέπε παράρτημα σελ. 141-142). Ο οπτικός έλεγχος των ζωνών έγινε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και η πηκτή φωτογραφήθηκε με φωτογραφική

μηχανή τύπου Polaroid (Εικόνα 8). Το πολλαπλασιασμένο DNA των αφίδων που περιείχαν το ενισχυμένο γονίδιο E4 έδινε ζώνη μεγέθους 572 bp. Ενώ το πολλαπλασιασμένο DNA των αφίδων που περιείχαν το ενισχυμένο γονίδιο FE4 έδινε ζώνη μεγέθους 865 bp. Τα άτομα που χαρακτηρίστηκαν ως ευαίσθητα έδειξαν στην αγαρόζη και τις δυο ζώνες σε μικρή ένταση. Αυτό σημαίνει ότι τα άτομα αυτά φέρουν στο DNA τους και τα δυο γονίδια αλλά σε μη ενισχυμένη μορφή και επομένως δεν είναι σε θέση να αναπτύξουν ανθεκτικότητα.

2.6 Ανίχνευση γενοτύπων *kdr*

Εξετάστηκαν 221 κλώνοι *M. persicae* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, της Σερβίας και τη Ζιμπάμπουε (Πίνακας 2), με τη μέθοδο PCR και συγκεκριμένους εκκινητές που ανιχνεύουν τη μετάλλαξη στη δίοδο νατρίου. Χρησιμοποιήθηκαν τέσσερις εκκινητές οι οποίοι ενισχύουν τα τμήματα του DNA τόσο των ευαίσθητων όσο και των ανθεκτικών αλληλομόρφων. Τα αλληλόμορφα που περιέχουν τη μετάλλαξη της *kdr* χαρακτηρίζονται σαν ανθεκτικά (R) ενώ εκείνα που δεν την έχουν χαρακτηρίζονται σαν ευαίσθητα (S).

Από αυτούς τους εκκινητές, ο **Mp889** (5'-ATCTGGCATAAGTCTAAGAG-3') και ο **Mp103** (5'-GTCATGGGTATGCAGTTATITG-3') χρησιμοποιήθηκαν για να ενισχύσουν ένα τμήμα του DNA που βρίσκεται στα 900 bp και περιέχει την μετάλλαξη. Ο **Sd2** (5'-CTACTGTTGTCATTTGGTAACC-3') χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να ενισχύσει το ευαίσθητο αλληλόμορφο σε συνδυασμό με τον Mp889 και ο **Rv2** (5'-ATAGTACTATACATACCACGAA-3') χρησιμοποιήθηκε με σκοπό να ενισχύσει το ανθεκτικό αλληλόμορφο σε συνδυασμό με τον Mp103. Ο σχεδιασμός των εκκινητών Mp889 και Mp103 έγινε με τέτοιο τρόπο ώστε να δίνουν ζώνες διαφορετικού μεγέθους εξασφαλίζοντας τη διάκριση μεταξύ των ανθεκτικών (R-300bp) και των ευαίσθητων (S-600 bp) αλληλομόρφων.

Έγινε απομόνωση DNA χρησιμοποιώντας μόνο μια αφίδα με τη μέθοδο των Sunnucks & Hales (1996). Προκειμένου να πολλαπλασιαστεί το DNA στόχος εφαρμόστηκε, όπως ήδη αναφέρθηκε, η τεχνική της PCR. Οι αντιδράσεις που ετοιμάστηκαν είχαν συνολικό όγκο 25 μl και περιείχαν: 50-100 ng DNA, 1 μM από κάθε εκκινητή, 200 mM dNTPs, 25 mM MgCl₂, 1.25 U of *Taq* polymerase (Minotech, Heraklion, Greece) και 1X ρυθμιστικό διάλυμα χωρίς ιόντα Mg⁺⁺. Οι συνθήκες της PCR περιελάμβαναν τα εξής στάδια: (α) 1 κύκλος με αποδιάταξη στους

94 °C για 2 min, (β) 30 κύκλοι με: αποδιάταξη στους 94 °C για 30 sec , συγκόλληση των εκκινητών στους 59 °C για 1 min και επέκταση στους 72 °C για 50 sec .

Το πολλαπλασιασμένο DNA παρέμεινε στους 4 °C μέχρι να γίνει ηλεκτροφόρηση σε 1 % πηκτή αγαρόζης, που περιείχε 0,5 μl βρωμιούχο αιθίδιο σε 50 ml διάλυμα TAE (40 mM Tris base-Acetic acid-1 mM EDTA). Ο οπτικός έλεγχος των ζωνών έγινε σε συσκευή υπεριώδους ακτινοβολίας (UV) και η πηκτή φωτογραφήθηκε με φωτογραφική μηχανή τύπου Polaroid. Οι αφίδες που ήταν ομοζύγωτες και είχαν στο γονιδίωμά τους τη μετάλλαξη της *kdr* έδιναν δυο ζώνες, στα 300 και στα 900 bp (RR). Οι αφίδες που ήταν ομοζύγωτες και είχαν το ευαίσθητο αλληλόμορφο έδιναν δυο ζώνες, στα 600 και στα 900 bp (SS), ενώ οι ετεροζύγωτες αφίδες έδιναν και τις τρεις ζώνες (RS). Η ζώνη στα 900 bp χρησιμοποιήθηκε σαν μάρτυρας και ήταν παρούσα σε όλες τις περιπτώσεις.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

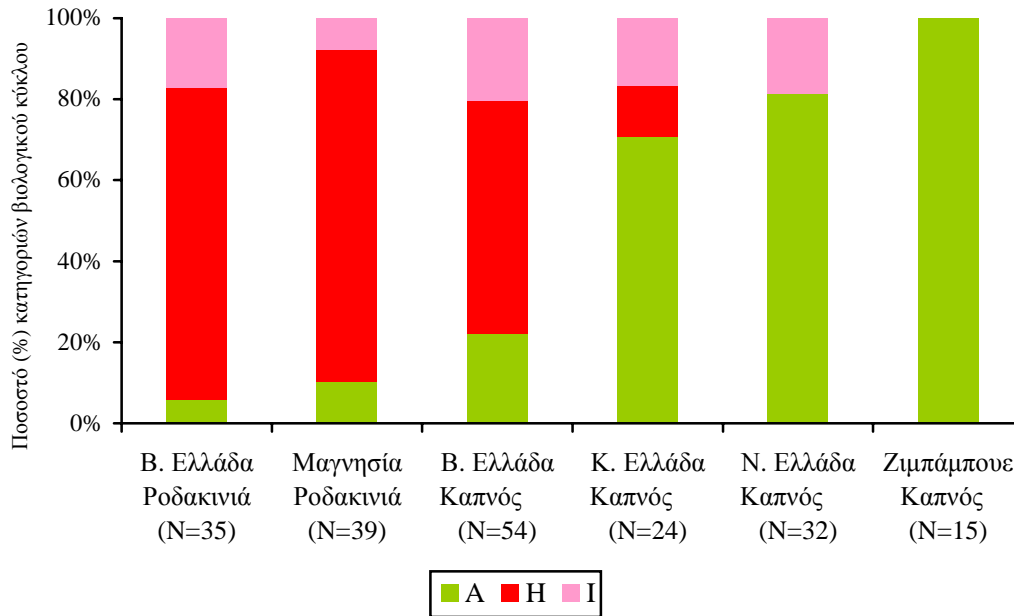
3.1 Βιολογικός κύκλος

Οι κλώνοι των αφίδων που συλλέχθηκαν από ροδακινιά σε περιοχές της Μαγνησίας (Λεχώνια, Βελεστίνο) και της Β. Ελλάδας (Μελίκη), βρέθηκαν ολοκυκλικοί στο μεγαλύτερο ποσοστό τους. Το μεγαλύτερο ποσοστό βρέθηκε στη Μαγνησία (82 %) και ακολούθησε η Β. Ελλάδα με 77 %. Σε μικρά ποσοστά βρέθηκαν ενδιάμεσοι και ανολοκυκλικοί κλώνοι (Σχήμα 2).

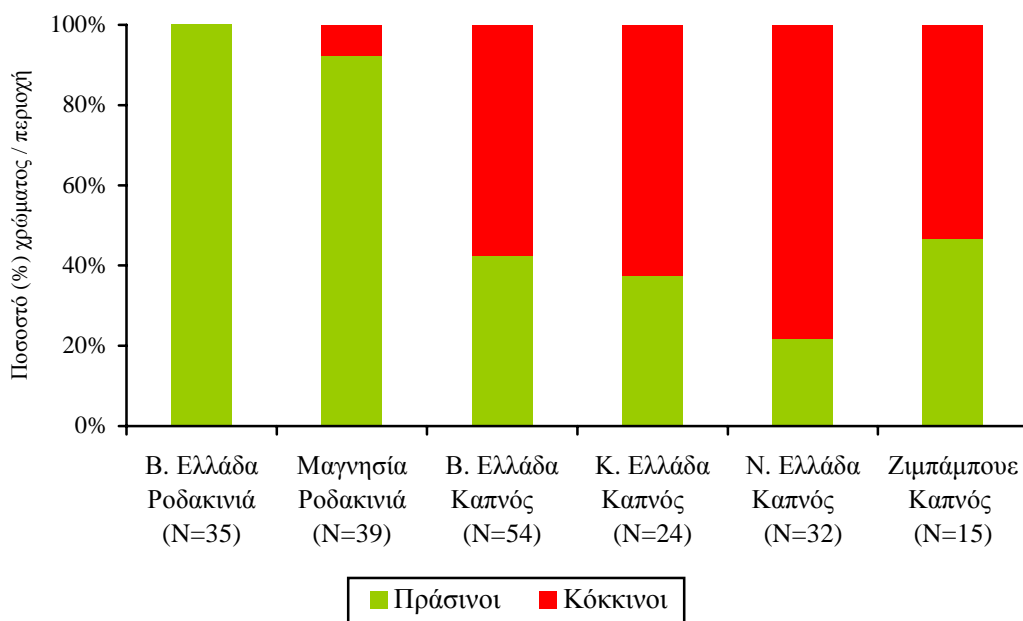
Ένα άλλο φαινόμενο που παρατηρείται στις περιοχές της Β. Ελλάδας, όπου έγινε η δειγματοληψία των αφίδων, είναι ότι σε πολύ κοντινές αποστάσεις με τους οπωρώνες της ροδακινιάς υπάρχουν καπνοκαλλιέργειες. Έτσι, λοιπόν, στις αφίδες που συλλέχθηκαν από καπνό στις συγκεκριμένες περιοχές και εξετάστηκε ο βιολογικός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

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

Σχετικά με το χρώμα των αφίδων οι περισσότεροι κόκκινοι κλώνοι συλλέχθηκαν από καπνό στις περιοχές της Νότιας (78 %) και της Κεντρικής (63 %) Ελλάδας. Στις ροδακινιά οι κλώνοι ήταν κυρίως πράσινου χρώματος τόσο στη Β. Ελλάδα (100 %) όσο και στη Μαγνησία (92 %). Στην Ελλάδα η γεωγραφική παραλλακτικότητα που παρατηρήθηκε στο χρώμα των κλώνων ακολουθεί αυτή του βιολογικού κύκλου. Δηλαδή, σε περιοχές, όπως η Β. Ελλάδα και η Μαγνησία, όπου βρέθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά ολοκυκλικών κλώνων, παρατηρήθηκαν και τα μεγαλύτερα ποσοστά πράσινου χρώματος (Σχήμα 3).



Σχήμα 2. Ποσοστό κατηγοριών βιολογικού κύκλου πληθυσμών του *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν το έτος 2004. (A: ανολοκυκλικοί, H: ολοκυκλικοί, I: Ενδιάμεσοι)



Σχήμα 3. Κατανομή πράσινων και κόκκινων κλώνων *Myzus persicae* ανάλογα με τη περιοχή και τον ξενιστή.

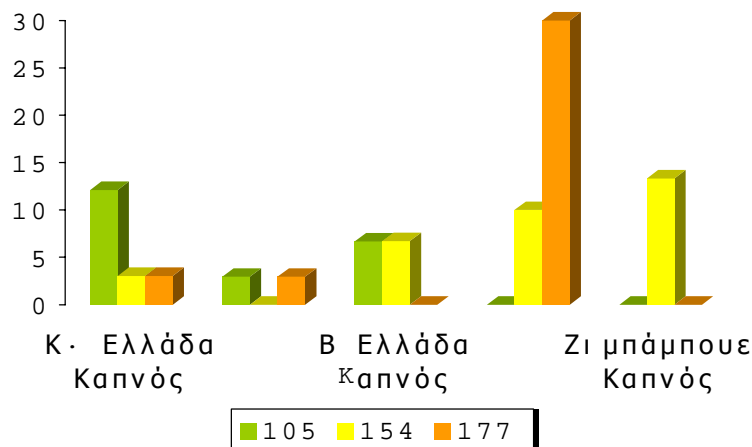
Πίνακας 3. Αριθμός κλώνων (N_C) που εξετάστηκαν με τρεις μικροδορυφόρους. N_G = αριθμός διαφορετικών γενοτύπων. C = κοινοί γενότυποι, M = πολλαπλοί γενότυποι, U = μοναδικοί γενότυποι. Τιμές σε παρένθεση δείχνουν ποσοστά (%).

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

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

3.2 Ανάλυση μικροδορυφόρων

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



Σχήμα 4. Συχνότητα (%) εμφάνισης των τριών πολυπληθέστερων κοινών γενοτύπων σε διάφορους πληθυσμούς.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*Για επεξήγηση των κωδικών βλέπε Πίνακα 4. N = αριθμός γενοτύπων που

εξετάστηκαν από κάθε περιοχή. $P_{Het.Deficit} + P_{Het.Excess}$ = πιθανότητα για περίσσεια και έλλειψη ετεροζυγωτίας αντίστοιχα

21 με σημαντική απόκλιση από την H-W ισορροπία. Στις 11 περιπτώσεις η απόκλιση συνοδεύεται από έλλειψη ετεροζυγωτίας (θετική τιμή του συντελεστή ομομιξίας F_{IS}). Επίσης το στατιστικό τεστ που εμπλέκει όλους τους γονιδιακούς τόπους έδειξε σημαντική έλλειψη ετεροζυγωτίας και στους 7 πληθυσμούς που εξετάστηκαν.

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

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

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

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

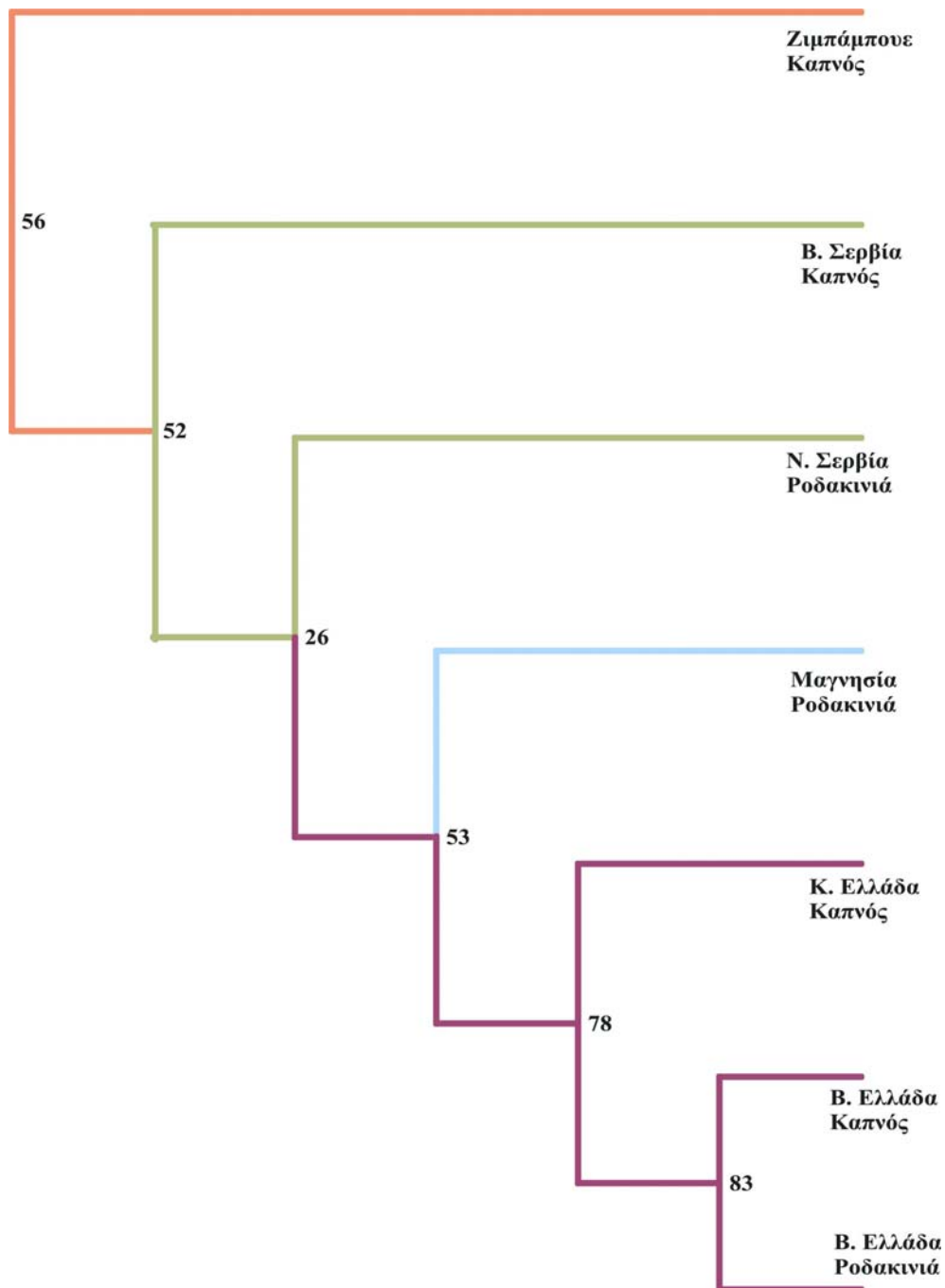
*Για επεξήγηση των κωδικών βλέπε Πίνακα 4. NS = non significant ($P > 0.05$), * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$.

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

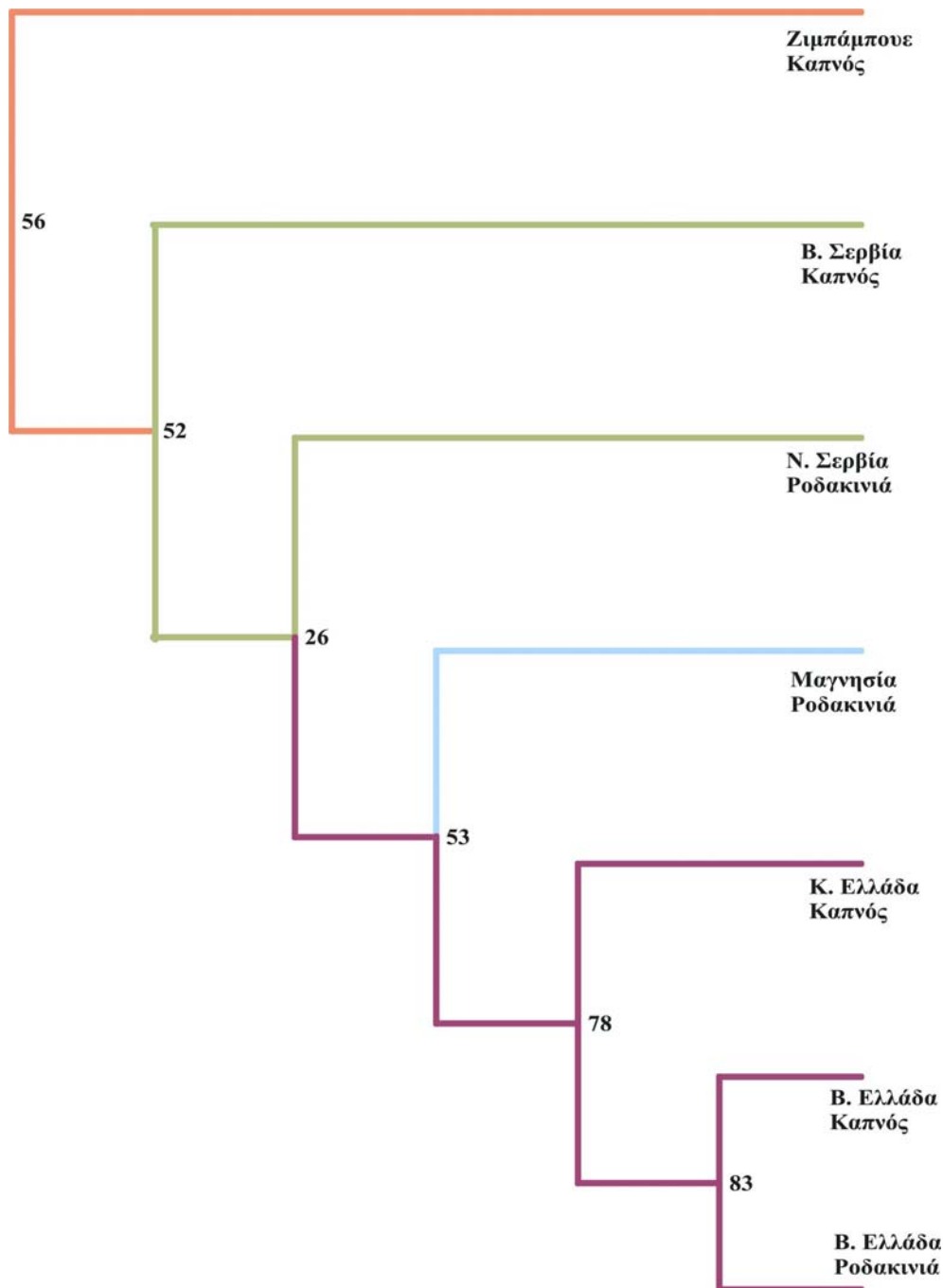
Πηγή Παραλλακτικότητας	B.E.	Άθροισμα τετραγώνων	Στοιχεία Παραλλακτικότητας	Παραλλακτικότητα %
Μεταξύ πληθυσμών	6	14.3	0.0437*	4.27
Εντός πληθυσμού	229	224.2	0.9792*	95.73
Σύνολο	235	238.5	1.0228*	
Ολικός συντελεστής F_{ST}		0,0427*		

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

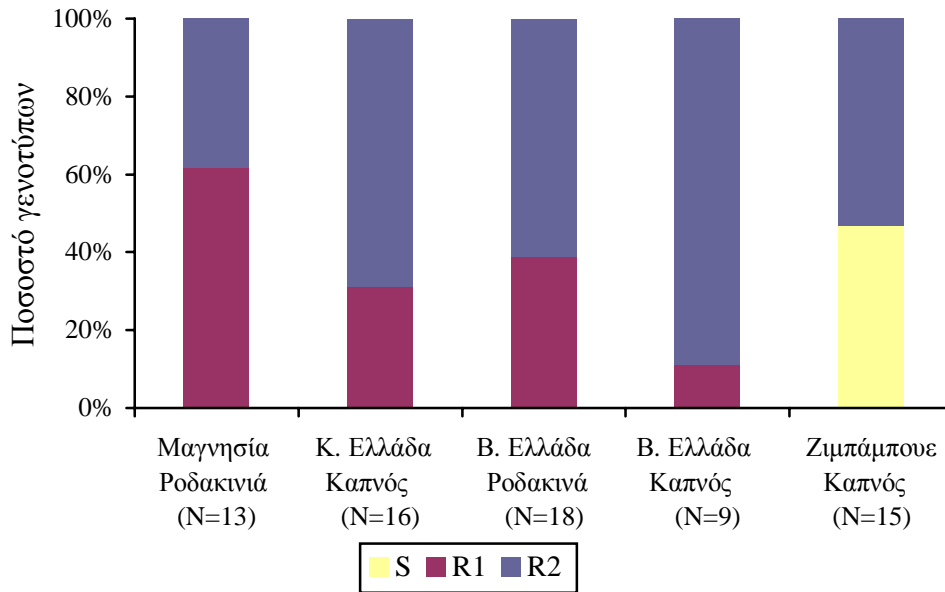
Παρόμοια αποτελέσματα έδειξε και η UPGMA ανάλυση βασισμένη στις γενετικές αποστάσεις των Chakraborty & Jin (1993) και των Nei et al. (1983) (Σχήματα 5α, 5β). Οι ξενικοί πληθυσμοί τοποθετήθηκαν εκτός της ομάδας των Ελληνικών. Μεταξύ των Ελληνικών πληθυσμών υπήρξε επιπλέον διαφοροποίηση. Ο πληθυσμός από τη Μαγνησία, όπου δεν καλλιεργείται καπνός διαφοροποιήθηκε από αυτούς που συλλέχθηκαν από περιοχές (Κεντρική και Βόρεια Ελλάδα) όπου καλλιεργείται ανεξάρτητα από τον ξενιστή συλλογής (ροδακινιά ή καπνός). Επίσης, ο πληθυσμός από καπνό από τη Β. Σερβία διαφοροποιήθηκε από αυτόν από ροδακινιά από τη Κ. Σερβία όπου δεν καλλιεργείται καπνός.



Σχήμα 5α. UPGMA δενδρόγραμμα βασισμένο στις γενετικές αποστάσεις: (A): των Chakraborty & Jin (1993) (DAS) μεταξύ των επτά πληθυσμών *Myzus persicae* που εξετάστηκαν: Μαγνησία-ροδακινιά (N = 21), Β. Ελλάδα-Ροδακινιά (N = 34), Β. Ελλάδα-Καπνός (N = 13), Κ. Ελλάδα-Καπνός (N = 23), Β. Σερβία-Καπνός (N = 10), Ν. Σερβία-Ροδακινιά (N = 10) και από Ζιμπάμπουε-Καπνός (N = 7).



Σχήμα 5β. UPGMA δενδρόγραμμα βασισμένο στις γενετικές αποστάσεις: των Nei et al. (1983) (Da) μεταξύ των επτά πληθυσμών *Myzus persicae* που εξετάστηκαν: Μαγνησία-ροδακινιά (N = 21), Β. Ελλάδα-Ροδακινιά (N = 34), Β. Ελλάδα-Καπνός (N = 13), Κ. Ελλάδα-Καπνός (N = 23), Β. Σερβία-Καπνός (N = 10), Ν. Σερβία-Ροδακινιά (N = 10) και από Ζιμπάμπουε-Καπνός (N = 7).

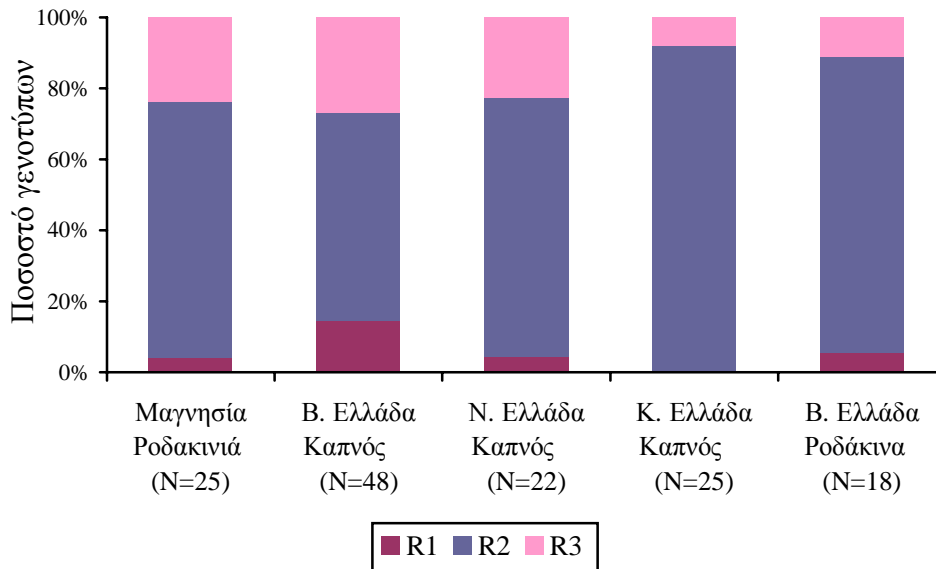


Σχήμα 6α. Ποσοστό εστερασών σε πληθυσμούς του *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν το έτος 2003 από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και τη Ζιμπάμπουε. N = αριθμός κλωνικών σειρών που εξετάστηκαν.

3.3 Ολική δραστηριότητα εστερασών

Σύμφωνα με τη μέθοδο που περιγράφηκε στο κεφάλαιο «Υλικά και Μέθοδοι», υπάρχουν ο ευαίσθητος γενότυπος και γενότυποι με τρία διαφορετικά επίπεδα ανθεκτικότητας (R1, R2 και R3). Στην περίπτωση των δειγμάτων του έτους 2003 δεν παρατηρήθηκε κανένα άτομο με ανθεκτικότητα R3 καθώς και κανένα ευαίσθητο. Όλα τα άτομα που εξετάστηκαν παρουσίασαν ανθεκτικότητα τύπου R1 και R2. Στην περιοχή της Μαγνησίας στα δείγματα από ροδακινιά παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό γενοτύπων R1 (61,5 %) ενώ υπήρξαν και γενότυποι με R2 (38,5 %). Αντίθετα στις περιοχές της Β. Ελλάδας το ποσοστό R2 (61,1 %) ήταν μεγαλύτερο από εκείνο του R1 (38,9 %). Στις περιοχές όπου τα δείγματα συλλέχθηκαν από καπνό, τα ποσοστά R2 ήταν υψηλότερα σε σχέση με τα R1. Το υψηλότερο ποσοστό R2 ήταν 88,9 % και σημειώθηκε και στους δυο πληθυσμούς από τη Β. Ελλάδα (Σχήμα 6α).

Το 2004, μειώθηκε αισθητά το ποσοστό των R1 σε όλες τις εξεταζόμενες περιοχές, σε σχέση με το έτος 2003. Αυξήθηκε εκείνο των R2 και εμφανίστηκε ο τύπος της R3 ανθεκτικότητας. Στις περιοχές της Μαγνησίας και της Β. Ελλάδας στα δείγματα από ροδακινιά τα ποσοστά R1 ήταν 4% και 5,5 %, αντίστοιχα. Στις ίδιες περιοχές αυξήθηκε το ποσοστό R2 που έφτασε το 83,3% στη Β. Ελλάδα και το 72%

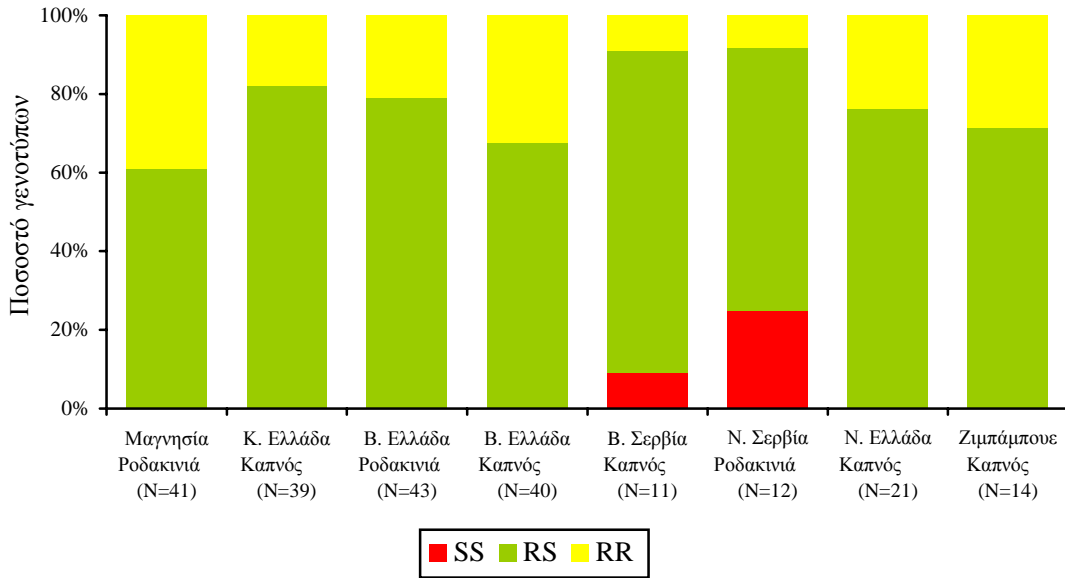


Σχήμα 6β. Ποσοστό εστερασών σε πληθυσμούς του *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν το έτος 2004 από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. N = αριθμός κλωνικών σειρών που εξετάστηκαν.

στη Μαγνησία, ενώ εμφανίστηκαν και αφίδες με ανθεκτικότητα R3 σε ποσοστά 24 % και 11,1 %, αντίστοιχα. Στις περιοχές όπου τα δείγματα συλλέχθηκαν από καπνό παρατηρήθηκαν παρόμοιες διακυμάνσεις μεταξύ των επιπέδων ανθεκτικότητας. Το μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικότητας R2 παρουσιάστηκε σε δείγματα που προέρχονταν από την Κ. Ελλάδα και έφτασε το 92 % όπου και δεν βρέθηκε καμία αφίδα με ανθεκτικότητα R1. Τα ποσοστά R3 κυμάνθηκαν από 8 % στη Κ. Ελλάδα μέχρι 27,1 % στη Β. Ελλάδα. Συνολικά, στα δείγματα του έτους 2004, το μεγαλύτερο ποσοστό ανθεκτικότητας παρατηρήθηκε στο επίπεδο R2 (72,46%) (Σχήμα 6β).

3.4 Καθορισμός της ανθεκτικότητας *kdr*

Σε όλους πληθυσμούς που εξετάστηκαν δεν βρέθηκαν ευαίσθητοι γενότυποι (SS) εκτός από τους δυο πληθυσμούς από τη Σερβία, σε συχνότητες 9-25 %. Σε όλες τις υπόλοιπες περιοχές ο γενότυπος που εμφανίστηκε με το μεγαλύτερο ποσοστό ήταν ο ετεροζύγωτος (RS). Στους Ελληνικούς πληθυσμούς, το μεγαλύτερο ποσοστό γενοτύπων RS εμφανίστηκε στη περιοχή της Κ. Ελλάδας σε δείγματα που συλλέχθηκαν από καπνό (82,1%). Στις υπόλοιπες περιοχές το ποσοστό κυμάνθηκε από 61,0 ως 79,1 %. Όσον αφορά τους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν εκτός Ελλάδας,

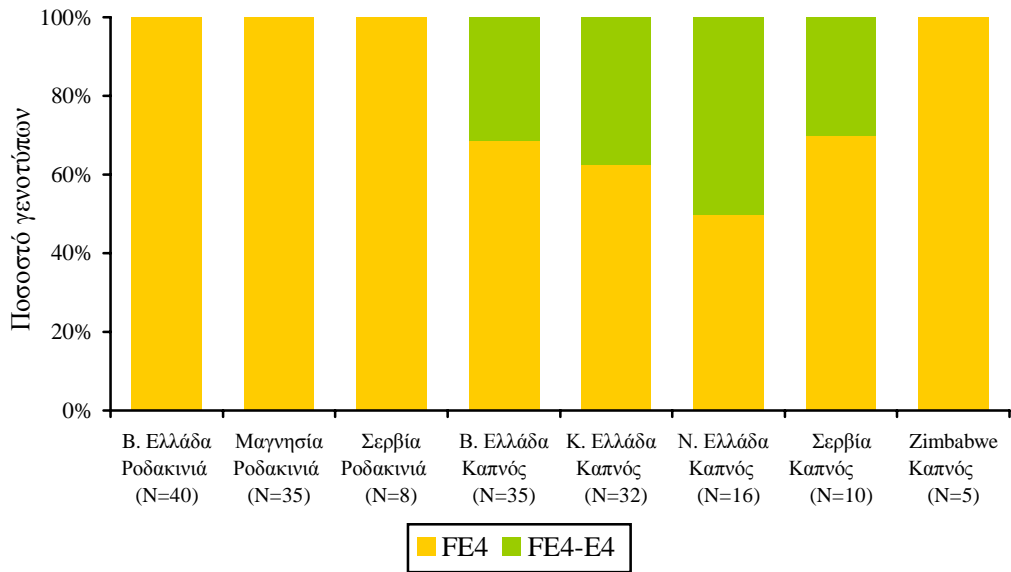


Σχήμα 7. Ποσοστό ανθεκτικότητας *kdr* σε πληθυσμούς του *Myzus persicae* που συλλέχθηκαν τα έτη 2003 και 2004 από την Ελλάδα, τη Σερβία και τη Ζιμπάμπουε.

το μεγαλύτερο ποσοστό γενοτύπων RS παρατηρήθηκε στον πληθυσμό από ροδακινιά από την Κ. Σερβία (81,8 %). Στους πληθυσμούς από καπνό από τη Β. Σερβία και τη Ζιμπάμπουε τα ποσοστά ήταν 71,4 % και 66,6 %, αντίστοιχα. Συνολικά το 72,6% των γενοτύπων που εξετάστηκαν ήταν RS. Σε όλους τους πληθυσμούς του *M. persicae* που εξετάστηκαν το 2004 βρέθηκαν ομόζυγοι γενότυποι με τη μετάλλαξη της *kdr* (RR). Τα ποσοστά των γενοτύπων RR κυμάνθηκαν από 8,1 % (Β. Σερβία- καπνός) ως 39,0 % (Μαγνησία- Ροδακινιά). Γενικά, δεν παρατηρήθηκε συσχέτιση μεταξύ κατανομής γενοτύπων της *kdr* και ξενιστή ή περιοχής (Σχήμα 7).

3.5 Εμφάνιση των γονιδίων FE4 και E4

Η πλειονότητα των κλωνικών σειρών βρέθηκε ότι έχει το γονίδιο FE4 ανεξάρτητα από την περιοχή συλλογής και την επικρατούσα στρατηγική αναπαραγωγής (σεξουαλική αναπαραγωγή: Μαγνησία, Β. Ελλάδα, μη-σεξουαλική αναπαραγωγή: Κεντρική και Νότια Ελλάδα, Ζιμπάμπουε). Στους πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από καπνό από την Ελλάδα και τη Σερβία βρέθηκαν κλώνοι που είχαν και τα δυο γονίδια (E4, FE4) σε ποσοστό που κυμάνθηκε από 31,4 ως 50 % (Σχήμα 8).



Σχήμα 8. Συχνότητα εμφάνισης των γονιδίων FE4 και FE4-E4 στους πληθυσμούς *Myzus persicae* που εξετάσθηκαν.

4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ

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

4.1. Κατηγορία βιολογικού κύκλου.

Ο βιολογικός κύκλος μελετήθηκε στους Ελληνικούς πληθυσμούς και σε αυτούς από την Ζιμπάμπουε. Στη χώρα της Ν. Αφρικής δεν βρέθηκε σεξουαλική αναπαραγωγή. Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι σε περιοχές της γης με υψηλή θερμοκρασία δεν ευδοκιμούν ολοκυκλικοί γενότυποι (δηλαδή αυτοί που έχουν μια σεξουαλική γενιά το χρόνο στον πρωτεύοντα ξενιστή, τη ροδακινιά, όπου παράγουν το διαχειμάζον ωό). Αυτό συμβαίνει γιατί θερμοκρασίες πάνω από 22 °C είναι απαγορευτικές για την παραγωγή σεξουαλικών μορφών (Bonnemaison 1951). Επίσης, στη συγκεκριμένη περιοχή λόγω του ήπιου χειμώνα είναι πιθανώς εφικτή η συνεχής παρθενογενετική αναπαραγωγή όλο το χρόνο σε ποώδεις ξενιστές (Blackman 1974). Όπως ήταν αναμενόμενο, η πλειονότητα των κλώνων από ροδακινιά στην Ελλάδα ήταν ολοκυκλικοί, δηλαδή προήλθαν από το διαχειμάζον ωό, προϊόν σεξουαλικής αναπαραγωγής που έλαβε χώρα το προηγούμενο Φθινόπωρο. Στον καπνό υψηλό ποσοστό ολοκυκλικών κλώνων βρέθηκε στη Β. Ελλάδα, όπου καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά. Οι ολοκυκλικοί κλώνοι από τη ροδακινιά μεταναστεύουν στο τέλος της άνοιξης-αρχές καλοκαιριού στις πλησίον καπνοκαλλιέργειες. Αντίθετα, στην Κ. Ελλάδα, όπου δεν καλλιεργείται εκτεταμένα η ροδακινιά (μόνο σποραδικοί οπωρώνες συναντώνται), το πλείστο των κλώνων από καπνό ήταν μη-ολοκυκλικοί, δηλαδή μπορούν και αναπαράγονται όλο το χρόνο παρθενογενετικά. Επίσης, βρέθηκε κάποια συσχέτιση χρώματος και κατηγορίας βιολογικού κύκλου, με περισσότερους πράσινους κλώνους να επενδύουν στη σεξουαλική αναπαραγωγή από ότι οι κόκκινοι. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με προγενέστερη μελέτη όπου εξετάστηκε η παραλλακτικότητα στη στρατηγική αναπαραγωγής σε πληθυσμούς από διάφορους ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας (Margaritopoulos et al. 2002).

4.2 Ανάλυση μικροδορυφορικού DNA

Η ανάλυση του μικροδορυφορικού DNA ανέδειξε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών της αφίδας που εξετάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Τόσο η ανάλυση F_{ST} όσο και αυτή που βασίστηκε στις γενετικές αποστάσεις των Chakraborty & Jin (1993) (shared allele distance, DAS) και των Nei et al. (1983) (D_a) διαχώρισε τους Ελληνικούς πληθυσμούς από αυτούς της Σερβίας και της Ζιμπάμπουε. Οι τιμές F_{ST} που υπολογίστηκαν μεταξύ των ελληνικών και των ξενικών πληθυσμών (κυρίως 0,05 - 0,13) είναι από τις μεγαλύτερες που έχουν καταγραφεί σε μελέτες γενετικής παραλλακτικότητας αφίδων με τη χρήση μικροδορυφόρων [*S. avenae*: 0.03 σε Γαλλικούς πληθυσμούς (Simon et al. 1999) και <0,05 σε πληθυσμούς από το Ηνωμένο Βασίλειο (Llewellyn et al. 2003), *R. padi*: 0.02 και 0.03 σε σεξουαλικούς και μη-σεξουαλικούς πληθυσμούς από τη Γαλλία, (Delmotte et al. 2002)]. Οι λόγοι της παρατηρούμενης γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών από τις διαφορετικές χώρες δεν είναι επί του παρόντος γνωστοί. Η φυσική επιλογή είναι ένας παράγοντας, καθώς διαφορετικοί γενότυποι προσαρμόζονται σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Για παράδειγμα, στη Γαλλία έχει βρεθεί διαφορετική γεωγραφική κατανομή μοναδικών (προϊόν σεξουαλικής παραγωγής) και κοινών (ανολοκυκλικό) γενοτύπων της αφίδας *S. avenae* που σχετίζεται με διαφορές στη χειμερινή θερμοκρασία (Simon et al. 1999). Στο *M. persicae* η απουσία ή η παρουσία της ροδακινιάς είναι υπεύθυνη για τη γεωγραφική κατανομή αυτών των γενοτύπων, όπως έδειξαν επίσης προγενέστερες μελέτες με πληθυσμούς από την Ελλάδα και τη νότια Ιταλία (Margaritoroulos et al. 2002, Blackman et al. submitted). Παράγοντες που σχετίζονται με την πίεση επιλογής από εντομοκτόνα δεν μπορούν να αποκλεισθούν. Για παράδειγμα σημαντικό ποσοστό ευαίσθητων γενοτύπων στα οργανοφωσφορικά βρέθηκε στο δείγμα από τη Ζιμπάμπουε αν και η μετάλλαξη που προσδίδει ανθεκτικότητα στα πυρεθροειδή βρέθηκε σε υψηλή συχνότητα σε όλους τους πληθυσμούς. Αξίζει να σημειωθεί, ότι το φαινόμενο της γενετικής διαφοροποίησης γεωγραφικά απομακρυσμένων πληθυσμών έχει παρατηρηθεί σε διάφορα είδη αφίδων (π.χ. *S. avenae*: Wilson et al. 1999, Papura et al. 2003). Ένα ενδιαφέρον αποτέλεσμα είναι η διαφοροποίηση του πληθυσμού από τη Μαγνησία, περιοχή όπου δεν καλλιεργείται καπνός, από αυτούς από περιοχές της Ελλάδας όπου καλλιεργείται καπνός. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι ο καπνός αποικίζεται από το υποείδος *M. persicae nicotiana* ενώ στην περιοχή της Μαγνησίας επικρατεί το taxon *M. persicae* s.str. που αποικίζει άλλους δευτερεύοντες ξενιστές

(Margaritopoulos et al. 2000). Η γενετική αυτή διαφοροποίηση έχει τεκμηριωθεί αρκετά καλά σε προγενέστερη μελέτη όπου αναλύθηκαν πληθυσμοί από την Ελλάδα με 5 μικροδορυφορικούς τόπους (Margaritopoulos et al. submitted). Τα στοιχεία της παρούσας εργασίας δίνουν ενδείξεις ότι ανάλογη περίπτωση μπορεί να ισχύει και στους πληθυσμούς της Σερβίας. Ωστόσο, χρειάζεται περαιτέρω έρευνα για να τεκμηριωθεί αυτή η υπόθεση.

Ενδιαφέρον παρουσίασε η γεωγραφική εξάπλωση ορισμένων κοινών γενοτύπων. Συγκεκριμένα ο ίδιος γενότυπος βρέθηκε στην Ελλάδα, στη Σερβία και στη Ζιμπάμπουε. Ακόμη παρατηρήθηκε εξάπλωση του ίδιου γενοτύπου σε διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας ή και στη Σερβία. Το φαινόμενο αυτό είναι σχετικά συχνό τόσο στο ίδιο όσο και σε άλλα είδη αφίδων, όπως έχουν δείξει διάφορες μελέτες την τελευταία δεκαετία που βασίζονται στην ανάλυση DNA (Sunnucks et al. 1996, Fenton et al. 1998, Wilson et al. 1999, Haack et al. 2000, Llewellyn et al. 2003, Vorburger et al. 2003, Fuentes-Contreras et al. 2004, Margaritopoulos et al. submitted). Τα συγκριτικά πλεονεκτήματα των ευρέως εξαπλωμένων γενοτύπων που βρέθηκαν στην παρούσα εργασία αποτελούν αντικείμενο περαιτέρω έρευνας. Η πίεση επιλογής των εντομοκτόνων μπορεί να είναι ένας παράγοντας (Zamoum et al. 2005), αλλά αυτές οι μη-σεξουαλικές κλωνικές σειρές μπορεί να αποτελούν 'γενικού-σκοπού γενότυπους' (general-purpose genotypes, Lynch 1984) με ευρεία οικολογική ανοχή που μπορούν να επικρατούν σε μεταβαλλόμενα περιβάλλοντα.

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

Ένα άλλο σημείο προς συζήτηση είναι η έλλειψη ετεροζυγωτίας που παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς που εξετάστηκαν ανεξάρτητα από την περιοχή

προέλευσης ή την επικρατούσα στρατηγική αναπαραγωγής. Από ορισμένους ερευνητές έχει προταθεί η άποψη ότι πληθυσμοί που αποτελούνται από μη-σεξουαλικούς γενότυπους αφίδων με μακρά εξελικτική ιστορία (αρχαίοι γενότυποι) παρουσιάζουν περίσσεια ετεροζυγωτίας (Simon et al. 1999, Delmotte et al. 2002). Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι μια αρχαία απώλεια της σεξουαλικότητας δίνει τη δυνατότητα στους γενότυπους να συσσωρεύουν μεταλλάξεις που οδηγούν σε ετεροζυγωτία (Lynch 1984, Birky 1996). Η περίσσεια ομοζυγωτίας που παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς με μεγάλο ποσοστό μη σεξουαλικών γενοτύπων (Κ. Ελλάδα, Ζιμπάμπουε) μπορεί να εξηγηθεί μέσω μιας πρόσφατης δημιουργίας των μη-σεξουαλικών γενοτύπων. Αυτό μπορεί να συμβεί μέσω διασταύρωσης των μη-σεξουαλικών γενοτύπων (ορισμένοι παράγουν λίγα έμφυλα άτομα) με τους ολοκυκλικούς γενότυπους. Τέτοιου είδους ‘contagious parthenogenesis’ έχει αποδειχθεί στα είδη αφίδων *S. avenae* (Simon et al. 1999) και *R. padi* (Delmotte et al. 2001). Προγενέστερη μελέτη της παραλλακτικότητας του βιολογικού κύκλου στην Ελλάδα (Margaritoroulos et al. 2002) έδειξε ότι μέχρι το 33% των κλώνων, που συλλέχθηκαν στον πρωτεύοντα ξενιστή, τη ροδακινιά, δεν ήταν ολοκυκλικοί (= έχουν σεξουαλική φάση το φθινόπωρο). Αυτό υποδηλώνει τη μετάδοση της ανολοκυκλικότητας μέσω της σεξουαλικής αναπαραγωγής. Δυστυχώς, δεν ήταν δυνατό να μελετηθεί ο βιολογικός κύκλος των δειγμάτων από καπνό από τη Σερβία για να εξηγηθεί πληρέστερα το φαινόμενο της έλλειψης ετεροζυγωτίας. Η παρούσα εργασία έδειξε έλλειψη ετεροζυγωτίας ακόμη και στα δείγματα που συλλέχθηκαν από ροδακινιά (Β. Ελλάδα, Μαγνησία, Κ. Σερβία), όπου οι κλώνοι που εξετάστηκαν είναι προϊόντα σεξουαλικής αναπαραγωγής. Αυτό έχει παρατηρηθεί και σε άλλα είδη αφίδων (Simon et al. 1999, Delmotte et al. 2002) αλλά και σε πληθυσμούς του *M. persicae* στη Γαλλία (Guillemaud et al. 2003), την Αυστραλία και σε προγενέστερη μελέτη Ελληνικών πληθυσμών (Margaritoroulos et al. submitted). Διάφορες θεωρίες έχουν διατυπωθεί για αυτό το φαινόμενο (Simon et al. 1999; Delmotte et al. 2002), π.χ. μηδενικό αλληλόμορφο, ομομιξία και επιλογή. Περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για να αποδειχθεί κατά πόσο εμπλέκονται η επιλογή ή η ομομιξία.

4.3 Ανθεκτικοί γενότυποι σε οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα.

Στους Ελληνικούς πληθυσμούς δεν βρέθηκαν ευαίσθητοι γενότυποι στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα ανεξάρτητα από την περιοχή και τον ξενιστή προέλευσης. Αντίθετα στη Ζιμπάμπουε βρέθηκε υψηλό ποσοστό ευαίσθητων

κλώνων. Αυτό υποδηλώνει διαφορετική πίεση επιλογής όσον αφορά τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα που ασκείται στους πληθυσμούς των δυο χωρών και, όπως προαναφέρθηκε, πιθανώς εξηγεί εν μέρει τη γενετική διαφοροποίηση του δείγματος από τη Ζιμπάμπουε από τους πληθυσμούς των Βαλκανίων. Ενισχυτικό στοιχείο είναι ότι οι κλώνοι από τη Ζιμπάμπουε δεν παρουσιάζουν τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση που προσδίδει ανθεκτικότητα σε καρβαμιδικά εντομοκτόνα (rigimicarb και triazamate), ένας μηχανισμός που βρίσκεται σε υψηλή συχνότητα στους Ελληνικούς πληθυσμούς (Margaritoroulos et al. 2005). Γενικά, ο μηχανισμός που προσδίδει ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα παρουσιάζει ευρεία εξάπλωση σε διάφορες χώρες (Devonshire et al. 1998, Foster et al. 2002, Mazzoni & Cravedi 2002, Guillemaud et al. 2003). Ανησυχητικό είναι το γεγονός της παρουσίας σε πολύ υψηλό ποσοστό, έστω σε ετεροζύγωτη κατάσταση, της *kdr* μετάλλαξης στους πληθυσμούς τόσο από την Ελλάδα όσο και από τη Σερβία και τη Ζιμπάμπουε. Φαίνεται ότι η ανθεκτικότητα *kdr* εξαπλώνεται παγκοσμίως, μιας και οι αναφορές που είχαμε ως τώρα ήταν κυρίως από την Δυτική Ευρώπη (Devonshire et al. 1998, Foster et al. 2002, Guillemaud et al. 2003). Ένα στοιχείο που ενισχύει την υπόθεση αυτή είναι ότι ο κοινός γενότυπος 154 που συλλέχθηκε από τη Ζιμπάμπουε και τα Βαλκάνια είναι ετεροζυγώτης όσον αφορά τη μετάλλαξη *kdr*. Ένα άλλο σημείο προς συζήτηση είναι η απουσία κλωνικών σειρών που να έχουν μόνο το γονίδιο εστερασών E4. Προγενέστερη εργασία σε Ελληνικούς πληθυσμούς (Blackman et al. 1999) έδειξε ότι οι ολοκυκλικοί πληθυσμοί είχαν το γονίδιο FE4 και οι ανολοκυκλικοί το E4. Αυτό θεωρούταν ότι ίσχυε γενικότερα, μιας και το γονίδιο E4 συνοδεύεται από μια A1, 3 χρωμοσωμική μετατόπιση, που συνήθως οδηγεί σε μη βιώσιμους απογόνους μέσω τις σεξουαλικής αναπαραγωγής. Μετέπειτα, οι Cox et al. (2004) βρήκαν παρόμοια αποτελέσματα με τα δικά μας. Πιθανώς, οι Ελληνικοί πληθυσμοί έχουν υποστεί μια γενετική αλλαγή και η μεταφορά του E4 γονιδίου στους ολοκυκλικούς πληθυσμούς έγινε με τα λίγα σεξουαλικά άτομα που περιστασιακά παράγουν οι ανολοκυκλικοί γενότυποι. Πιθανώς, οι γενότυποι με FE4 και E4 γονίδια έχουν ένα συγκριτικό πλεονέκτημα που μπορεί να σχετίζονται και επιλέγονται σε καταστάσεις πίεσης επιλογής με οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.

Συνοψίζοντας, η παρούσα εργασία έδειξε ότι η αφίδα *M. persicae* παρουσιάζει σημαντική ενδοειδική γενετική παραλλακτικότητα που εν μέρει σχετίζεται με βιολογικά χαρακτηριστικά όπως η στρατηγική αναπαραγωγής, η προσαρμογή σε συγκεκριμένους ξενιστές, αλλά και με τους διαφορετικούς

μηχανισμούς ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα. Από μια πρακτική άποψη, που αφορά τη φυτοπροστασία, είναι ανησυχητικό το γεγονός της ευρείας εξάπλωσης αλληλομόρφων ανθεκτικότητας. Για την καλύτερη κατανόηση της βιο-οικολογίας του εντόμου και της ενδοειδικής γενετικής παραλλακτικότητας, σε όλα τα επίπεδα, κρίνεται σκόπιμο η συνέχιση της έρευνας εξετάζοντας πληθυσμούς από περισσότερες χώρες από διαφορετικές ηπείρους. Επίσης, τέτοιου είδους πληροφορίες είναι χρήσιμες για την ανάπτυξη και εφαρμογή συστημάτων φυτοπροστασίας σε ευρεία κλίμακα. Η σκοπιμότητα που έχει η περαιτέρω έρευνα στην ομάδα των αφίδων *M. persicae* είναι να δοθούν απαντήσεις σε ερωτήματα που απασχολούν χρόνια τους επιστήμονες που ασχολούνται με το συγκεκριμένο είδος. Συγκεκριμένα, όσον αφορά το υποείδος *M. persicae nicotianae*, η έρευνα κρίνεται απαραίτητη ώστε να διαπιστωθεί η προέλευση καθώς και η γεωγραφική κατανομή του εντόμου. Ενδιαφέρον παρουσιάζει επίσης και η μελέτη της προσαρμογής που μπορεί να έχουν οι αφίδες της ομάδας *Myzus persicae* σε καινούρια φυτά ξενιστές. Τέλος, η έρευνα που πρέπει να γίνει στον τομέα της ανθεκτικότητας πρέπει να κινηθεί προς δυο κατευθύνσεις: (α) στη συνεχή παρακολούθηση της εξέλιξης των υπαρχόντων μηχανισμών ανθεκτικότητας και (β) στην εξακρίβωση ύπαρξης καινούριων μηχανισμών ανθεκτικότητας.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Addicott, J. F.** (1978) Competition for mutualists: Aphid and ants. *Canadian Journal of Zoology* **56**, 2093-2096.
- Addicott, J. F.** (1979) A multispecies aphid-ant association: Density dependence and species-specific effects. *Canadian Journal of Zoology* **57**, 558-569.
- Alberts et al., B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P.** (1998) *Essential Cell Biology. An introduction to the Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York & London.
- Allen, R. C. & Budowle, B.** (1994) *Gel Electrophoresis of Proteins and Nucleic Acids: Selected Techniques*. W. de Gruyter, Berlin.
- Allfrey, V. G., Rivers, T.M., O' Conner, B.** (1957) *Cellular Biology: Nucleic Acids and Viruses*. New York Academy of Sciences, New York.
- Ansorge, W., Voss, H. & Zimmerman, J.** (1997) *DNA Sequencing Strategies: Automated and Advanced Approaches, EMBO Practical Course*. Wiley, New York.
- Avers, C. J** (1984) *Genetics*. Second edition. W. Grant Press, Boston.
- Banks, C. J.** (1962) Effects of the ant *Lasius niger* (L.) on insects preying on small populations of *Aphis fabae* Scop. on bean plants. *Annals of Applied Biology* **50**, 669-679.
- Barker, J. S. F., Starmer, W.T. & MacIntyre, R.J.** (1990) *Ecological and Evolutionary Genetics of Drosophila. Monographs in Evolutionary Biology series*. Plenum Press, New York.
- Barlett, B. R.** (1961) The influence of ants upon parasites, predators, and scale insects. *Annals of the Entomological Society of America* **54**, 543-551.
- Beebee, T. C. & Rowe G.** (2004) *An introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press, UK.
- Berg, P. & Singer, M.** (1992) *Dealing With Genes - The Language of Heredity*. University Science Books, Blackwell Scientific Publications, Mill Valley, California.
- Beridze, T. G.** (1986) *Satellite DNA*. Springer-Verlag, New York.
- Birkle, L.M. & Douglas, A.E.** (1999) Low genetic diversity among pea aphid (*Acyrtosiphin pisum*) biotypes of different plant affiliation. *Heredity* **82**, 605-612.

- Birky CW** (1996) Heterozygosity, heteromorphy, and phylogenetic trees in asexual eukaryotes. *Genetics* **144**, 427–437.
- Bittar, E. E & Bittar, N.** (1996) *Molecular and Cellular Genetics, Principles of Medical Biology series*. Volume 5. JAI Press, Greenwich, Connecticut.
- Blackburn, G. M. & Gait, M. J.** (1990) *Nucleic Acids in Chemistry and Biology*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford.
- Blackman, R. L.** (1971) Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Bulletin of Entomological Research* **60**, 533-546.
- Blackman, R. L.** (1972) The inheritance of life-cycle differences in *Myzus persicae* (Sulz.) (Hem., Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* **62**, 281-294.
- Blackman, R. L.** (1974) Life cycle variation of *Myzus persicae* (Sulz.) (Hom., Aphididae) in different parts of the world, in relation to genotype and environment. *Bulletin of Entomological Research* **63**, 595-607.
- Blackman, R. L.** (1978) Early development of the parthenogenetic egg in three species of aphids (Hemiptera: Aphididae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology* **7**, 33-44.
- Blackman, R. L.** (1980) Chromosomes and parthenogenesis in aphids. pp. 133-148. In: Blackman, R. L., Hewitt, G. M. & Ashburner M. (Eds), *Insect Cytogenetics*. 10th Symposium of the Royal Entomological Society of London, Blackwell, Oxford.
- Blackman, R. L.** (1987) Morphological discrimination of a tobacco feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae), and a key to New World *Myzus* (Nectarosiphon) species. *Bulletin of Entomological Research* **77**, 713-730.
- Blackman, R. L.** (1990) Specificity in aphid/plant genetic interactions, with particular attention to the role of the alate colonizer. pp. 251-274. In Campbell R. K. & Eikenbary R. D. (Eds) *Aphid-Plant Genotype Interactions*. Elsevier, New York.
- Blackman, R. L. & Eastop, V. F.** (2000) *Aphids of the World's Crops: An Identification and Information Guide*. Second edition. John Wiley & Sons Publications, London.
- Blackman, R. L. & H. Takada** (1975) A naturally occurring chromosomal translocation in *Myzus persicae* (Sulzer). *Journal of Entomology* **50**, 147-156.

- Blackman, R.L. & Spence, J.M.** (1992) Electrophoretic distinction between the peach-potato aphid, *Myzus persicae* and the tobacco aphid, *Myzus nicotianiae* (Hemiptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* **82**, 161-165.
- Blackman, R. L., J. M. Spence, L. M. Field & Devonshire, A. L.** (1995) Chromosomal location of the amplified esterase genes conferring resistance to insecticides in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Heredity* **75**, 297-302.
- Blackman, R. L., J. M. Spence, L. M. Field, N. Javed, G. J. Devine & Devonshire, A. L.** (1996) Inheritance of the amplified esterase genes responsible for insecticide resistance in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Heredity* **77**, 154-167.
- Blackman, R. L., J. M. Spence, L. M. Field & Devonshire, A. L.** (1999) Variation in the chromosomal distribution of amplified esterase (*FE4*) genes in Greek field populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Heredity* **82**, 180-186.
- Blackman, R., Malarky, G., Margaritopoulos, J., Kephalogianni, T., Tsitsipis, J. & Wilson, A.** (2001) Tobacco aphid, or not tobacco aphid - that is the question! p. 71, *Sixth International Symposium on Aphids 'Aphids in a New Millennium'*, 3-7 September 2001, Rennes, France.
- Blackman, R.L., Malarky, G., Margaritopoulos, J.T. & Tsitsipis, J.A** (submitted) Genetic structure of populations of *Myzus persicae* in Greece, in relation to life cycle and host plant. *Bulletin of Entomological Research*.
- Bonnemaison, L.** (1951) Contribution a l'étude des facteurs provoquant l'apparition des formes ailées at sexuées chez Les Aphidinae. *Annales Epiphyties* **2**, 1-380.
- Bonner, J. T.** (1988) *The Evolution of Complexity by Means of Natural Selection*. Princeton: Princeton University Press.
- Börner, C.** (1939) Anfälligkeit, Resistenz und Immunität der Reben gegen Reblaus. Allgemeine Gesichtspunkte zur Frage der Spezialisierung von Parasiten; die harmonische Beschränkung des Lebensraums. *Zeitschrift für Hygiene Zoologie Schädlingsbekämpfung* **31**, 274-258.
- Brain, C. K.** (1942) The tobacco aphid. *Rhodesian Agricultural Journal* **39**, 241-243.
- Brogdon, W.G.** (1989) Biochemical resistance detection: an alternative to bioassay. *Parasitology Today* **5**, 56-60.
- Brogdon, W.G. & Barber A.M.** (1990) Microplate assay of glutathione S-transferase activity for resistance detection in single-mosquito homogenates. *Comperative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology* **96**, 339-42.

- Brogdon, W.G. & McAllister, J.C.** (1997) Heme peroxidase activity measured in single mosquitoes identifies individuals expressing an elevated oxidase for insecticide resistance. *Journal of the American Mosquito Control Association* **13**, 233-7.
- Brogdoun, W. G. & McAllister, J. C.** (1998) Insecticide resistance and Vector Control. *Emerging Infection Diseases*, **4**.
- Brunt A.A., Crabtree, K., Dallwitz, M. J., Gibbs, A. J. & Watson, L.** (1996) *Viruses of plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Cab International.
- Burns, D. P.** (1973) The foraging and tending behavior of *Dolichoderus taschenbergi* (Hymenoptera: Formicidae). *Canadian Entomologist* **105**, 97-104.
- Callen, D. F., Thompson, A. D., Shen, Y., Phillips, H. A., Richards, R.I., Mulley, J. C., Sutherland, G. R.** (1993) Incidence and origin of "Null" alleles in the (AC)n microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics* **52**, 922-927.
- Cassanelli, S., Cerchiari, B., Giannini, S., Bizzaro, D., Mazzoni E. & Manicardi, G. C.** (2005) Use of the RFLP-PCR diagnostic test for characterizing MACE and *kdr* insecticide resistance in the peach potato aphid *Myzus persicae*. *Pest Management Science* **61**, 91-96.
- Chakraborty, R. & Jin, L.** (1993) A unified approach to the study of hypervariable polymorphisms: statistical considerations of determining relatedness and population distances. pp. 153-175. In Pena, D. J., Chakraborty, R., Epplen, J. T. & Jeffreys, A. J. S. (Eds) *DNA Fingerprinting: State of the Science*. Birkhauser, Basel, Switzerland.
- Ciofi, C., Funk, S.M., Coote, T., Cheesman, D.J., Hammond, R.L., Saccheri, I.J. & Bruford, M.W.** (1998) Genotyping with microsatellite markers. pp. 195-201. In Karp, A., Isaac, P.G. & Ingram, D.S. (Eds). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London.
- Clements, K. M., Sorenson, C. E., Wiegmann, B. M., Neese, P. A. & Roe, R. M** (2000) Genetic, biochemical, and behavioral uniformity among populations of *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **95**, 269-281.
- Cregan, P. B., Bhagwat, A. A., Akkaya, M. S., Jiang, R.** (1994) Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. *Methods in Molecular Cell Biology* **5**, 49-61.

- Crother, B. I.** (1990) Is "some better than none" or do allele frequencies contain phylogenetically useful information? *Cladistics* **6**, 277-281.
- Darwin, C.** (1872) *The origin of species*.
- De Jong, J. K.** (1929) Enkele resultaten von het onderzoek naar de biologie von de tabaksluis *Myzus persicae* Sulzer. *Bulletin van het Deli Proefstation te Medan* **28**, 1-36.
- Delmotte, F., Leterme, N., Bonhomme, J., Rispe, C. & Simon, J.-C.** (2001) Multiple routes to asexuality in an aphid specie *Proceedings of the Royal Society of London Series B* **268**, 2291-2299.
- Delmotte, F., Leterme, N., Gauthier, J.-P., Rispe, C. & Simon, J.-C.** (2002) Genetic architecture of sexual and asexual populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* based on allozyme and microsatellite markers. *Molecular Ecology* **11**, 711–723.
- Denholm, I. & Jespersen, J. B.** (1998) Insecticide resistance management in Europe: recent developments and prospects. *Pesticide Science* **52**, 153-159.
- Devonshire, A., Field, L. M., Foster, S. P., Moores, G. D., Williamson, M. S. & Blackman, R. L.** (1998) The evolution of insecticide resistance in the peach potato aphid, *Myzus persicae*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London series B* **353**, 1677-1684.
- Devonshire, A. L., Devine, G. J. & Moores, G. D.** (1992) Comparison of microplate esterase assays and immunoassay for identifying insecticide resistant variants of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* **82**, 459-463.
- Devonshire, A., Denholm, I. & Foster, S.** (1999) Insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* στα εντομοκτόνα. pp. 87-94. In Denholm, I. & Ioannidis, P.M. (Eds.) *Combating Insecticide Resistance*. AgroTypos SA, Athens.
- Dixon, A. F. G.** (1966) The effect of the population density and nutritive status of the host on the summer reproductive activity of the sycamore aphid, *Drepanosiphum platanoides* (Suchr.). *Journal of Animal Ecology* **35**, 105-112.
- Dixon, A. F. G.** (1998) *Aphid Ecology*. Second Edition. Chapman and Hall, London, U.K.
- Dixon, A. F. G. & Kundu, R.** (1994) Ecology of host alternation in aphids. *European Journal of Entomology* **91**, 63-70.

- Eastop, V. F.** (1973) Deductions from the present day host plants of aphids and related insects. *Insect plant Relationships* (ed. H.F. van Emdem), *Symposium of Royal Entomological Society of London* **6**, 157-178.
- Eastop, V. F.** (1977) Worldwide importance of aphids as virus vectors. *In*: K. F. Harris and K. Maramorosch (eds.), *Aphids as Virus Vectors*, pp. 3-62. London, Academic Press.
- Eastop, V. F. & Blackman, R. L.** (2005) Some new synonyms in Aphididae (Hemiptera). *Zootaxa* **1089**, 1-36.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M.** (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**, 479–491.
- Fenton, B., Woodford, J.A.T. & Malloch, G.** (1998) Analysis of clonal diversity of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer), in Scotland, UK and evidence for the existence of a predominant clone. *Molecular Ecology* **7**, 1475-1487.
- Field, L. M., Javed, N., Stribley, M. F. & Devonshire, A. L.** (1994) The peachpotato aphid *Myzus persicae* and the tobacco aphid *Myzus nicotianae* have the same esterase-based mechanisms of insecticide resistance. *Insect Molecular Biology* **3**, 143-148.
- Field, L. M., Crick, S.E. & Devonshire, A. L.** (1996) Polymerase chain reaction-based identification of insecticide resistance genes and DNA methylation in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Insect Molecular Biology* **5**, 197-202.
- Field, L. M., Anderson, A. P., Denholm, I., Foster, S.P., Harling, Z.K., Javed, N., Martinez-Torres, D., Moores, G.D., Williamson, M.S., Devonshire, A.L.,** (1997) Use of biochemical and DNA diagnostics for characterising multiple mechanisms of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* Sulzer. *Pesticide Science* **51**, 283-289.
- Field, L. & Blackman, R.** (2003) Insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer): chromosome location and epigenetic effects on esterase gene expression in clonal lineages. *Biological Journal of the Linnean Society* **79**, 107–113.
- Figuera, C. C., Simon, J. C., Gallic, L. C & Niemeyer, H. M.** (1999) Molecular markers to differentiate two morphologically close species of the genus *Sitobion*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **92**, 217–225.
- Fisher, R.A.** (1930) *The Genetical Theory of Natural Selection*. Clarendon Press, Oxford.

- Foster, S. P., Denholm, I., Harling, Z. K., Moores, G. D. & Devonshire, A. L.** (1998) Identification of resistance in UK field populations of the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in 1996. *Bulletin of Entomological Research* **88**, 127-130.
- Foster, S. P., Denholm, I. & Thompson, R.** (2002) Bioassay and field-simulator studies of the efficacy of pymetrozine against peach-potato aphids, (Hemiptera: Aphididae), possessing different mechanisms of insecticide resistance. *Pest Management Science* **58**, 805-810.
- Fuentes-Contreras, E., Figueroa, C. C., Reyes, M., Briones, L. M. & Niemeyer, H. M.** (2004) Genetic diversity and insecticide resistance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations from tobacco in Chile: evidence of a single predominant clone, *Bulletin of Entomological Research* **94**, 11-18.
- Futuyma, D. J.** (1995) *Science on Trial: The Case for Evolution*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Futuyma, D. J.** (1997) *Evolutionary Biology*. Third edition. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts.
- Gillespie, J. H.** (2004) *Population Genetics: A Concise Guide*. The Johns Hopkins University Press.
- Goldstein, D. & Schlotterer, C.** (1999) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford.
- Goodman & Simon J.** (1998) Patterns of extensive genetic differentiation and variation among European harbor seals (*Phoca vitulina vitulina*) revealed using microsatellite DNA polymorphisms. *Molecular Biology and Evolution* **15**, 104-118.
- Guillemaud, T., Mieuze, L., & Simon, J-C.** (2003) Spatial and temporal genetic variability in French populations of the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Heredity* **91**, 143-152.
- Guillemaud, T., Brun, A., Anthony, N., Sauge, M. I., Boll, R., Delorme, R., Fournier, D., Lapchin, L., & Vanlerberghe-Masutti, F.** (2003) Incidence of insecticide resistance alleles in sexually-reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) from southern France. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 289-297.
- Guo, S. W. & Thompson, E. A.** (1992) Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* **48**, 361-372.

- Haack, L., Simon, J.-C., Gauthier, J.-P., Plantegenest, M. & Dedryver, C.-A.** (2000) Evidence for predominant clones in a cyclically parthenogenetic organism provided by combined demographic and genetic analyses. *Molecular Ecology* **9**, 2055-2066.
- Hales, D. F., Tomiuk, J., Wöhrmann, K. & Sunnucks, P.** (1997) Evolutionary and genetic aspects of aphid biology: a review. *European Journal of Entomology* **94**, 1-55.
- Hales, D., Wilson, A. C. C., Spence, J. M. & Blackman, R. L.** (2000) Confirmation that *Myzus antirrhinii* (Macchiati) (Hemiptera: Aphididae) occurs in Australia, using morphometrics, microsatellite typing and analysis of novel karyotypes by fluorescence in situ hybridization. *Australian journal of Entomology* **39**, 123-129.
- Hardy, G. H.** (1908) Mendelian proportions in a mixed population, *Science, N. S.* **28**, 49-50.
- Heie, O. E.** (1980) *The Aphidoidea (Hemiptera) of Fennoscandia and Denmark. II. The Family Drepanosiphidae*. Scandinavian Science Press, Klampenborg.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R.** (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology* **10**, 413-417.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R.** (1993) Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* **11**, 1026-1030.
- Hille, R. & Lambers, D.** (1953) Contribution to a monograph of the Aphididae of Europe. V. *Temminckia* **9**, 1-176.
- Ilharco, F. A & A. van Harten.** (1987) Systematics. pp. 51-76. In Minks A. K. & P. Harrewijn (Eds) *Aphids, Their Biology, Natural Enemies and Control*, **2A**, Elsevier, Amsterdam.
- Istock, C. A.** (1967) The evolution of complex life history phenomena: an ecological perspective. *Evolution* **21**, 211-234.
- Jarne, P. & Lagoda, P. J. L.** (1996) Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Evolution and Ecology* **11**, 424-429.
- Jones, M. G.** (1942) A description of *Aphis (Doralis) rumicis*, L. and comparison with *Aphis (Doralis) fabae*, Scop. *Bulletin of Entomological Research* **33**, 5-20.
- Kashi, Y. & Soller, M.** (1999) Functional Roles of Microsatellites and Minisatellites. In Goldstein & Schlotterer (Eds) *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press.

- Kelley, A. J. & Willis, J. H.** (1998) Polymorphic microsatellite loci in *Mimulus guttatus* and related species. *Molecular Ecology* **7**, 769-774.
- Kennedy, J. S., Day, M. F. & Eastop, V. F.** (1962) *A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses*. Commonwealth Institute of Entomology, London.
- Kolesova, D. A., Kuznetova, V. G. & Shaposhnikov, G. K.** (1980) Clonal variability in peach aphid, *Myzus persicae* Sulz. (Hemiptera: Aphididae) *Entomologicheskoe Obozrenie* **59**, 514-528 (in Russian). [English translation in *Entomological Review*] **59**, 21-34.
- Kundu, R. & Dixon, A. F. G.** (1995) Evolution of complex life cycles. *Journal of Animal Ecology* **64**, 245-255.
- Laine, K. J. & Niemelä, P.** (1980) The influence of ants on the survival of mountain birches during an *Oporinia aulumnata* (Lep. Geometridae) outbreak. *Oecologia* **47**, 39-42.
- Lees, A. D.** (1966) The Control of polymorphism in aphids. *Advances Insect Physiology* **3**, 207-277.
- Llewellyn, M.** (1972) The effects of the lime aphid, *Eucalypterus tiliae* L. (Aphididae) on growth of the lime, *Tilia x vulgaris* Hayne. I. Energy requirements of the aphid population. *Journal of Applied Ecology* **9**, 261-282.
- Llewellyn, K.S., Oxdale, H.D., Harrington, R., C. P. Brookes, C.P., Clark, S.J., & Sunnucks, P.** (2003) Migration and genetic structure of the grain aphid (*Sitobion avenae*) in Britain related to climate and clonal fluctuation as revealed using microsatellites, *Molecular Ecology* **12**, 21–34.
- Lynch, M.** (1984) Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *Quarterly Review of Biology* **59**, 257–290.
- Mackenzie, A & Dixon, A. F. G.** (1990) Host alternation in aphids: constraint versus optimization. *American Naturalist* **136**, 132-134.
- Margaritopoulos, J. T., Mamuris, Z. & Tsitsipis, J. A.** (1998) Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Hemiptera: Aphididae) by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique. *Annals of the Entomological Society of America* **91**, 602-607.
- Margaritopoulos, J. T., Tsitsipis, J. A., Zintzaras, E. & Blackman, R. L.** (2000) Host-correlated morphological variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) populations in Greece. *Bulletin of Entomological Research* **90**, 233-244.

- Margaritopoulos, J. T., Tsitsipis, J. A., Goudoudaki S. & Blackman, R. L.** (2002) Life cycle variation of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) in Greece. *Bulletin of Entomological Research* **92**, 309-319.
- Margaritopoulos, J. T., Blackman, R. L., Tsitsipis, J. A. & Sannino, L.** (2003) Coexistence of different host-adapted forms of *Myzus persicae* in the region of Caserta in South Italy. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 131–135.
- Margaritopoulos, J. T., Tsourapas, C., Tzortzi, M., Kanavaki, O. M. & Tsitsipis, J. A.** (2005) Host selection by winged colonisers within the *Myzus persicae* group: a contribution towards understanding host specialization. *Ecological Entomology* **30**, 406-418.
- Margaritopoulos, J. T., Malarky, G., Tsitsipis, J. A. & Blackman, R. L.** (submitted) Microsatellite DNA and behavioural studies provide evidence of host-mediated speciation processes in *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). *Journal of Evolutionary Biology*.
- Martinez-Torres, D., Foster, S. P., Field, L. M., Devonshire, A. L. & Williamson, M.S.** (1999) A sodium channel point mutation is associated with resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* 296 Insecticide resistance in *Myzus persicae persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology* **8**, 339-346.
- Maughan, P. J., Saghai Maroof M. A. & Buss, G. R.** (1996) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near isogenic line analysis. *Theoretical and Applied Genetics* **93**, 392-401.
- Mazzoni, E & Cravedi, P.** (2002) Analysis of insecticide-resistant *Myzus persicae* (Sulzer) populations collected in Italian peach orchards, *Pest Management Science* **58**, 975–980.
- McPherson, M.J. & Moller, S.G.** (2000) *PCR the basics from background to bench*. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Miyazaki, M.** (1987) Morphology of Aphids. pp. 1-25. In Minks A.K. & Harrewijn, P. (eds.), *Aphids Their Biology, Natural Enemies and Control*, **2A**. Elsevier, Amsterdam.
- Moores, G. D., Devine, G. J. & Devonshire, A. L.,** (1994a) Insecticide-insensitive acetylcholinesterase can enhance esterase-based resistance in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. *Pesticides Biochemical Physiology* **49**, 114-20.

- Moores, G. D., Devine, G. J. & Devonshire, A. L.** (1994b) Insecticide resistance due to insensitive acetylcholinesterase in *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae*. pp. 413-418. In *Brighton Crop Protection Conference: Pests and Diseases*, Bracknell, UK, BCPC.
- Moran, N. A.** (1983) Seasonal shifts in host usage in *Uroleucon gravicorne* (Hemiptera: Aphididae) and implications for the evolution of host alternation in aphids. *Ecological Entomology* **8**, 371-382.
- Moran, N. A.** (1988) The evolution of host-plant alternation in aphids: evidence for specialisation as a dead end. *American Naturalist* **132**, 681-706.
- Moran, N. A.** (1990) Aphid life cycles: two evolutionary steps. *American Naturalist*. **136**, 135-138.
- Mordvilko, A. K.** (1928) The evolution of cycles and the origin of heteroecy (migrations) in plant-lice. *Annals and Magazine Natural History (Series 10)* **2**, 570-582.
- Morgante, M., Pfeiffer, A., Jurman, I., Paglia, G. & Olivieri, A. M.** (1998) Isolation of microsatellite markers in plants. pp. 288-296. In Karp A, Isaac PG, Ingram DS (Eds). *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London.
- Moxon, R. E. & Christopher W.** (1999) DNA Microsatellites: Agents of Evolution? *Scientific American* **280**, 94-99.
- Müller, F. P.** (1954) Holozyklie und Anholozyklie bei der grünen Pflirsichblattlaus *Myzodes persicae* (Sulzer). *Zeitschrift für angewandte Entomologie* **36**, 369-380.
- Müller, F. P.** (1958) Bionomische Rassen der Grünen Pflirsichblattlaus *Myzus persicae* (Sulz.). *Archiv der Freunde der Naturgeschichte in Mecklenburg* **4**, 200-233.
- Mullis, K.** (1983) General nature of genetic code for proteins. *Nature* **192**, 1227-1232.
- Murphy, R. W.** (1993) The phylogenetic analysis of allozyme data: invalidity of coding alleles by presence/absence and recommended procedures. *Biochemical Systematics and Ecology* **21**, 25-38.
- Nei, M., Tajimaan, F., Tateno, Y.** (1983) Accuracy of estimated phylogenetic trees from molecular data. *Journal of Molecular Evolution* **19**, 153-170.

- Nikolakakis, N. N., Margaritopoulos, J. T. & Tsitsipis, J. A.** (2003) Performance of *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) clones on different host-plants and their host preference. *Bulletin of Entomological Research* **93**, 235-242.
- Ono, M., Swanson, J. J., Field, L. M., Devonshire, A. L. & Siegfried, B. D.** (1999) Amplification and methylation of an esterase gene associated with insecticide-resistance in greenbugs, *Schizaphis graminum* (Rondani) (Hemiptera: Aphididae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 1065-1073.
- Papura, D., Simon, J-C., Halkett, F., Delmotte, F., Gallic, J-F & Dedryver, C. A.** (2003) Predominance of sexual reproduction in Romanian populations of the aphid *Sitobion avenae* inferred from phenotypic and genetic structure *Heredity* **90**, 397-404.
- Price, P. W.** (1984) *Insect Ecology*. Second Edition. John Wiley & Sons, Inc.
- Puterka, G. J., Black, W. C., IV, Steiner, W. M. & Burton, R. L.** (1993) Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* **70**, 604–618.
- Raymond, M. & Rousset, F.** (1995a) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**, 248-249.
- Raymond, M. & Rousset, F.** (1995b) An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280-1283.
- Remaudière, G. & H. L. G. Stroyan.** (1984) Un *Tamalia* nouveau de Californie (USA). Discussion sur les Tamaliinae subfm. nov. (Hom. Aphididae). *Annales de la Société Entomologique de la France (Nouvelle Serie)* **20**, 93-103.
- Remaudière, G. & Remaudière., M.** (1997) *Catalogue of the World's Aphididae (Hemiptera, Aphidoidea)*. INRA, Paris.
- Rivnay, E.** (1962) *Field Crop Pests in the Near East*. W. Junk, Den Haag.
- Robinson, J. P. & Harris, S. A.** (1999) *Amplified Fragment Length Polymorphisms and Microsatellites: A phylogenetic perspective*, Department of Plant Sciences. University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RB, Great Britain.
- Rossetto, M., Slade, R. W., Baverstock, P. R., Henry, R. J., Lee, L. S.** (1999) Microsatellite variation and assessment of genetic structure in tea tree (*Melaleuca alternifolia* - Myrtaceae). *Molecular Ecology* **8**, 633-643.
- Sambrook, J. & Russell, D. W.** (2001) *Molecular cloning (A lab manual)*. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.

- Schlotterer, C.** (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* **109**, 365-371.
- Schlötterer, C. & Pemberton, J.** (1994) The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations. pp. 203-214. *In* Schierwater, B., Streit, B., Wagner, G.P. & DeSalle, R. (Eds). *Molecular Ecology and Evolution: ApproChEs and Applications*. Birkhäuser Verlag Basel, Switzerland,
- Schneider, S, Roessli, D. & Excoffier, L.** (2000) *Arelquin. A software for population genetic data analysis*, Version 2.0. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Shaposhnikov, G. C.** (1951) Evoljucija nekotorych grup thej v svyazi sz evoljuciej rozocvetnych (Evolution of some groups of aphids associated with the Rosaceae). *Izdattel'stuo Akademii Nauk SSr* **1**, 23-60.
- Shaposhnikov, G. C.** (1956) Filogeneticeskoe obosnovane sistemy korolkochvon stych thej (Anuraphidina) uctom ich sujazej s rasteniami (The phylogenetic basis of the systematics of the sort-tailed aphids (Anuraphidina) with reference to their relationships with hosts). *Trudy Zoologiceskogo Instituta Akademii Nauk SSSR* **23**, 215-320.
- Shaposhnikov, G. K.** (1981) *Population and Species in Aphids and the Need for a Universal Species Concept*. Special Publication, Research Branch, Agriculture Canada.
- Shaposhnikov, G. C.** (1987) Evolution of aphids in relation to evolution of plants. pp. 409-414. *In* Minks, A. K. & Harrewijn, P. (Eds), *Aphids their Biology, Natural Enemies and Control* **2A**. Elsevier, Amsterdam.
- Simon, J.-C., Baumann, S., Sunnucks, P., Hebert, P. D. N., Pierre, J.-C., Le Gallic, J.-F. & Dedryver, C. A.** (1999) Reproductive mode and population genetic structure of the cereal aphid *Sitobion avenae* studied using phenotypic and microsatellite markers. *Molecular Ecology* **8**, 531–545.
- Slade, N. A. & Wassersung, R. J.** (1975) On the evolution of complex life cycles. *Evolution* **29**, 568-571.
- Sloane, M., Sunnucks, P. & Wilson, A.** (2001) Microsatellite isolation, linkage group identification and determination of recombination frequency in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Genetical Research Cambridge* **77**, 251-260.

- Steichen, J. C. & Ffrench-Constant, R. H.** (1994) Amplification of specific cyclodiene insecticide resistance alleles by the polymerase chain reaction. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **48**, 1-7.
- Sunnucks, P., England, P. E., Taylor, A. C. & Hales, D. F.** (1996) Microsatellite and chromosome evolution of parthenogenetic *Sitobion* aphids in Australia. *Genetics* **144**, 747-756.
- Sunnucks, P., De Barro, P. J., Lushai, G., Maclean, N. & Hales, D.** (1997) Genetic structure of an aphid studied using microsatellites: cyclic parthenogenesis, differentiated lineages and host specialization. *Molecular Ecology* **6**, 1059-1073.
- Sunnucks, P.** (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Evolution* **5**, 199- 203.
- Takada, H.** (1986) Genotype composition and insecticide resistance of Japanese population of *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera: Aphididae). *Zeitschrift für Angewandte Entomologie* **102**, 19-38.
- Terradot, L., Simon, J.-C., Leterme, N., Bourdin, D., Wilson, A. C. C., Gauthier, J.-P. & Robert, Y.** (1999) Molecular characterization of clones of the *Myzus persicae* complex (Hemiptera: Aphididae) differing in their ability to transmit the potato leafroll luteovirus (PLRV). *Bulletin of Entomological Research*. **89**, 355-363.
- Τζανακάκης Μ. Ε.** (1980) Μαθήματα Εφαρμοσμένης Εντομολογίας. 2. Ειδικό μέρος. Έκδοση: Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη.
- Toda, S., Komazaki, S., Tomita, T. & Kono, Y.** (2004) Two amino acid substitutions in acetylcholinesterase associated with pirimicarb and organophosphorous insecticide resistance in the cotton aphid, *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae). *Insect Molecular Biology* **13**, 549–553.
- Troncoso, A. J., Vargas, R. R., Tapia, D. H., Olivares-Donoso, R. & Niemeyer, H. M.** (2005) Host selection by the generalist aphid *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and its subspecies specialized on tobacco, after being reared on the same host. *Bulletin of Entomological Research* **95**, 23-28.
- Tsitsipis, J. A., Lykouressis, D., Katis, N., Avgelis, A. D., Gargalianou, J., Papapanayotou, A. & Kokinis, G. M.** (1997) Aphid species diversity demonstrated by suction trap captures in different areas in Greece. pp. 495-501. *In*

- Nieto J.M. Nafria & Dixon, A. F. G. (Eds.), *Aphids in natural and managed ecosystems*. Universidad de León (Secretariado de publicaciones), León (Spain).
- van Emden, H. F., Eastop, V. F, Hughes, R. D. & Way, M. J.** (1969) The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Revue of Entomology* **14**, 197-270.
- Vanlerberghe-Masutti, F. & Chavigny, P.** (1998) Host-based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprints. *Molecular Ecology* **7**, 905-914.
- Via, S.** (1991a) The genetic structure of host plant adaptation in a spatial patchwork: demographic variability among reciprocally transplanted pea aphid clones. *Evolution* **45**, 827-852.
- Vontas J., Hejazi M. J., Hawkes N. J., Cosmidis, N., Loukas M. & Hemingway, J.** (2002) Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology* **11**, 329-336.
- Vorburger, C., Lancaster, M. & Sunnucks, P.** (2003) Environmentally related patterns of reproductive modes in the aphid *Myzus persicae* and the predominance of two ‘superclones’ in Victoria, Australia. *Molecular Ecology* **12**, 3493-3504.
- Waldhauer, W.** (1953) Über Rassendifferenzierung im Formenkreis der Grünen Pfirsichblattlaus (*Myzodes persicae* Sulzer). *NachrBl. dt. PflSchutzdienst, Berl.* **7**, 95-99.
- Waldhauer, W.** (1957) Untersuchungen an Klonen der Grünen Pfirsichblattlaus *Myzodes persicae* (Sulzer) zur Frage ihrer virginogenen Überwinterung. (Inaug. Diss.) 115 pp. Bonn, Pfirsichblattlaus (*Myzodes persicae* Sulzer) Rheinische Friedrich Wilhelms-Universität.
- Way, M. J. and C. J. Banks. 1967.** Intraspecific mechanism in relation to the natural regulation of numbers of *Aphis fabae* Scop. *Annals of Applied Biology* **59**, 189-205.
- Way, M. J. and C. J. Banks. 1968.** Population studies on the active stages of the black bean aphid, *Aphis fabae* Scop., on its winter host *Euonymus europaeus* L. *Annals of Applied Biology* **62**, 177-197.
- Way, M. J. & Cambell, M.** (1970) Aggregation behavior in relation to food utilization by aphids. In Watson, A. (ed.). *Animal Population in Relation to their Food Resources. Symposium of British Entomological Society* **10**, 229-246.
- Weed, C. L.** (1896) The hibernation of aphids. *Psyche* **7**, 351-362.

- Weinberg, W.** (1908) Über den Nachweis der Vererbung beim Menschen. *Jahresh. Wuertt. Ver. vaterl. Natkd.* **64**, 369-382.
- Wickner, R. B.** (1974) *DNA Replication Methods in Molecular Biology*. Volume 7. Dekker, New York.
- Wilbur, H. M.** (1980) Complex life cycles. *Annual Review of Ecological Systems* **11**, 67-93.
- Wilson, A. C. C., Sunnucks, P. & Hales, D. F.** (1999) Microevolution, low clonal diversity and genetic affinities of parthenogenetic *Sitobion* aphids in New Zealand *Molecular Ecology* **8**, 1655–1666.
- Wilson, A. C. C., Sunnucks, P., Blackman, R. L. & Hales, D. F.** (2002) Microsatellite variation on cyclically parthenogenetic populations of *Myzus persicae* in south-eastern Australia. *Heredity* **88**, 258-266.
- Wilson, A. C. C., Sunnucks, & Hales, D. F.** (2003) Heritable genetic variation and potential for adaptive evolution in asexual aphids (Aphidoidea). *Biological journal of the Linnean Society* **79**, 115-135.
- Wilson, A. C. C., Massonnet, B., Simon, J. C., Prunier-Letrme, N., Dolatti, L., Llewellyn, K. S., Figueroa, C. C., Ramirez, C.C., Blackman, R.L., Estoup, A. & Sunnucks, P.** (2004) Cross-species amplification of microsatellite loci in aphids: assessment and application. *Molecular Ecology Notes* **4**, 104-109.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C.** (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wong, M. L. & Medrano, J. F.** (2005) Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* **39**, 75-85.
- Wright, S.** (1931) Evolution in Mendelian Populations. *Genetics* **16**, 97-158.
- Χατζόπουλος, Π.** (2001) *Βιοτεχνολογία Φυτών*. Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα.
- Zagorovskii, A.V.** (1947) Leaf peach aphid (*Myzodes persicae* Sulzer) as a tobacco pest in Uzbekistan and measures for its control. 45 pp. Frunze Zos, Vsesoyuzny Institute Tabaka and Makhorki (in Russian). [Cited in Kolesova *et al.*, 1980].
- Zamoum, T., Simon, J.-C., Crochard, D., Ballanger, Y., Lapchin, L. & Vanlerberghe-Masutti, F.** (2005) Does insecticide resistance alone account for the low genetic variability of asexually reproducing populations of the peach-potato aphid *Myzus persicae*? *Heredity* **94**, 630-639.

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

ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

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

<http://www.woodrow.org>

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. ΜΕΘΟΔΟΙ

1.1 Απομόνωση DNA (Sunnucks & Hales, 1996)

- (1) Τοποθετείται μια αφίδα σε κάθε περιέκτη που περιέχει 300 μl διαλύματος TEN (0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0 2 mM EDTA, pH 8.0)/ 2% SDS (σε αναλογία 9:1) και 30 μl πρωτεϊνάσης K (20 mg/ml). Ακολουθεί ομογενοποίηση του μίγματος.
- (2) Επώαση του μίγματος στους 55 °C για 3 ώρες.
- (3) Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 100 μl NaCl 5M σε κάθε δείγμα.
- (4) Ακολουθεί έντονη ανακίνηση (vortex) των δειγμάτων για 15-30 sec και αμέσως μετά τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για 5 min στις 14.000 στροφές (τέτοιου είδους ανακίνηση σπάει τα τμήματα του DNA σε κομμάτια μικρότερα των 10-20 kb).
- (5) Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε καινούριους περιέκτες, όπου γίνεται προσθήκη 1 ml κρύας αιθανόλης 100%. Το μίγμα αναμειγνύεται με απαλή αναστροφή του περιέκτη.
- (6) Γίνεται τοποθέτηση των δειγμάτων στο πάγο ή στους -20 °C για 5 min και ακολουθεί φυγοκέντριση στους 4 °C για 15 min.
- (7) Το υπερκείμενο αφαιρείται και ο περιέκτης αφήνεται να στεγνώσει για μερικά δευτερόλεπτα σε απορροφητικό χαρτί τύπου Whatman. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 1 ml αιθανόλης 70 %.
- (8) Τα δείγματα τοποθετούνται στη φυγόκεντρο για 3 min στις 13.000 στροφές
- (9) Επαναλαμβάνονται τα βήματα 7 και 8.
- (10) Το υπερκείμενο αφαιρείται με πιπέτα ακριβείας και οι περιέκτες αφήνονται να στεγνώσουν σε απορροφητικό χαρτί.
- (11) Το DNA πρέπει να βρίσκεται στο κάτω μέρος του περιέκτη με τη μορφή μικρής, άσπρης, κηλίδας. Οι περιέκτες αφήνονται σκεπασμένοι με αλουμινόχαρτο (αλλά με ανοιχτό καπάκι), σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 min.
- (12) Μόλις διαπιστωθεί ότι ο περιέκτης είναι τελείως στεγνός, γίνεται προσθήκη 40 μl υπερκάθαρου H₂O.
- (13) Το DNA διαλύεται, με επώαση των δειγμάτων στους 37 °C για 30 min.
- (14) Αν το DNA χρησιμοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα, αποθηκεύεται στους 4 °C. Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε διάστημα 1-6 μήνες συντηρείται στους -21 °C και για πολύ μεγαλύτερο φυλάσσεται στους -70 °C.

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

- (1) Σε κάθε περιέκτη χωρητικότητας 1,5 ml, που περιέχει 160 µl διαλύματος 1 (10 mM Tris, 60 mM NaCl, 5% σουκρόζη και 10 mM EDTA p.H 7.8), τοποθετείται μια αφίδα και γίνεται ομογενοποίησή της.
- (2) Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 200µl διαλύματος 2 (300mM Tris: 1.25% SDS, 5% σουκρόζη και 10 mM EDTA p.H 9.0).
- (3) Τα δείγματα τοποθετούνται στο φούρνο, όπου επωάζονται στους 65 °C για 30 min.
- (4) Ακολουθεί προσθήκη 60 µl Sodium acetate 3M και το μίγμα τοποθετείται στους -20 °C για 20 min.
- (5) Γίνεται φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 15 min στις 14.000 στροφές.
- (6) Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο περιέκτη που περιέχει 420 µl ισοπροπανόλης.
- (7) Οι περιέκτες αφήνονται κλειστοί σε θερμοκρασία δωματίου για 5 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση για 10 min.
- (8) Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και ο περιέκτης αφήνεται για μερικά δευτερόλεπτα να στεγνώσει σε διηθητικό χαρτί.
- (9) Προσθήκη στον περιέκτη 1 ml αιθανόλης 70 % και φυγοκέντρηση για 5 min.
- (10) Γίνεται απόρριψη του υπερκειμένου και ο περιέκτης αφήνεται για μερικά δευτερόλεπτα να στεγνώσει σε διηθητικό χαρτί.
- (11) Το DNA πρέπει να βρίσκεται στο κάτω μέρος του περιέκτη με τη μορφή μικρής, άσπρης, κηλίδας. Οι περιέκτες αφήνονται σκεπασμένοι με αλουμινόχαρτο (αλλά με ανοιχτό καπάκι), σε θερμοκρασία δωματίου για 15-30 min.
- (12) Μόλις διαπιστωθεί ότι ο περιέκτης είναι τελείως στεγνός, γίνεται προσθήκη 40 µl υπερκάθαρου H₂O.
- (13) Το DNA διαλύεται, με επώαση των δειγμάτων στους 37 °C για 30 min.
- (14) Αν το DNA χρησιμοποιηθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα, αποθηκεύεται στους 4°C. Αν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε διάστημα 1-6 μήνες συντηρείται στους -21°C και για πολύ μεγαλύτερο φυλάσσεται στους -70 °C.

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

(A) Προετοιμασία των διαλυμάτων

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

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

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

(B) Διαδικασία της χρώσης

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.4 Μέθοδος εκτίμησης ενζυματικής δράσης ολικής εστεράσης

A. Διαλύματα

Διαλύματα με δυνατότητα αποθήκευσης

(1) Ρυθμιστικό διάλυμα (0,02 M, pH 7,0, Triton)

Σε 1000 ml νερού αναμιγνύονται τα ακόλουθα αντιδραστήρια: (1) 3.58 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, (2) 1.36 g KH_2PO_4 και (3) 1.05 ml Triton X-100.

(2) Διάλυμα 1-naphthyl acetate (30mM)

Σε 100ml ακετόνη διαλύονται 558,6 mg 1-naphthyl acetate.

(3) Διάλυμα Dodecylsulfate sodium salt (5%)

Σε 1000 ml νερό διαλύονται 50 g $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$.

Διαλύματα που παρασκευάζονται αμέσως πριν τη βιοδοκιμή

(4) Διάλυμα 1-naphthyl acetate (0.3 Mm)

Σε 20 ml ρυθμιστικού διαλύματος 1, γίνεται προσθήκη 0,2 ml διαλύματος 2.

(5) Διάλυμα DBLS

Σε 7,5 ml νερό διαλύονται 75 mg Fast Blue B Salt. Αφού ο δείκτης διαλυθεί καλά, προσθέτουμε 17,5 ml του διαλύματος 3. Το διάλυμα μπορεί να αποθηκευτεί μέχρι 1 ώρα στο σκοτάδι.

B. Διαδικασία

(1) Σε μια πλάκα με επίπεδο πάτο (πλάκα A) τοποθετούνται με τη πολυπιπέτα πολλαπλών επαναλήψεων, 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος 1 ανά βοθρίο εκτός από τη στήλη 1.

(2) Στη συνέχεια τοποθετείται ένα ενήλικο άπτερο άτομο αφίδας ανά βοθρίο εκτός από τη στήλη 1. Συνολικά δηλαδή τοποθετήθηκαν 88 αφίδες ανά πλάκα.

(3) Γίνεται λειοτριβήση των αφίδων με τη βοήθεια του πολυμογενοποιητή, με περιστροφικές κινήσεις μέχρις ότου τα δείγματα ομογενοποιηθούν σωστά.

(4) Ακολουθεί προσθήκη 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος 1 ανά βοθρίο εκτός από τη στήλη 1.

(5) Τα δείγματα αφήνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά, με σκοπό να διαλυτοποιηθούν.

(6) Κατά τη διάρκεια των 15 λεπτών, σε μια καινούρια πλάκα (πλάκα B), γίνεται προσθήκη 25 μl ρυθμιστικού διαλύματος 1 ανά βοθρίο εκτός από τη στήλη 1, όπου γίνεται προσθήκη 50 μl ρυθμιστικού διαλύματος 1. Η στήλη 1 χρησιμοποιείται σαν μάρτυρας.

(7) Μετά από 15 λεπτά μεταφέρονται με τη πολυπιπέτα απλής μεταφοράς 25 μl από κάθε στήλη της πλάκας A στην αντίστοιχη στήλη της πλάκας B (εκτός από τη στήλη 1). Ανάμεσα σε κάθε μεταφορά από στήλη σε στήλη, ξεπλένονται καλά οι μύτες (tips) της πολυπιπέτας, αναρροφώντας και απελευθερώνοντας άφθονο νερό κατ' επανάληψη πολλές φορές. Αν παρατηρηθούν περίσσιες σταγόνες στις μύτες της πολυπιπέτας οι οποίες είναι πολύ δύσκολο να μετακινηθούν, γίνεται χρήση καινούριων μυτών.

Έχει αποδειχθεί ότι με τη σωστή πλύση της πολυπιπέτας η επιμόλυνση των βοθρίων κατά τη μεταφορά από στήλη σε στήλη είναι αμελητέα.

Τα στάδια που ακολουθούν στο εξής αναφέρονται στη πλάκα B.

(8) Οι μύτες της πολυπιπέτας πολλαπλών επαναλήψεων ξεπλένονται καλά με απεσταγμένο νερό. Γίνεται προσθήκη 150 μl διαλύματος 1- naphthyl acetate και στα 96 βοθρία της πλάκας.

(9) Ακολουθεί επώαση στους 25 °C για 5 λεπτά.

(10) Ξεπλένονται καλά οι μύτες της πολυπιπέτας πολλαπλών επαναλήψεων με απεσταγμένο νερό. Μετά από 5 λεπτά ακολουθεί προσθήκη 25 μl διαλύματος DBLS σε όλα τα βοθρία της πλάκας.

(11) Γίνεται επώαση στο σκοτάδι για 20 λεπτά στους 25 °C.

(12) Μετά το πέρας των 20 λεπτών η πλάκα τοποθετείται σε φασματοφωτόμετρο και γίνεται μέτρηση της απορρόφησης στα 620 nm.

Η εκτίμηση του επιπέδου ανθεκτικότητας των αφίδων γίνεται βάση δυο διαφορετικών κλιμάκων που έχουν αναπτυχθεί από τους Devonshire et.al (1992) και Foster et.al (2002).

Οι κλίμακες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Επίπεδο ανθεκτικότητας	Devonshire et al.	Foster et al.
Ευπαθείς (S)	0,0 - 0,4	< 0,14
Λίγο ανθεκτικές (R1)	0,4 - 0,8	0,14 - 0,6
Μέτρια ανθεκτικές (R2)	0,8 - 1,5	0,6 - 2,0
Πολύ ανθεκτικές (R3)	> 1,5	> 2,0

2. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

2.1 Παρασκευή πηκτής Αγαρόζης (50 ml)

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

2.2 Παρασκευή πηκτής πολυακρυλαμίδης 8%

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

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

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

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

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

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

2.3 Διάλυμα TBE 20X

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

Σε φιάλη του ενός λίτρου γίνεται προσθήκη:

121 gr Tris – Base (Merck/1.08382.0500)

61,7 gr Boric Acid (Βορικό οξύ)

80 ml EDTA 0,5 M pH 8

Προσθέτουμε ύδωρ μέχρι να συμπληρωθεί το 1 λίτρο

Διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου

2.4 Διάλυμα TAE 50X

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

Σε φιάλη του ενός λίτρου γίνεται προσθήκη:

242 gr Tris - Base(Merck/1.08382.0500)

57 gr Acetic Acid (Sigma/E - 7889)

100 ml EDTA

2.5 Διάλυμα EDTA 0.5 M (pH: 8)

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