

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ**

**Χρήση μοριακών δεικτών για τη διάκριση πληθυσμών
των ειδών εντόμων *Macrolophus pygmaeus* και
Macrolophus melanotoma (Hemiptera: Miridae).**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

ΑΘΗΝΑ 2010

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΕΝΤΟΜΟΛΟΓΙΑΣ**

Χρήση μοριακών δεικτών για τη διάκριση πληθυσμών των ειδών εντόμων *Macrolophus pygmaeus* και *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae).

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ
ΕΥΑΓΓΕΛΟΥ ΒΑΣΙΛΙΚΗ**

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Επιβλέπων: Γεώργιος Παπαδούλης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Μέλος: Νικόλαος Εμμανουήλ, Καθηγητής

Μέλος: Επαμεινώνδας Παπλωματάς, Αναπληρωτής Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2010

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	3
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	7
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
1.1 ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	9
1.2 ΓΕΝΟΣ <i>Macrolophus</i>	12
1.2-1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	12
1.2-2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ - ΒΙΟ-ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ	13
1.2-3 ΧΡΗΣΗ - ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	14
1.3 ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΝΩΣΗΣ ΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ	17
1.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	18
1.4 - 1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	18
1.4 - 2 ΞΕΝΙΣΤΕΣ	19
ΜΕΓΑΛΗ ΑΚΟΝΥΖΙΑ <i>Dittrichia viscosa</i> (Asteraceae)	20
ΣΤΥΦΝΟΣ - ΑΓΡΙΟΝΤΟΜΑΤΙΑ <i>Solanum nigrum</i> L. (Solanaceae)	21
1.4 - 3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	22
ΜΕΘΟΔΟΣ PCR	22
ΜΕΘΟΔΟΣ PCR-RFLPs	23
ΜΕΘΟΔΟΣ PCR-AFLPs	25
ΜΕΘΟΔΟΣ RAPD-PCR	25
ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ	25
ΜΕΘΟΔΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ	26
1.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	27
1.5 - 1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA - mtDNA	29
1.5 - 2 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ 12sr	29
1.5 - 3 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ COI - BARCODE	30
1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	32
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	33
2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ	34
2.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	37
2.3 ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ	38
2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ mtDNA	40
2.4-1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA	40
2.4-2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ	42
2.4-3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΓΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ	48
2.4-4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR	49

2.4-5	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ	51
2.4-6	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	52
2.4-7	ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ	53
	ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΗΤΡΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΗΣ	53
	ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΦΕΙΔΩΛΟΤΗΤΑΣ	54
	ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΦΑΝΕΙΑΣ	54
	ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ	54
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	56
3.1	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ – ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ	57
3.2	ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ	60
3.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA	61
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ	79
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Επιβλέποντα Καθηγητή μου Γεώργιο Παπαδούλη για την εμπιστοσύνη του και τις πολύτιμες συμβουλές του, τη διόρθωση και τη βαθμολόγηση της παρούσας μελέτης. Οι γνώσεις που μου μεταλαμπάδευσε καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο ήταν πολύτιμες για την ολοκλήρωση της μελέτης, καθώς και για εμένα προσωπικά.

Ακόμα, να εκφράσω ιδιαίτερες ευχαριστίες στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, Καθηγητή Νικόλαο Εμμανουήλ και Αναπληρωτή Καθηγητή Επαμεινώνδα Παπλωματά, για την ανάγνωση, διόρθωση και βαθμολόγηση της μελέτης.

Επιπλέον, ευχαριστώ τη Δρ. Μαρία Μπουγά, βιολόγο και μέλος του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας, καθώς η άριστη συνεργασία, οι χρήσιμες υποδείξεις και η βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειράματος ήταν απαραίτητες για να ολοκληρωθεί η συγκεκριμένη μελέτη.

Θα ήταν παράληψή μου να μην αναφερθώ στους Δρ Νικόλαο Γαραντωνάκη, Παύλο Κίτση, Μεταπτυχιακό φοιτητή του Γεωπονικού Πανεπιστημίου, και Δρ Διονύσιο Περδίκη για τις πληροφορίες που παρείχαν σχετικά με τη βιολογία και την εκτροφή του προς εξέταση εντόμου, αλλά και για την προσκόμιση δειγμάτων στο Εργαστήριο. Επιπλέον, τον κ. Αντώνιο Θωμαδάκη για τη συλλογή και αποστολή δειγμάτων από την περιοχή της Ιεράπετρας Κρήτης.

Ακόμα, ευχαριστώ το προσωπικό και τους φοιτητές του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας για την καλή συνεργασία και το φιλικό περιβάλλον, τα οποία συνέβαλαν στην ομαλή πορεία της μελέτης. Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στην οικογένειά μου για την ηθική υποστήριξη που μου προσέφερε κατά τη φοιτητική μου θητεία και την έμπρακτη βοήθειά της, όποτε αυτή ήταν αναγκαία.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στις σύγχρονες καλλιέργειες υιοθετείται η λογική της Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης εχθρών καλλιεργειών, η οποία βασίζεται και στη χρήση ωφέλιμων οργανισμών. Η σωστή αναγνώριση και ταυτοποίηση των οργανισμών που θα χρησιμοποιηθούν, αλλά και των ίδιων των εχθρών, είναι μείζουσας σημασίας ώστε ο παραγωγός να λάβει ένα ικανοποιητικό εισόδημα και ταυτόχρονα να μη δαταραχθεί η ισορροπία του μικροπεριβάλλοντος της καλλιέργειας. Το γένος *Macrolophus* (Hemiptera: Miridae) περιλαμβάνει αρπακτικά έντομα που τρέφονται με αλευρώδεις, θρίπες, ακάρεα, φυλλορόχτες κα. σε θερμοκηπιακές ή υπαίθριες καλλιέργειες κηπευτικών. Για τη διάκριση των ειδών *M. pygmaeus* (Rambur) και *M. melanotoma* Costa (= *M. caliginosus* Wagner) χρησιμοποιείται το μορφολογικό χαρακτηριστικό του χρώματος του πρώτου άρθρου της κεραίας (μαύρο ή μαύρο με ανοιχτόχρωμη περιοχή), αλλά και το φυτό ξενιστής τους (Solanaceae ή *Dittrichia* sp.). Οι δύο αυτοί τρόποι, όμως, δεν είναι απόλυτα αξιόπιστοι κι έτσι είναι απαραίτητο να υπάρχουν και άλλοι μέθοδοι αναγνώρισης.

Στην παρούσα μελέτη, αξιολογήθηκαν τα μορφολογικά χαρακτηριστικά, αλλά και τα δύο φυτά ξενιστές ως προς την ικανότητά τους για διάκριση των δύο ειδών. Παράλληλα πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ των *M. pygmaeus* και *M. melanotoma* και εξετάστηκε η πιθανότητα να δώσουν γόνιμους απογόνους. Ακόμη, εφαρμόστηκε η τεχνική του προσδιορισμού νουκλεοτιδικής αλληλουχίας (sequencing) γονιδιακών τμημάτων του μιτοχονδριακού DNA, με δύο διαφορετικούς μοριακούς δείκτες έχοντας ως στόχο τη διάκριση των ειδών.

Κατά την πειραματική διαδικασία του προσδιορισμού της νουκλεοτιδικής αλυσίδας πραγματοποιήθηκε απομόνωση ολικού DNA και αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) με 2 ζεύγη εκκινητών που προσδιορίζουν το γονιδιακό τμήμα που ελέγχει τη σύνθεση α) της υπομονάδας I του συμπλόκου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) και β) της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (12srDNA). Στη συνέχεια, για λόγους ελέγχου της διαδικασίας πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση πήγματος αгарόζης 2% και τέλος καθαρισμός των προϊόντων PCR, καθώς και προσδιορισμός της νουκλεοτιδικής αλληλουχίας των ανωτέρω γονιδιακών τμημάτων μέσω της εταιρείας *Macrogen*. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τα υπολογιστικά πακέτα *CLUSTAL W2*, *Mega v. 4.0.0* και *DnaSP 5.10* για να προσδιοριστεί ο αριθμός των απλοτύπων (24 για το COI και 23 για το 12sr), να υπολογισθούν οι pairwise γενετικές αποστάσεις και να κατασκευαστούν φυλογενετικά δένδρα με τις μεθόδους της ελάχιστης εξέλιξης, της μέγιστης φειδωλότητας και της Neighbour-Joining.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι για τη διάκριση των *M. pygmaeus* και *M. melanotoma* δεν ισχύει το μορφολογικό χαρακτηριστικό της κεραίας, αλλά το φυτό ξενιστής. Επιπλέον, απεδείχθη ότι πρόκειται για δύο διαφορετικά είδη τα οποία και οι δύο μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν κατάφεραν να τα διαχωρίσουν, καθώς και να δώσουν πληροφορίες για την ύπαρξη ενδοειδικής ποικιλότητας.

ABSTRACT

In the framework of modern I.P.M., predators are used more and more and the precise identification of the beneficial organism is of high importance. In *Macrolophus* sp. (Hemiptera: Miridae), two species *Macrolophus pygmaeus* (Rambur) and *Macrolophus melanotoma* Costa (= *M. caliginosus* Wagner) are important biocontrol agents against whiteflies, aphids, mites, leafminers etc. Their discrimination, however, is difficult and based only on the color of first antenna segment and the host plant. Recently, investigations using molecular markers in order to separate these species have been done.

In this study, it is estimated the possibility of morphological characteristics and host plant to discriminate the two species. Additionally, some crossing experiments between *M. pygmaeus* and *M. melanotoma* take place, while two different mitochondrial DNA gene segments are investigated using sequencing analysis in order to detect molecular markers discriminating the above mentioned species. The first step for sequencing was the DNA extraction followed by the Polymerase Chain Reaction (PCR) where two pair of primers were used. The first one is for the the expression of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene segment (COI) and the second one for the small ribosomal subunit (12srDNA). The next step was the agarose gel electrophoresis of DNA, followed by purifying the PCR products. Moreover, individual sequences were determined via automated sequencing of both strands of each mtDNA gene segment provided by *Macrogen Company*.

The statistical analysis was performed using the packages *CLUSTAL W2*, *Mega v. 4.0.0* και *DnaSP 5.10*. 24 and 23 haplotypes were detected for 12sr and COI gene segments respectively. The pairwise genetic distance showed that the most distant population was *M. pygmaeus* from Spain and *M. melanotoma* from Kyparissia-Greece. Additionally, maximum parsimony, minimum evolution and neighbour-joining dedrograms showed that the two species are grouped in two different clades. Moreover, the morphological characteristics checked are not sufficient for the discrimination of *M. pygmaeus* and *M. melanotoma*, while the criteria of host plant is; The molecular markers used can discriminate *M. pygmaeus* and *M. melanotoma*.

1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες είναι πλέον ιδιαίτερα εμφανής παγκοσμίως η ανάγκη να αλλάξει στη γεωργική παραγωγή η άποψη σύμφωνα με την οποία χρησιμοποιούνται μόνο χημικά μέσα για την καταπολέμηση εχθρών κι ασθενειών στις καλλιέργειες. Έτσι, έχοντας ως στόχο να περιορισθούν και εξαιρεθούν οι κίνδυνοι από χημικές ουσίες, εφαρμόζεται τα τελευταία χρόνια στον τομέα της γεωργικής παραγωγής η ολοκληρωμένη αντιμετώπιση - διαχείριση των εχθρών (Integrated Pest Management - IPM).

Επιπλέον, έχει καθιερωθεί σε πολλές περιπτώσεις και η βιολογική αντιμετώπιση των εχθρών και η αποτροπή, ο περιορισμός ή η επιβράδυνση της εγκατάστασής τους στα φυτά. Περιγράφεται ως ένα σύστημα οικολογικά προσανατολισμένης διαχείρισης ή χειρισμού των πληθυσμών των βλαβερών για τα φυτά οργανισμών (εντόμων, ακάρεων, μυκήτων, ιών, ζιζανίων κτλ), η οποία χρησιμοποιεί τεχνικές και μεθόδους που περιορίζονται σε μη χημικά μέσα με ένα συνδυασμένο τρόπο, τέτοιο ώστε η πυκνότητα του πληθυσμού τους να συγκρατείται σε επίπεδα κατώτερα από εκείνα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν οικονομική ζημία στην καλλιέργεια.

Η βιολογική αντιμετώπιση εντάσσεται στην ευρύτερη κατηγορία της ολοκληρωμένης διαχείρισης των εχθρών που εντοπίζονται σε γεωργικές καλλιέργειες. Τα προϊόντα που παράγονται είναι υψηλής ποιότητας και έχουν περισσότερες πιθανότητες να πωληθούν στην αγορά σε ανταγωνιστικές τιμές. Βασικές προϋποθέσεις για την επίτευξη του στόχου της βιολογικής αντιμετώπισης είναι:

- Γνώση του βιολογικού κύκλου και ιδιαιτεροτήτων του φυτού
- Γνώση της βιο-οικολογίας των επιζήμιων και ωφέλιμων οργανισμών
- Καθορισμός και γνώση της “επιζήμιας πληθυσμιακής πυκνότητας” και του “οικονομικού ορίου”
- Ύπαρξη εναλλακτικών μεθόδων προς τη χημική μέθοδο καταπολέμησης
- Συνδυασμός διαφόρων επί μέρους στοιχείων και παραγόντων που συμμετέχουν στη βιολογική καταπολέμηση σε ένα οργανωμένο σύστημα που να είναι πρακτικά εφαρμόσιμο

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στα πλαίσια της βιολογικής αντιμετώπισης περιλαμβάνουν τη χρήση ουσιών που προέρχονται από τη φύση καθώς και τη χρησιμοποίηση οργανισμών που λειτουργούν ως ανταγωνιστές και θηρευτές. Επιπλέον, εφαρμόζονται συμπληρωματικά βιοτεχνολογικές μέθοδοι, επιλογή ανθεκτικών ποικιλιών, καλλιεργητικά μέτρα κλπ. Τα καλλιεργητικά μέτρα που πρέπει να εφαρμόζει ο παραγωγός έχουν ως στόχο κυρίως την πρόληψη της προσβολής από κάποιον εχθρό και περιλαμβάνουν:

- Καταστροφή των υπολειμμάτων προηγούμενων καλλιεργειών

- Φύτευση της καλλιέργειας όνιμα ή πρώιμα
- Φύτευση ανθεκτικών ποικιλιών
- Χρήση υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, από πιστοποιημένα φυτώρια
- Έλεγχος ζιζανίων που λειτουργούν ως δεξαμενές διατήρησης των εντόμων, εντός και εκτός θερμοκηπίου
- Χρήση παγίδων, με χρώμα ή φερομόνες, για την παρακολούθηση και σύλληψη των ακμαίων ατόμων
- Άμεση απομάκρυνση των προσβεβλημένων φυτών και καταστροφή τους μακριά από την καλλιέργεια
- Εφαρμογή συστήματος αμειψισποράς

Η χρήση ωφέλιμων εντόμων και άλλων αρθροπόδων για τη διαχείριση των εχθρών που προσβάλλουν τις καλλιέργειες είναι μια νέα προσέγγιση που εφαρμόζεται ευρέως σε διεθνές επίπεδο αλλά και στη χώρα μας λόγω των πολλών πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει για τον παραγωγό, το περιβάλλον και τον καταναλωτή. Υπάρχουν τρεις βασικές κατηγορίες στις οποίες εντάσσονται οι ωφέλιμοι οργανισμοί:

- Αρπακτικά αρθρόποδα: είναι λίγο μεγαλύτερα σε μέγεθος από το θήραμα το οποίο συλλαμβάνουν με ιδιαίτερη δεξιοτεχνία. Για να ολοκληρώσουν τον βιολογικό τους κύκλο απαιτείται να τραφούν με περισσότερα του ενός άτομα θηράματος. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται ακάρεα και έντομα.
- Παρασιτοειδή έντομα: έχουν συνήθως το ίδιο μέγεθος με τον ξενιστή και απαιτείται ένα άτομο του θηράματος για την ολοκλήρωση του βιολογικού του κύκλου (Λυκουρέσης, 1995). Τα παρασιτοειδή ανήκουν σε έξι τάξεις εντόμων (Υμενόπτερα, Δίπτερα, Κολεόπτερα, Λεπιδόπτερα, Τριχόπτερα και Νευρόπτερα), με τα Υμενόπτερα να αποτελούν το 78% του συνόλου.
- Παθογόνοι μικροοργανισμοί: μύκητες, βακτήρια, ιοί, και πρωτόζωα, που αναπτύσσονται στο εσωτερικό συνήθως του προς καταπολέμηση οργανισμού.

Η χρησιμοποίηση φυσικών εχθρών δεν είναι νέα μέθοδος. Πρώτο παράδειγμα βιολογικής καταπολέμησης ήταν η χρήση του μυρμηγκιού του Φαραώ, *Monomorium pharaonis* (Hymenoptera: Formicidae), από τους Κινέζους για καταπολέμηση εντόμων των αποθηκών. Το πρώτο σύγχρονο επιτυχές παράδειγμα βιολογικής καταπολέμησης ήταν του κοκκοειδούς *Icerya purchasi* (Hemiptera: Margarodidae). Το έντομο αυτό εισήχθη το 1876 στην Καλιφόρνια και απειλούσε καλλιέργειες εσπεριδοειδών. Ο εντομολόγος C.V.Riley προσδιόρισε ότι το έντομο προερχόταν από την Αυστραλία. Έτσι ο Albert Koebele το 1888 πήγε στην Αυστραλία για να ερευνήσει για τυχόν φυσικούς εχθρούς του *Icerya purchasi*. Εντοπίστηκαν δυο φυσικοί εχθροί, το *Cryptochaetum iceryae* ένα δίπτερο παρασιτοειδές (Diptera: Cryptochaetidae) και το *Rodolia cardinalis* ένα αρπακτικό κολεόπτερο (Coleoptera: Coccinellidae), οι οποίοι αφού μεταφέρθηκαν

στην Καλιφόρνια εξαπολύθηκαν στις καλλιέργειες εσπεριδοειδών με καλά αποτελέσματα (Doutt, 1958).

Η βιολογική καταπολέμηση των εχθρών εφαρμόζεται κυρίως με απελευθέρωση ωφέλιμων οργανισμών που παρασιτούν τα έντομα εχθρούς ή εφαρμόζοντας ειδικά βιολογικά σκευάσματα που δεν βλάπτουν τα θηλαστικά ούτε τα ωφέλιμα έντομα. Για να φτάσουμε στο σημείο να εξαπολύουμε τους οργανισμούς αυτούς πρέπει να ολοκληρωθούν διάφορα στάδια. Αρχικά προσδιορίζεται ο οργανισμός που επιθυμούμε να καταπολεμήσουμε και διερευνάται η ύπαρξη φυσικών του εχθρών οι οποίοι μπορούν να δώσουν λύση στο πρόβλημα. Αυτοί εκτρέφονται σε μικρούς πληθυσμούς, γίνονται εξαπολύσεις σε πειραματική φάση και αξιολογούνται τα αποτελέσματα. Αν αυτά είναι ικανοποιητικά, ακολουθεί μαζική εκτροφή και εξαπόλυση, εγκατάσταση του φυσικού εχθρού και περαιτέρω αξιολόγηση. Ακόμα μπορεί να γίνουν κάποιες εξαπολύσεις που θα ενισχύσουν τον ήδη υπάρχοντα πληθυσμό και θα δώσουν καλύτερα αποτελέσματα.

Οι παραπάνω διαδικασίες, πιθανώς με κάποιες αλλαγές, έχουν ακολουθηθεί κατά καιρούς από διάφορους ερευνητές ανά τον κόσμο και πολλές εταιρίες δραστηριοποιούνται στη διαδικασία αυτή. Έτσι, υπάρχει σημαντικός αριθμός σκευασμάτων που κυκλοφορούν στο εμπόριο και περιέχουν κάποιο παρασιτοειδές ή αρπακτικό ή μικροοργανισμό, σε συγκεκριμένο στάδιο. Μπορεί ο παραγωγός να αγοράσει το σκεύασμα αυτό, να το εφαρμόσει σύμφωνα με συγκεκριμένες οδηγίες στην καλλιέργεια που διατηρεί και να περιορίσει τους πληθυσμούς των εχθρών σε πολύ χαμηλά επίπεδα.

Στην παρούσα έρευνα μελετώνται είδη του γένους *Macrolophus* που αποτελούν αρπακτικά έντομα και εφαρμόζονται στα πλαίσια της ολοκληρωμένης διαχείρισης των καλλιεργειών κηπευτικών.

1.2 Γένος *Macrolophus*

1.2-1 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το γένος *Macrolophus* αφορά έντομα που ανήκουν στα Ημίπτερα, της οικογένειας Miridae. Η συστηματική ταξινόμηση φαίνεται στην εικόνα 1-1.

Υπερβασιλείο: Eukaryota

Βασίλειο: Animalia

Φύλο: Arthropoda

Υποφύλο: Uniramia

Κλάση: Insecta

Υποκλάση: Pterygota

Σειρά: Neoptera

Υπερτάξη: Hemipteroidea

Τάξη: Hemiptera

Υποτάξη: Heteroptera

Οικογένεια: Miridae

Υποοικογένεια: Bryocorinae

Γένος: *Macrolophus*

Είδος: *pygmaeus*, *melanotoma* (= *caliginosus*)

Εικόνα 1-1: Συστηματική κατάταξη των ειδών του γένους *Macrolophus*

Το γένος *Macrolophus* αριθμεί περίπου 30 είδη με κάποια από αυτά να χρησιμοποιούνται ήδη σε προγράμματα ολοκληρωμένης αντιμετώπισης και να δίνουν ικανοποιητικά αποτελέσματα. Τα επιστημονικά ονόματα των σημαντικότερων ειδών είναι:

- *Macrolophus pygmaeus* (Rambur, 1839)
- *Macrolophus melanotoma* (Costa 1853) (= *M. caliginosus* Wagner, 1951)
- *Macrolophus costalis* Fieber, 1858

1.2-2 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ - ΒΙΟ-ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ

Τα είδη του υπό μελέτη γένους κατάγονται από την περιοχή της Μεσογείου, όπου και υπάρχουν σε μεγάλους αριθμούς. Επιπλέον, εντοπίζονται στον υπόλοιπο κόσμο και κυρίως σε χώρες της Ευρώπης. Είναι έντομα μικρά σε μέγεθος, με μήκος σώματος περίπου 3-4mm και με ανοιχτό πράσινο χρωματισμό. Λόγω του χρώματος πολλές φορές δεν είναι ευδιάκριτα όταν βρίσκονται πάνω σε φύλλα ή τον βλαστό των φυτών. Οι οφθαλμοί του έχουν χαρακτηριστικό κόκκινο χρώμα και οι κεραίες τους κιτρινοπράσινο, το οποίο γίνεται πιο σκούρο όσο πλησιάζουν προς τη βάση τους. Οι πτέρυγες είναι διαφανείς με γκριζωπές κηλίδες κατά περιοχές.

Ακόμα, διαθέτουν μακριά, πράσινα πόδια τα οποία τους δίνουν πλεονέκτημα στην κίνηση. Ως αρπακτικά πρέπει να είναι τόσο ταχύτατα όσο και ευέλικτα για τον εντοπισμό και τη λήψη της λείας. Τα δύο φύλα διακρίνονται εύκολα μεταξύ τους καθώς το θηλυκό είναι λίγο μεγαλύτερο σε μέγεθος και διαθέτει μεγαλύτερη κοιλία με ευδιάκριτο ωοθήτη. Τα πέντε νυμφικά στάδια ξεχωρίζουν μεταξύ τους κυρίως από την απουσία ή παρουσία και το μέγεθος των καταβολών των πτερυγών, το μέγεθος του σώματος και το μήκος των άρθρων της κεραίας (Εικόνα 1-2). Τα ωά είναι υπόλευκα, επιμήκη και στρογγυλά στο ένα άκρο, ενώ το άλλο είναι επίπεδο (Εικόνα 1-3) κι έχουν μήκος περίπου 800μm (Perdikis and Lykouressis, 2001-2002).



Εικόνα 1-2 : Νύμφη του γένους *Macrolophus*



Εικόνα 1-3: Ωό του γένους *Macrolophus*
(Πηγή: University of Tennessee)

Τα θηλυκά άτομα μπορούν να δώσουν ωά ακόμα και δύο ημέρες μετά τη σύζευξη. Συνήθως εναποθέτουν τα ωά τους σε νεαρούς βλαστούς μικρής διαμέτρου (εντός των ιστών και στο κορυφαίο τμήμα τους), αλλά και στους μίσχους των φύλλων και λιγότερο των ανθέων. Προτιμούν σημεία που δεν είναι εκτεθειμένα ώστε τα ωά να είναι προστατευμένα και να μειώνονται οι πιθανότητες καταστροφής τους από άλλους οργανισμούς ή από μηχανικά αίτια. Λόγω της θέσης εναπόθεσής τους (εντός των ιστών)

τα ωά είναι δυσδιάκριτα κι επομένως δύσκολο να διακριθούν χωρίς τη χρήση στερεοσκοπίου.

Το χρονικό διάστημα από το στάδιο του ωού μέχρι το στάδιο του ακμαίου διαρκεί περίπου 7 ημέρες και η διάρκεια ζωής των ενθλίκων ατόμων είναι 25-35 ημέρες. Αυτά τα χρονικά διαστήματα ποικίλουν κι εξαρτώνται από τις διάφορες συνθήκες που επικρατούν στο περιβάλλον (θερμοκρασία, υγρασία, φωτοπερίοδος), το φυτό ξενιστή, αλλά και το είδος της τροφής που είναι διαθέσιμο (Castane, 2004). Συμπληρώνουν περισσότερες από μία γενεές το έτος, γεγονός που αποτελεί πλεονέκτημα για την ολοκληρωμένη και βιολογική αντιμετώπιση. Έτσι, οι παραγωγοί μειώνουν το κόστος της παραγωγής καθώς δεν είναι απαραίτητες οι συχνές και επαναλαμβανόμενες εξαπολύσεις των εντόμων στις καλλιέργειες που αντιμετωπίζουν προβλήματα.

1.2-3 ΧΡΗΣΗ - ΣΗΜΑΣΙΑ ΣΤΗΝ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Το γένος *Macrolophus* εκπροσωπείται από είδη που τις τελευταίες δεκαετίες αξιοποιούνται ιδιαίτερα από τους παραγωγούς ως προς την αντιμετώπιση εχθρών στις καλλιέργειές τους. Τα έντομα αυτά είναι πολυφάγα με ιδιαίτερα αρπακτικές ικανότητες (Malaua *et al*, 1987). Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η μορφολογία του είναι ιδανική και το καθιστά ευκίνητο κι ευέλικτο ακόμα και σε δύσκολα περιβάλλοντα, όπως για παράδειγμα ένα φύλλο με έντονη χνόωση. Επιπλέον, είναι ικανό να τρέφεται με ποικιλία εχθρών που μπορεί να εντοπίσει στη διάρκεια της ζωής του, ενώ τα φυτά-ξενιστές ανά είδος μπορεί να είναι περισσότεροι του ενός. Συγκεκριμένα, το είδος *M. pygmaeus* εντοπίζεται σε πολλά φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Solanaceae.

Γενικότερα, τα σημαντικότερα φυτά ξενιστές ανάλογα με το είδος του εντόμου μπορεί να είναι η τομάτα (*Solanum lycopersicum* - Solanaceae), η μελιτζάνα (*Solanum melongena* - Solanaceae), ο καπνός (*Nicotiana tabacum* - Solanaceae), καθώς και πολλά ζιζάνια π.χ. η ακονυζιά (*Dittrichia viscosa* - Asteraceae), ο στύφνος (*Solanum nigrum* - Solanaceae) κλπ. Η σημασία των ζιζανίων στη βιολογική αντιμετώπιση είναι μεγάλη αφού λειτουργούν ως πηγές των αρπακτικών. Ιδιαίτερα εκείνα τα ζιζάνια που εντοπίζονται στην περιφέρεια των υπαίθριων καλλιεργειών ή δίπλα και κοντά σε θερμοκήπια συμβάλουν σε μεγαλύτερο βαθμό στον περιορισμό της ζημιάς που μπορεί να προκληθεί από εχθρούς στις καλλιέργειες, μέσω των αρπακτικών που φιλοξενούν (δεξαμενές αρπακτικών).

Αρχικά τα αρπακτικά αυτά χρησιμοποιήθηκαν σε καλλιέργειες τομάτας και μελιτζάνας με στόχο τη μείωση των πληθυσμών των αλευρωδών (*Trialeurodes vaporariorum*, *Bemisia tabaci* – Hemiptera: Aleyrodidae) που είχαν αναπτυχθεί εκεί και προμήνυαν μία μειωμένη παραγωγή. Το *Macrolophus pygmaeus* ως βιολογικός

παράγοντας λειτούργησε σωστά, δίνοντας λύση στο πρόβλημα. Οι διατροφικές του συνήθειες δεν περιορίζονται σε ένα μόνο είδος ομοπτέρων, ενώ τα διάφορα στάδιά του έχουν διαφορετικές προτιμήσεις σε ποσότητα και είδος τροφής (Fantinou *et al*, 2008). Τρέφονται και μειώνουν σημαντικά τους πληθυσμούς σε αφίδες (*Myzus persicae*, *Macrosiphum euphorbiae* – Hemiptera: Aphididae) (Lykouressis *et al*, 1999-2000), θρίπες (*Thrips tabaci*, *Frankliniella occidentalis* – Thysanoptera: Thripidae) (Montserrat *et al*, 2000; Bonato *et al*, 2006), αλλά και πληθυσμούς ακάρεων και συγκεκριμένα τον κηλιδωτό τετράνυχχο (*Tetranychus urticae* – Prostigmata: Tetranychidae) (Enkegaard, 2001; Maleki *et al*, 2006).

Επιπλέον, μπορεί να διατηρηθεί σε ικανούς πληθυσμούς στην απουσία λείας καθώς μπορεί να τρέφεται με φυλλορύκτες, ιδιαίτερα στην περίπτωση της τομάτας, ή ακόμα και σε ωά λεπιδοπτέρων, όπως έχει ήδη μελετηθεί στο εργαστήριο για το λεπιδόπτερο *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). Ένα άλλο χαρακτηριστικό των αρπακτικών αυτών είναι υπάρχει ποικιλία στη διατροφή τους. Όταν δηλαδή, είναι διαθέσιμα περισσότερα από ένα είδη τροφής, δεν θα κάνουν διακρίσεις και θα τραφούν με όλες, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των αλευρωδών *Trialeurodes vaporariorum* και *Bemisia tabaci* (Dean, 1995). Ιδιαίτερη είναι, όμως, η προτίμησή του στην αφίδα *Myzus persicae* (Fantinou *et al*, 2009)

Από τη στιγμή της εξαπόλυσης του συγκεκριμένου αρπακτικού στην καλλιέργεια μέχρι την πλήρη εγκατάστασή του και την έναρξη της διαδικασίας αντιμετώπισης του εχθρού, απαιτείται ένα σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, το οποίο μπορεί να φθάσει σε κάποιες περιπτώσεις μέχρι και τον ένα μήνα. Για το λόγο αυτό θα πρέπει η εξαπόλυση να γίνει όσο το δυνατό νωρίτερα και πριν οι πληθυσμοί του εχθρού αυξηθούν πολύ. Συνήθως, γίνεται με τη διαπίστωση ύπαρξης πολύ μικρού αριθμού αλευρωδών στην καλλιέργεια.

Μία άλλη λύση σε αυτό το ζήτημα είναι η ταυτόχρονη εξαπόλυση κι ενός άλλου αρπακτικού ή κάποιου παρασιτοειδούς, όπως γίνεται στην πράξη με την περίπτωση του *Encarsia formosa* (Hymenoptera: Aphelinidae). Το παρασιτοειδές αυτό επιβιώνει και αναπτύσσεται ευκολότερα σε χαμηλότερες θερμοκρασίες περιορίζοντας το πρόβλημα μέχρι να εγκατασταθεί κανονικά και να αυξηθεί ο πληθυσμός του αρπακτικού. Έτσι, έρχεται κάποια στιγμή που και τα δύο είδη συνυπάρχουν στην καλλιέργεια χωρίς να ανταγωνίζονται έντονα μεταξύ τους, περιορίζοντας το πρόβλημα στην καλλιέργεια. Ωστόσο, υπάρχει το παράδειγμα του αρπακτικού *Dicyphus tamaninii* (Heteroptera: Miridae), το οποίο ενώ θα μπορούσε να μειώνει έστω και λίγο τους πληθυσμούς των αλευρωδών στα πλαίσια μίας συνεργασίας με το *Macrolophus*, αντίθετα φαίνεται να παρεμποδίζεται η δράση του (Lucas and Alomar, 2001).

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που κατέστησαν το γένος *Macrolophus* ικανό βιολογικό παράγοντα στα πλαίσια της ολοκληρωμένης και βιολογικής αντιμετώπισης είναι το γεγονός ότι απουσία θηράματος μπορεί να επιβιώσει.

Και αυτό γίνεται επειδή μπορεί να τραφεί για χρονικό διάστημα περίπου 10 ημερών μυζώντας χυμούς από το φυτό ξενιστή, χωρίς να του προκαλεί προβλήματα (Perdikis *et al*, 2000). Έτσι, δεν είναι απαραίτητη η συνεχής εξαπόλυση των αρπακτικών στις καλλιέργειες διότι σχεδόν πάντα θα υπάρχει έστω και μικρός αριθμός τους στην καλλιέργεια, από την προηγούμενη εφαρμογή. Ακόμα, για την παράταση του βιολογικού τους κύκλου έως και έξι ημέρες μπορούν να τροφοδοτηθούν με μέλι ή κάποιο ζαχαρούχο διάλυμα. Επιπλέον, είναι γνωστό ότι μπορούν να επιβιώσουν χωρίς τροφή ή νερό για τρεις ημέρες (Mohd *et al*, 2009).



Εικόνα 1-4: Εφαρμογή βιολογικού παράγοντα:
Ακμαίο άτομο *Macrolophus sp.* αναγνωρίζει την τροφή του, νύμφες αλευρώδη
(Πηγή: RIVC- Polland)

1.3 ΣΗΜΑΣΙΑ ΓΝΩΣΗΣ ΕΙΔΟΥΣ ΣΤΗΝ ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ

Η γνώση των ειδών που συμμετέχουν σε ένα προς μελέτη περιβάλλον αποτελεί διαδικασία πρωτεύουσας σημασίας. Ιδιαίτερα στην περίπτωση μιας γεωργικής καλλιέργειας όπου κύριος στόχος είναι η υψηλή της απόδοση, πρέπει να είναι γνωστό ποιοι οργανισμοί υπάρχουν καθώς και το ύψος των πληθυσμών τους, ώστε να πραγματοποιηθούν οι ανάλογες ενέργειες, αν αυτό κριθεί απαραίτητο (DeBach, 1964). Για παράδειγμα, πρέπει να ξέρουμε ποιοι από τους οργανισμούς είναι πιθανό να δημιουργήσουν προβλήματα στην καλλιέργεια και επομένως θα πρέπει να απομακρυνθούν με κάποιον τρόπο. Επιπλέον, η γνώση του είδους αποτελεί αφετηρία για μία σειρά από πληροφορίες απαραίτητες για την κατανόηση των σχέσεων που έχουν υιοθετήσει οι οργανισμοί. Στα πλαίσια της ολοκληρωμένης και της βιολογικής αντιμετώπισης εφαρμόζονται εξαπολύσεις αρπακτικών ή παρασιτοειδών με στόχο τη μείωση των πληθυσμών διαφόρων εχθρών που αποτελούν ανασταλτικό παράγοντα σε μία καλή ποιοτικά και ποσοτικά παραγωγή.

Υπάρχουν περιπτώσεις όπου λόγω λανθασμένης εκτίμησης του είδους του εχθρού χρησιμοποιήθηκαν ακατάλληλα χημικά ή βιολογικά σκευάσματα. Ως αποτέλεσμα, ο εχθρός εξακολούθησε να ζημιώνει την παραγωγή καταστρέφοντας τόσο την καλλιέργεια όσο και το τελικό προϊόν. Αν μάλιστα πρόκειται για μία πολυετή καλλιέργεια, ανατρέπεται ολόκληρος ο σχεδιασμός του παραγωγού για τα επόμενα έτη. Επιπλέον, στην οικονομική ζημία του παραγωγού προστέθηκε το κόστος των μη κατάλληλων σκευασμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

Μία διαφορετική πλευρά, η οποία όμως οδηγεί στα ίδια αρνητικά αποτελέσματα, είναι εκείνη στην οποία ο εχθρός αναγνωρίστηκε ορθά, αλλά ο βιολογικός παράγοντας που χρησιμοποιήθηκε δεν ήταν ο κατάλληλος. Ακόμα, στο ενδιαίτημα κάθε καλλιέργειας υφίστανται οργανισμοί που δεν την επηρεάζουν θετικά ή αρνητικά με την παρουσία τους. Λανθασμένη ταξινόμησή τους ή ακόμα και η άγνοια των χαρακτηριστικών και των ιδιοτήτων τους (βιολογικός κύκλος, τρόπος πολλαπλασιασμού-αναπαραγωγής κλπ) πιθανά να οδηγήσουν σε άστοχες επεμβάσεις. Ενδεχομένως με την απομάκρυνσή τους να διαταραχθεί η ισορροπία και να διασπαστούν οι σχέσεις που τους συνδέουν με το υπόλοιπο μικρο-περιβάλλον, πιθανώς ευνοώντας και την ανάπτυξη μεγαλύτερων πληθυσμών ειδών που είναι δυνητικά εχθροί στην καλλιέργεια.

Διαπιστώνεται, δηλαδή, ότι η άγνοια των ειδών των οργανισμών που συναποτελούν ένα οικοσύστημα, και στη συγκεκριμένη περίπτωση μίας καλλιέργειας, μπορεί να οδηγήσει σε οικονομική ζημία τον παραγωγό. Ταυτόχρονα, οδηγούν τη διατάραξη των ισορροπιών μεταξύ των ειδών που υφίστανται στο οικοσύστημα αυτό δημιουργώντας προβλήματα στο ευρύτερο περιβάλλον.

1.4 ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Η ονομασία που τελικά δίδεται σε ένα είδος οργανισμού και η συστηματική κατάταξή του είναι αποτέλεσμα παρατήρησής του και διαπίστωσης ομοιοτήτων ή διαφορών με άλλους οργανισμούς. Οι συστηματικοί ταξινομητές ανά τον κόσμο μελετούν κυρίως τα μορφολογικά χαρακτηριστικά του οργανισμού που μπορεί να αφορούν για τα έντομα στο σχήμα, το μέγεθος ή το χρώμα σε οποιοδήποτε όργανο του σώματος, όπως τις κεραίες, τα πόδια, τον αιδοιαγό κλπ. Πολλές φορές η αναγνώριση αποτελεί μία αρκετά χρονοβόρα διαδικασία που απαιτεί λεπτομέρεια και υπομονή.

Ένα άλλο στοιχείο που συμπληρώνει και ενισχύει πολλές φορές την ταξινόμηση του είδους είναι το περιβάλλον στο οποίο εντοπίζεται. Στην περίπτωση της γεωργίας και των εκτεταμένων καλλιεργειών είναι τα φυτά-ξενιστές που απαρτίζουν την καλλιέργεια. Η πληροφορία που δίνει το φυτό ξενιστής μπορεί να μειώσει το εύρος των ειδών στα οποία μπορεί να ανήκει το υπό μελέτη είδος. Για παράδειγμα στην ελιά είναι γνωστά τα έντομα που την προσβάλλουν. Έτσι γνωρίζοντας την καλλιέργεια αμέσως προσανατολίζονται οι συστηματικοί σε συγκεκριμένα είδη καθιστώντας πιο εύκολη τη διαδικασία της αναγνώρισης. Υπάρχουν, όμως κάποιες περιπτώσεις που το στοιχείο αυτό δυσχεραίνει την κατάσταση και ιδιαίτερα όταν αναφερόμαστε σε πολυφάγα είδη.

Επιπλέον, τα τελευταία χρόνια πραγματοποιούνται μελέτες που στοχεύουν επίσης στην αναγνώριση ειδών αλλά με διαφορετικό τρόπο. Αναφέρονται στις μοριακές τεχνικές και χρησιμοποιούν μία σειρά από μεθόδους για να συγκρίνουν το γονιδίωμα ή και τα προϊόντα του (πρωτεΐνες). Για την περίπτωση των ειδών του γένους *Macrolophus* γίνεται αναλυτική αναφορά στα κεφάλαια που ακολουθούν.

1.4 - 1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ταξινόμηση των ειδών του *Macrolophus* sp. βασίζεται σε ποικίλα μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα οποία αναφέρονται στο μήκος του σώματος και άλλων οργάνων των ενηλίκων ατόμων, το μήκος μίας μαύρης ζώνης στο πίσω μέρος των οφθαλμών, καθώς και στον χρωματισμό του πρώτου άρθρου της κεραίας, ο οποίος φαίνεται να είναι πιο αντικειμενικό κριτήριο σε σχέση με τα υπόλοιπα (Martinez-Cascales *et al*, 2006). Όμως, οι διαφορές σε αυτά τα σημεία δεν είναι πάντα ξεκάθαρες. Το πρόβλημα είναι μεγαλύτερο για τα είδη *Macrolophus melanotoma* (Costa, 1853) και *Macrolophus pygmaeus* (Rambur, 1839). Αν αναλογιστεί κανείς τη σημασία που έχουν τα είδη αυτά στην ολοκληρωμένη αντιμετώπιση, αλλά και τις διαφορές στη βιο-οικολογία και τη

συμπεριφορά τους, μπορεί να κατανοήσει την αναγκαιότητα εύρεσης τρόπου που θα καθιστά σαφή τα κριτήρια διάκρισης των εντόμων αυτών.

1.4 - 2 ΞΕΝΙΣΤΕΣ

Κάθε φυτό φιλοξενεί στη διάρκεια της ζωής του πολλούς οργανισμούς. Συνήθως αυτοί οι οργανισμοί είναι συγκεκριμένοι, καθώς κάποια καλλιέργεια εμφανίζεται να προτιμάται από κάποιους περισσότερο. Υπάρχουν περιπτώσεις, όπου ένας τρόπος να διακριθούν είδη που ομοιάζουν μεταξύ τους είναι με βάση τον ξενιστή στον οποίο εντοπίζονται. Για παράδειγμα, η αφίδα *Hyalopterus pruni* (Hemiptera: Aphididae) και η αφίδα *Hyalopterus amygdali* (Hemiptera: Aphididae) φαίνεται να αποτελούν δύο διαφορετικά είδη τα οποία παρουσιάζουν πολλές μορφολογικές ομοιότητες και είναι πολύ δύσκολο να διακριθούν με βάση αυτές τις πληροφορίες. Έχοντας, όμως, γνώση του ξενιστή τον οποίο προσβάλλουν υπάρχει ένα ακόμα στοιχείο το οποίο δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού του είδους των αφίδων. Συγκεκριμένα, υποστηρίζεται ότι σε δένδρα δαμασκηνιάς και βερικοκιάς υπάρχει το είδος *H. pruni*, ενώ σε ροδακινιά και αμυγδαλιά το *H. amygdali* (Mosco *et al*, 1997). Νεότερες μελέτες μιλούν για σύμπλοκο των δύο ειδών τα οποία εντοπίζονται και σε ίδιους ξενιστές (Lozier *et al*, 2007), αλλά ταυτόχρονα κάποιες άλλες υποστηρίζουν τη θεωρία συσχέτισης είδους και ξενιστή (Poullos *et al*, 2007).

Πολλοί οργανισμοί βρίσκουν καταφύγιο σε φυτά εκτός της καλλιέργειας, όπως είναι συνήθως τα ζιζάνια. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν πολλά από τα είδη της οικογένειας Miridae των Ημιπτέρων (Schaefer and Panizzi, 2000) και η σημασία τους στην ολοκληρωμένη αντιμετώπιση είναι ιδιαίτερη καθώς κάποια αρπακτικά μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση των πληθυσμών εχθρών γειτονικών καλλιεργειών, όπως αλευρώδεις, αφίδες, θρίπες κλπ (Kavallieratos *et al*, 2002). Τα δύο προς εξέταση στην παρούσα μελέτη είδη εντοπίζονται σε διαφορετικά φυτά ξενιστές, όπως αναφέρεται και στη βιβλιογραφία. Το *M. melanotoma* εντοπίζεται στα αυτοφυή φυτά του γένους *Dittrichia* sp. (Asteraceae) και για την Ελλάδα περιορίζεται στο είδος *Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter. Το *M. pygmaeus* βρίσκεται σε καλλιέργειες τομάτας, μελιτζάνας και πιπεριάς, αλλά και σε αυτοφυή φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Solanaceae, όπως το *Solanum nigrum* (Lykouressis *et al*, 2000).

ΜΕΓΑΛΗ ΑΚΟΝΥΖΙΑ *Dittrichia viscosa* (Asteraceae)

Η μεγάλη ακονυζιά [*Dittrichia viscosa* (L.) W. Greuter (*Inula viscosa* (L.) Aiton)] είναι γνωστή με πολλά ονόματα όπως ψυλλήθρα, κόνυζα, ίνουλα, κονυζιά κα. Παρατηρείται συχνά σε χώρες της λεκάνης της Μεσογείου απ' όπου και προέρχεται, αλλά και σε άλλες ηπείρους με ζεστό κλίμα. Φύεται σε πρηνή δρόμων, πετρώδεις περιοχές, εκτάσεις που δεν καλλιεργούνται και δεν δέχονται καμία περιποίηση κι επέμβαση. Επιπλέον, αποτελεί φυτό που εγκαθίσταται εύκολα και γρήγορα σε περιοχές που έχουν υποστεί πυρκαγιές. Η ανάπτυξή του ευνοείται από την υγρασία και είναι ταχύτερη όταν βρεθεί σε αμμώδη και αμμοπηλώδη εδάφη (Meikle, 1977,1985).

Είναι πολυετές ζιζάνιο με θαμνώδη εμφάνιση και όρθιο, κολλώδη βλαστό ο οποίος φθάνει τα 40-100 cm. Τα φύλλα του είναι λογχοειδή, οξυκατάληκτα με έντονες εγκολπώσεις και πολλές σμήριγγες και κολλώδεις εκκρίσεις. Ανθίζει την περίοδο Αύγουστος - Νοέμβριος και οι ταξιανθίες του έχουν κίτρινο χρώμα. Πολλαπλασιάζεται κυρίως με σπόρο και η μεγάλη ποσότητά τους επιτρέπει την ταχεία διάδοση και εγκατάσταση σε μεγάλες εκτάσεις (CRC Australian Weed Management, 2003).

Αξίζει να σημειωθεί, ότι λόγω των αλκαλοειδών που εκκρίνει έχει αλληλοπαθητικές ιδιότητες παρεμποδίζοντας την εγκατάσταση και εξάπλωση άλλων φυτών σε σημεία γειτονικά στις περιοχές που έχει ήδη εγκατασταθεί. Έχει έντονη οσμή και θεωρείται μελισσοκομικό και φαρμακευτικό φυτό το οποίο στην αρχαιότητα χρησιμοποιούνταν ως αφέψημα για να καταπραΰνει μυϊκούς πόνους. Επίσης, αναφέρεται ότι έχει εντομοκτόνες ιδιότητες (<http://floraattica.blogspot.com>).



Εικόνα 1-5: Φυτό *Dittrichia viscosa* στην περιοχή της Πεντέλης - Αττική.

ΣΤΥΦΝΟΣ - ΑΓΡΙΟΝΤΟΜΑΤΙΑ *Solanum nigrum* L. (Solanaceae)

Ο στύφνος *Solanum nigrum* L. (Solanaceae) αποτελεί ένα από τα πιο κοσμοπολίτικα ζιζάνια σε πολλές περιοχές του κόσμου. Ανήκει στην κατηγορία των ετήσιων, θερινών, πλατύφυλλων δικοτυλήδων ζιζανίων και είναι γνωστό στην Ελλάδα και με τα ονόματα αγριοντοματά, πικροσταφίδα, βρωμόχορτο, στρύχνος κλπ. Είναι φυτό με πολλές διακλαδώσεις, το ύψος του φθάνει τα 50cm και ανθίζει την περίοδο καλοκαίρι-φθινόπωρο (<http://www.plantprotection.hu>). Τα άνθη του είναι μικρά, λευκού χρώματος, ερμαφρόδιτα (εντομόφιλα) και βρίσκονται πολλά μαζί σε ομάδες, φυόμενα σε κοντούς ποδίσκους (<http://www.botanical.com>). Προτιμά τα χαλαρά, πλούσια σε οργανική ουσία και σε άζωτο αργιλώδη εδάφη, με pH περίπου ουδέτερο (Τσαπικούνης, 2002).

Εντοπίζεται σε καλλιέργειες όπως αυτές του αραβοσίτου, ζαχαρότευτλου, σόγιας, καρπουζιού, καπνού, πατάτας, τομάτας και άλλων σολανωδών φυτών, σε αμπελώνες και περισσότερο σε γραμμικές καλλιέργειες (<http://www.plantprotection.hu>). Εκτός από τη μείωση της τελικής απόδοσης που προκαλεί στα καλλιεργούμενα φυτά, μπορεί να τα ζημιώσει και λειτουργώντας ως ξενιστής παθογόνων όπως νηματωδών σκωλήκων, βακτηρίων (*Xanthomonas* sp, *Pseudomonas* sp. κλπ), μυκήτων (*Alternaria* sp, *Verticillium* sp. κλπ), ιών (PVY, TSWV κλπ) και εντόμων (*Leptinotarsa decemlineata*, *Helicoverpa armigera*, θρίπες, αφίδες κλπ). Ταυτόχρονα, παρουσιάζει και κάποια πλεονεκτήματα, όπως το ότι φιλοξενεί το αρπακτικό έντομο *Macrolophus pygmaeus*. Ακόμα, φαίνεται ότι συνεργάζεται με το βακτήριο *Agrobacterium tumefaciens* για την απομάκρυνση από το έδαφος κάποιων επιβλαβών για τα καλλιεργούμενα φυτά ουσιών, τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (Polychlorinated biphenyls - PCB's) (Anderson, 1997).

Η ονομασία του στρύχνος, αποκαλύπτει μία ουσία που περιέχει το φυτό, τη στρυχνίνη (σολανίνη), η οποία υπάγεται στην κατηγορία των αλκαλοειδών. Στην ουσία αυτή οφείλει την ιδιότητά του ως δηλητηριώδες και ικανό να προκαλέσει παραισθήσεις ή ακόμα και τον θάνατο, αν καταναλωθεί σε μεγάλες ποσότητες (<http://www.botanical.com/>). Σύμφωνα, όμως, με τον Θεόφραστο (370 - 285 π.Χ.) οι ώριμοι καρποί του τρώγονταν ωμοί. Παράλληλα, ο Διοσκουρίδης έρχεται να το απενοχοποιήσει και να μας βεβαιώσει ότι ο στρύχνος «αβλαβής εστί προς βρώσιν, δύναμιν δε έχει ψυχική» (<http://www.kathimerini.gr>). Ο ίδιος το χρησιμοποιούσε για να μειώσει τον πυρετό. Λόγω των φαρμακευτικών του ιδιοτήτων χρησιμοποιείται κατά των κνησμών και των ελκών, των πρηξιμάτων και των εγκαυμάτων, αλλά και για στοματικές πλύσεις κλπ.



Εικόνα 1-6: Φυτό *Solanum nigrum* στην περιοχή του Βοτανικού - Αττική.

1.4 - 3 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Στα πλαίσια της μελέτης και ταξινόμησης έχουν πρόσφατα ενταχθεί τεχνικές που αφορούν το γενετικό υλικό. Αυτές στοχεύουν συνήθως στην ανάλυση του γενετικού υλικού, αλλά πολλές φορές και σε παράγωγά του, όπως πρωτεΐνες κι ένζυμα (Schuh *et al*, 2009). Οι πιο εύχρηστες από αυτές περιγράφονται στη συνέχεια και ταυτόχρονα αναφέρονται οι μελέτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

ΜΕΘΟΔΟΣ PCR: Polymerase Chain Reaction

Με τη PCR (Polymerase Chain Reaction) ή αλλιώς Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης δημιουργούνται πολλά αντίγραφα του γονιδιακού τμήματος που θα μελετηθεί και το οποίο μπορεί να ανήκει σε πυρηνικό ή μιτοχονδριακό DNA. Ανάλογα με το τι επιδιώκει να μελετήσει ο κάθε ερευνητής επιλέγεται και διαφορετικό τμήμα DNA. Έπειτα προμηθεύεται τους απαραίτητους εκκινητές (primers), δηλαδή των αλληλουχιών βάσεων που θα αποτελέσουν τα άκρα του προς μελέτη τμήματος. Αυτό το κομμάτι θα επιλεγεί και θα πολλαπλασιαστεί πολλές φορές με τη συνεργασία άλλων μορίων (DNA-πολυμεράση, dNTPs) και μετά από μία σειρά αυξομειώσεων της θερμοκρασίας του περιβάλλοντός του ώστε να είναι πολύ πιο εύκολο να μελετηθεί με οποιοδήποτε τρόπο.

Ο λόγος που εφαρμόστηκε και διαδόθηκε η PCR ήταν ο συνδυασμός απλότητας, ακρίβειας, ταχύτητας και απουσίας ζωντανού κυττάρου. Η αρχική έκδοση των Kleppe *et al* (1971) συμπεριλάμβανε ζωντανό κύτταρο, όμως αργότερα (1976) και με την ανακάλυψη της Taq-πολυμεράσης (Taq-polymerase), η οποία απομονώθηκε από θερμοφιλά βακτήρια (*Thermus aquaticus*), η διαδικασία επιταχύνθηκε κατά πολύ. Η πολυμεράση αυτή αντέχει σε υψηλές θερμοκρασίες (50-90⁰C) επιτρέποντας την αποδιάταξη των δίκλωνων αλυσίδων και χρησιμοποιώντας νουκλεοτίδια (αδενίνη, θυμίνη, γουανίνη, κυτοσίνη - dNTPs) συνθέτει ταχύτατα γονιδιακές αλληλουχίες (Mullis, 1987). Η ανακάλυψη αυτή έδωσε στον Mullis το βραβείο Nobel το 1993. Η χρήση της μεθόδου δεν έμεινε σε ερευνητικό επίπεδο, αλλά γρήγορα βρήκε εφαρμογή στη βιοτεχνολογία ιατρική για τη διάγνωση ασθενειών όπως η αναιμία, στην ιατροδικαστική και τη δικαιοσύνη για τη διαλεύκανση υποθέσεων, στην αρχαιολογία για τη μελέτη αρχαϊκού DNA, αλλά και στην περίπτωση ειδών υπό εξαφάνιση. Αποτελεί αρωγό σε κάθε περίπτωση που το γενετικό υλικό δεν επαρκεί για να μελετηθεί.

Στα πλαίσια των μοριακών τεχνικών που έχουν εφαρμοστεί στα είδη του γένους *Macrolophus* εντάσσεται μία εργασία (Schmidt *et al*, 2009) που αφορά τον προσδιορισμό του είδους της τροφής που έχει λάβει το αρπακτικό *M. melanotoma*. Γίνεται έτσι γνωστό με έναν διαφορετικό τρόπο τι προτιμά για να τρέφεται κι επομένως ξεκαθαρίζει έναν σημαντικό παράγοντα που καθιστά ευκολότερη την εγκατάστασή του σε μία καλλιέργεια και ταυτόχρονα παρέχει λύση για πιθανή εκτροφή του στα πλαίσια της ολοκληρωμένης και βιολογικής αντιμετώπισης. Στην εργασία αυτή χρησιμοποιούνται ως στοιχεία γονίδια που σχετίζονται με τις εστεράσες και την κυτοχρωμική οξειδάση όταν δόθηκε ως τροφή η αφίδα *Myzus persicae*. Καταγράφηκαν επομένως κάποια δεδομένα τα οποία μπορούν να συγκριθούν με οποιοδήποτε νέο δείγμα και να διαπιστωθεί αν η τροφή ήταν η συγκεκριμένη αφίδα ή κάποιος άλλος οργανισμός. Η βασική μοριακή τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην περίπτωση αυτή ήταν η Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (Real time PCR) (Schmidt *et al*, 2009), όπου η όλη διαδικασία παρακολουθείται ανά πάσα στιγμή και μπορεί να καταγραφούν και να υπολογιστούν και πολύ μικρές ποσότητες DNA, cDNA, RNA μορίων.

ΜΕΘΟΔΟΣ PCR-RFLPs: Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphisms

Η μέθοδος αυτή μπορεί να δώσει απαντήσεις σε θέματα πολυμορφισμού του γενετικού υλικού ακόμη και σε επίπεδο γενετικών μεταλλαγών κλπ. Αποτελεί συνδυασμό δύο μεθόδων. Αφού γίνει η αλυσιδωτή αντίδραση και πολλαπλασιαστεί η προς μελέτη περιοχή, χρησιμοποιείται κάποιο ένζυμο περιορισμού που έχει την ικανότητα να κόβει την αλληλουχία σε συγκεκριμένα σημεία.

Έχει ανακαλυφθεί ότι τα βακτήρια έχουν αναπτύξει έναν αμυντικό μηχανισμό για να απορρίπτουν την είσοδο και ενσωμάτωση ξένου γενετικού υλικού στον οργανισμό τους. Σύμφωνα με αυτόν υπάρχουν κάποια ένζυμα που ονομάζονται περιοριστικές ενδονουκλεάσες ή ένζυμα περιορισμού και έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν και να “κόβουν” συγκεκριμένες αλληλουχίες βάσεων. Έτσι οποιοδήποτε ξένο γενετικό υλικό βρεθεί στην περιοχή δράσης τους, το αχρηστεύουν κόβοντάς το. Το μήκος των αλληλουχιών που αναγνωρίζουν δεν ξεπερνά τα 12 νουκλεοτίδια, αλλά συνήθως είναι 5-6.

Εκμεταλλεόμενοι την ιδιότητα αυτή οι επιστήμονες ξεκίνησαν να χρησιμοποιούν την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, η οποία απομονώθηκε από το κοσμοπολίτικο βακτήριο *Escherichia coli* και αφού αναγνωρίσει την αλληλουχία GAATTC την κόβει μεταξύ G-A (Εικόνα 1-7). Χρησιμοποιήθηκε πολύ στην τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και η ανακάλυψή της μεθόδου χάρισε στους Daniel Nathans, Werner Arber και Hamilton Smith το βραβείο Nobel (Nobel Prize in Physiology or Medicine, 1978). Σήμερα έχουν μελετηθεί περισσότερα από 3000 τέτοια ένζυμα, ενώ περίπου 600 είναι διαθέσιμα στο εμπόριο (Roberts *et al*, 2007).



Εικόνα 1-7: Αλληλουχία νουκλεοτιδίων που αναγνωρίζει και δρα η περιοριστική ενδονουκλεάση του βακτηρίου *Escherichia coli*, EcoRI
(Πηγή: <http://en.wikipedia.org/>)

Κατά τη μέθοδο αυτή δημιουργούνται περισσότερα τμήματα γονιδιακών αλληλουχιών από το αρχικό, τα οποία έχουν διαφορετικό μέγεθος. Λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν και της διαφοράς τους στο μήκος, αν βρεθούν σε κάποιο ηλεκτρικό πεδίο θα αρχίσουν να κινούνται με διαφορετική ταχύτητα. Το σημείο που θα βρεθούν με το τέλος της διαδικασίας μας πληροφορεί για το μέγεθός τους και επομένως υπάρχει ένα αντικειμενικό κριτήριο για να γίνουν οι επιθυμητές συγκρίσεις και συζητήσεις (Williams *et al*, 1990). Αποτέλεσε μία από τις πρώτες μεθόδους ανάλυσης DNA και χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα λόγω της ακρίβειας και της ταχύτητας στις πληροφορίες που δίνει και την απλότητα ως προς την εφαρμογή. Σε αυτήν τη μέθοδο βασίστηκαν και οι Perdakis *et al* (2003) στην προσπάθειά τους να εντοπίσουν διαφορές στα έντομα *M. pygmaeus* και *M. melanotoma*.

ΜΕΘΟΔΟΣ PCR-AFLPs: Polymerase Chain Reaction - Amplified Fragment Length Polymorphisms

Αρκετά σημεία της συγκεκριμένης μεθόδου είναι κοινά με την προηγούμενη. Και πάλι χρησιμοποιείται ηλεκτροφόρηση τμημάτων γονιδίων που έχουν πολλαπλασιαστεί με PCR και διαχωρίζεται με περιοριστικά ένζυμα. Η βασική διαφορά με την πρώτη εντοπίζεται στο ότι δεν εστιάζει στο μέγεθος των θραυσμάτων, αλλά στον εντοπισμό και τον αριθμό τους. Πραγματοποιείται σε τρία στάδια: εφαρμογή περιοριστικών ενζύμων και σύνδεση με υποδοχείς νουκλεοτιδίων, επιλογή και ενίσχυση των θραυσμάτων, ηλεκτροφόρηση και παρατήρηση του πήγματος (gel) (Vos *et al*, 1995). Θεωρείται απλούστερη από την RFLP's και φαίνεται να δίνει πιο αξιόπιστα αποτελέσματα από άλλες μοριακές μεθόδους.

ΜΕΘΟΔΟΣ RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction

Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιούνται τυχαίοι εκκινητές (random primer), ανεξάρτητοι από τον οργανισμό που χρησιμοποιείται, ώστε ενισχύσουν το DNA. Στο παρελθόν έχει χρησιμοποιηθεί για τη χαρτογράφηση γονιδιωμάτων. Επιπλέον, μπορεί να δώσει πληροφορίες για τον πολυμορφισμό και τις διαφορές οργανισμών κι εντόμων με γεωργική υγειονομική ή άλλη σημασία (Williams *et al*, 1990).

Στα πλεονεκτήματα συμπεριλαμβάνονται το ιδιαίτερα χαμηλό κόστος, η ταχύτητα λήψης αποτελεσμάτων, η ευαισθησία της ως τεχνική και η μεγάλη ποικιλομορφία που μπορεί να προσδιορίσει. Όμως, η απουσία επανάληψης της μεθόδου και η πιθανή αλλοίωση λόγω εξωτερικών παραγόντων (περιβάλλον) αποτρέπουν τους ερευνητές να τη χρησιμοποιήσουν, όταν μάλιστα υπάρχουν άλλες τεχνικές πιο σύγχρονες που έχουν λύσει αυτά τα προβλήματα. Γνωρίζοντας αυτά οι Perdakis *et al* (2003), εφάρμοσαν τη μέθοδο προσπαθώντας να εξετάσουν το πυρηνικό γονιδίωμα και να διαπιστώσουν αν διαφέρουν τα αρπακτικά έντομα *M. pygmaeus* και *M. melanotoma*.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ ΝΟΥΚΛΕΙΚΩΝ ΟΞΕΩΝ

Η αρχή της μεθόδου αυτής είναι ότι τα δίκλινα μόρια DNA για να αποδιαταχθούν πρέπει να βρεθούν σε υψηλές θερμοκρασίες, οι οποίες πρέπει να είναι μεγαλύτερες για πιο σταθερά μόρια. Ουσιαστικά χρησιμοποιείται ως πρώτη ύλη το γενετικό υλικό δύο οργανισμών που πρέπει να συγκριθούν, το οποίο αφού αποχωριστεί τη συμπληρωματική του νουκλεοτιδική αλυσίδα, υβριδοποιείται με την απλή αλυσίδα του προς σύγκριση οργανισμού. Ύστερα, εφαρμόζεται θέρμανση στο υβριδοποιημένο μόριο και καταγράφεται η θερμοκρασία στην οποία αποδιατάσσεται. Αν αυτή είναι πάνω από κάποιο όριο τότε εξάγεται το συμπέρασμα ότι οι δύο αλυσίδες είναι σε μεγάλο βαθμό

συμπληρωματικές μεταξύ τους κι επομένως οι οργανισμοί έχουν πολλά κοινά στοιχεία (Britten and Kohne, 1968). Έχει εφαρμοστεί σε έντομα στο παρελθόν δίνοντας ενδιαφέροντα αποτελέσματα.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ ENZYMΩΝ – Enzyme Electrophoresis

Οι πρωτεΐνες αποτελούν προϊόντα έκφρασης του γενετικού υλικού των οργανισμών και είναι γνωστό ότι ένα γονίδιο συνθέτει μία πολυπεπτιδική αλυσίδα. Επομένως, η διερεύνηση της δομής των πρωτεϊνών θα μπορούσε να δώσει πληροφορίες για το αντίστοιχο DNA. Στα πλαίσια αυτής της λογικής πραγματοποιείται ηλεκτροφόρηση ενζύμων, δηλαδή πρωτεϊνών, ως μέθοδος διαχωρισμού. Οι πληροφορίες που συλλέγονται ανάγονται στο επίπεδο γονιδιακών αλληλουχιών και ερμηνεύονται με μία έμμεση μέθοδο. Με αυτόν τον τρόπο διαπιστώνεται η ύπαρξη μεταλλαγών, η παραλλακτικότητα ή η συγγένεια οργανισμών, η εξέλιξη των ειδών κλπ.

Στην ηλεκτροφόρηση συμμετέχουν συνήθως ισοένζυμα, δηλαδή διαφορετικές μορφές ενός ενζύμου με όμοιες ιδιότητες, αλλά διαφορετικό ηλεκτρικό φορτίο. Επομένως, εάν βρεθούν σε μαγνητικό πεδίο και εφαρμοστεί πάνω τους ηλεκτρική δύναμη θα αποκτήσουν διαφορετική ταχύτητα. Έτσι, στο τέλος της ηλεκτροφόρησης τα διαφορετικά ένζυμα βρίσκονται σε διαφορετική θέση, υπονοώντας τη διαφορετικότητα των γονιδιακών αλληλουχιών απ' όπου προήλθαν. Οι διαφορές τους μπορεί να οφείλονται σε πολλά αίτια, όπως επίδραση περιβάλλοντος, γενετική ποικιλότητα, διαφοροποιήσεις κατά τη διαδικασία της έκφρασης κλπ, γεγονός που καθιστά τη μέθοδο αυτή όχι ιδιαίτερα αξιόπιστη αν επιδιώκεται η σύγκριση οργανισμών σε επίπεδο είδους. Στα πλεονεκτήματα αναφέρονται η ταχύτητα της μεθόδου και το γεγονός ότι μπορεί να εφαρμοστεί ταυτόχρονα σε πολλά ένζυμα, δίνοντας χρόνο και χαμηλό κόστος.

1.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ - Sequencing

Η τεχνική που φαίνεται να υπερέχει και να χρησιμοποιείται περισσότερο σε αυτή την κατεύθυνση είναι αυτή του προσδιορισμού της γονιδιακής αλληλουχίας που αποτελείται από πολλά στάδια. Είναι μέθοδος που αφορά πτυχές της βιολογίας και της γενετικής όπως η εξέλιξη οργανισμών, παραλλακτικότητα μεταξύ συγγενών ειδών, παραλλακτικότητα εντός του είδους κλπ (Hoy, 1994).

Αρχικά, το πρώτο στάδιο, όπως και στις περισσότερες ανάλογες μεθόδους, αποτελεί η απομόνωση του ολικού DNA. Ο τύπος του γενετικού υλικού που θα προσδιορισθεί και θα αναλυθεί είναι το μιτοχονδριακό DNA, με τις τελευταίες μελέτες να προσανατολίζονται και στο πυρηνικό και μικρο-δορυφορικό DNA. Οι διαφορές των δύο τύπων DNA σχετίζονται κυρίως με το μέγεθος, τον αριθμό των αντιγράφων τους, την προέλευσή τους και τις ιδιότητές τους.

Το επόμενο βήμα αφορά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης - Polymerase Chain Reaction (PCR). Η μέθοδος PCR ή αλλιώς Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης αποτελεί μία γρήγορη και ακριβή μέθοδο λήψης μεγάλου αριθμού αντιγράφων μίας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλληλουχίας. Οι εκκινητές (primers) που οριοθετούν το επιθυμητό κομμάτι συνεργάζονται με την πολυμεράση, η οποία έχοντας ως πρώτη ύλη νουκλεοτίδια (dNTPs) συνθέτει τη νέα αλληλουχία. Για να δημιουργηθούν πολλά αντίγραφα εφαρμόζεται αυξομείωση της θερμοκρασίας ώστε να αποχωρίζονται οι αλυσίδες του γενετικού υλικού (υψηλή θερμοκρασία) και να προσκολλώνται τα νουκλεοτίδια (χαμηλή θερμοκρασία). Η πολυμεράση που έχει ως βασικό ρόλο την τοποθέτηση των νουκλεοτιδίων στην κατάλληλη θέση πρέπει να αντέχει στις υψηλές θερμοκρασίες που υπάρχουν και γι αυτό χρησιμοποιήθηκε θερμοάντοχη DNA-πολυμεράση που απομονώθηκε από θερμοφιλά βακτήρια (*Thermus aquaticus*) (Mullis, 1987).

Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται στην περίπτωση της ταυτοποίησης ειδών οργανισμών είναι λίγοι σε αριθμό, αλλά φαίνεται να δίνουν λύση στις περισσότερες των περιπτώσεων. Το γένος *Macrolophus* λόγω της σημασίας του στη γεωργική πράξη έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών και υπάρχουν εργασίες με διαφορετικά γονιδιακά τμήματα να έχουν εξεταστεί και να έχουν κατατεθεί στην παγκόσμια τράπεζα γονιδιώματος (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Πιο αναλυτικά, αυτά είναι:

- τμήμα 16S του ριβοσωμικού DNA: Συμμετέχει και καθορίζει τη δομή των ριβοσωμάτων (Wheeler and Schuh, unpublished; Perdikis *et al*, 2003).
- τμήμα 18S του ριβοσωμικού DNA: Συμμετέχει στη δομή των ριβοσωμάτων (Wheeler and Schuh, unpublished; Schuh *et al*, 2009).

- τμήμα 28S του ριβοσωμικού DNA: Συμμετέχει στη δομή των ριβοσωμάτων (Wheeler and Schuh, unpublished).
- τμήματα του κυτοχρώματος b: Συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την διαδικασία της αναπνοής (Martinez-Cascales and Sanchez, unpublished; Martinez-Cascales *et al*, 2006; Sanchez *et al*, 2006).
- τμήματα της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης: Συμμετέχουν στη μεταφορά ηλεκτρονίων κατά τη διαδικασία της αναπνοής (Wheeler and Schuh, unpublished; Schuh *et al*, 2009).

Συνήθως, αμέσως μετά ακολουθεί μία ηλεκτροφόρηση. Η ηλεκτροφόρηση πήγματος αгарόζης, αποτελεί μέθοδο ελέγχου, παρατήρησης ή διαχωρισμού των μορίων DNA ή RNA. Επειδή τα μόρια αυτά είναι φορτισμένα με αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο, αν τοποθετηθούν σε ηλεκτρικό πεδίο, λόγω των δυνάμεων που ασκούνται κινούνται και απομακρύνονται μεταξύ τους. Κάθε μόριο έχει διαφορετικό μέγεθος και βάρος και με την εφαρμογή των ίδιων δυνάμεων “τρέχουν” με διαφορετική ταχύτητα. Με την κατάργηση του ηλεκτρικού πεδίου βρίσκονται σε διαφορετικά σημεία και διαχωρίζονται. Η ταχύτητά τους εξαρτάται από τις ιονιζόμενες ομάδες που τα απαρτίζουν, το μήκος τους (ζεύγη βάσεων), καθώς και τη σύσταση του πήγματος (gel). Όσο περισσότερες είναι οι ιονιζόμενες ομάδες και όσο μικρότερο το μήκος τους, τόσο πιο γρήγορα κινούνται. Με την παράλληλη χρήση μάρτυρα είναι εφικτό να βρεθεί και προσεγγιστικά το μήκος των μορίων αυτών.

Για την παρατήρηση και υπολογισμό του μεγέθους του DNA χρησιμοποιείται διάλυμα φθορίζουσας ουσίας (βρωμιούχο αιθίδιο, SYBR Green, GelRed κλπ) το οποίο μπορεί να προσκολλάται σε νουκλεοτιδικές αλληλουχίες και να φθορίζει όταν βρεθεί σε περιβάλλον με υπεριώδη ακτινοβολία. Έτσι, τοποθετείται το πήγμα με το γονιδιακό υλικό σε διάλυμα φθορίζουσας ουσίας και έπειτα σε ακτινοβολία UV. Το αποτέλεσμα φωτογραφίζεται και μελετάται περεταίρω με τη χρήση πακέτων επεξεργασίας φωτογραφιών.

Το τελευταίο στάδιο αφορά τον προσδιορισμό της γονιδιακής αλληλουχίας (Sequencing) όπου ουσιαστικά λαμβάνεται ένα αποτέλεσμα αλληλουχίας βάσεων κι έπειτα είναι θέμα συγκρίσεων και στατιστικών αναλύσεων για να προσδιοριστεί το είδος στο οποίο ανήκει ο οργανισμός που μελετάται.

1.5 - 1 ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟ DNA – mtDNA

Τα μιτοχόνδρια αποτελούν πολύπλοκα οργανίδια των ευκαρυωτικών κυττάρων με κύρια λειτουργία τους την αερόβια αναπνοή, δηλαδή την παραγωγή χημικών μορίων (ATP) που θα μεταφραστούν σε ενέργεια για τον οργανισμό όπου ανήκουν. Λόγω των μηχανισμών που καταλύουν βρίσκονται σε μεγαλύτερους αριθμούς σε κύτταρα που καταναλώνουν μεγάλες ποσότητες ενέργειας, όπως είναι τα μυϊκά κύτταρα, τα κύτταρα της καρδιάς κλπ. Διαθέτουν το δικό τους γενετικό υλικό, συνθέτουν τις δικές τους πρωτεΐνες και πολλαπλασιάζονται ταχύτατα, όμως για να εκτελέσουν πλήρως τις λειτουργίες τους εξαρτώνται και από το πυρηνικό DNA. Το μιτοχονδριακό DNA (mtDNA) υπάρχει σε πολλά αντίγραφα, είναι κυκλικό και μικρό σε μέγεθος και περνά στην επόμενη γενιά, συνήθως από τον θηλυκό γονέα (μητρική προέλευση ή κληρονομικότητα). Νεότερες μελέτες μιλούν και για πατρική κληρονομικότητα σε έντομα όπως το *Drosophila* spp. (Kondo *et al*, 1992), τη μέλισσα (Meusel and Moritz, 1993), ορισμένα κουνούπια (Oshaghi, 2005) ή ακόμα και στον άνθρωπο (Schwartz and Vissing, 2002), η οποία παρουσιάζεται σε μη φυσιολογικές συνθήκες (στεριότητα, έλλειψη οξυγόνου κλπ).

Συγκριτικά με το πυρηνικό DNA εξελίσσεται πολύ πιο γρήγορα, δεν παράγει πρωτεΐνες που αφορούν την αντιγραφή, μεταγραφή και μετάφρασή του (Adams, 2005). Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια δεν μπορούν να επιδιορθώσουν οποιαδήποτε μεταλλαγή υποστούν με αποτέλεσμα η ύπαρξη μεταλλάξεων να εντοπίζεται πολύ πιο εύκολα στο μιτοχονδριακό DNA λόγω του υψηλού εξελικτικού ρυθμού και του μεγάλου αριθμού των αντιγράφων του. Ακόμα, δεν έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο του ανασυνδυασμού.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά το καθιστούν σημαντικό εργαλείο σε μελέτες που αφορούν τις συγκρίσεις και την εξελικτική διαδικασία οργανισμών (Avisé, 2000). Αρκετά είδη εντόμων και αρθροπόδων γενικότερα έχουν εξεταστεί με αυτόν τον τρόπο (Sperling and Hickey, 1994; Vandewoestijne *et al*, 2004; Sezonlin *et al*, 2006; Margaritopoulos *et al*, 2007).

1.5 - 2 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ 12sr

Η επιλογή του κατάλληλου γονιδιακού τμήματος είναι βασικός παράγοντας για την εύρεση διαφορών και για την εξαγωγή σημαντικών επιστημονικά συμπερασμάτων. Απαιτείται και βιβλιογραφική αναζήτηση, ώστε η πειραματική διαδικασία να δώσει αποτελέσματα, καθώς υπάρχουν γονίδια τα οποία δεν δίνουν εξαρχής διαφορές και δεν

μπορούν να χρησιμοποιηθούν γι' αυτόν τον σκοπό. Η γονιδιακή αλληλουχία 12sr έχει καθιερωθεί προς αυτή την κατεύθυνση σε πολλούς και διαφορετικούς οργανισμούς (Palumbi *et al*, 1991). Στην περίπτωση των αμφιβίων έχει επιλεγεί το συγκεκριμένο γονίδιο σε συνδυασμό με το γονίδιο 16sr για τη δημιουργία καταλόγων και βάσεων δεδομένων ανά τον κόσμο (Vences *et al*, 2005).

Η αλληλουχία αυτή παράγεται από συγκεκριμένους εκκινητές [5' - AAACCTGG GATTAGATACCCCACTAT - 3' - 5' - GAGGGTGACGGGCGGTGTGT - 3'] και το τμήμα που προκύπτει έχει μήκος 350-400 νουκλεοτίδια. Ο ρόλος του είναι ο έλεγχος της σύνθεσης της μικρή υπομονάδας των ριβοσωμάτων. Τα ριβοσώματα αποτελούν τα οργανίδια στα οποία βασίζεται η σύνθεση των πρωτεϊνών και αποτελείται από δύο ή τρεις υπομονάδες στα προκαρυωτικά και τα ευκαρυωτικά κύτταρα, αντίστοιχα. Αυτές συνδέονται και σχηματίζουν λειτουργική ομάδα που θα προβεί στη μετάφραση του mRNA σε πολυπεπτιδική αλυσίδα, δηλαδή τη διαδικασία παραγωγής πρωτεϊνών.

Το γονιδιακό αυτό τμήμα δεν έχει χρησιμοποιηθεί ξανά για την περίπτωση του γένους *Macrolophus*.

1.5 - 3 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ COI - BARCODE

Το δεύτερο ζεύγος εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση διαφορών στα είδη είναι οι COI-barcode εκκινητές, όπως ονομάζονται. Οι εκκινητές αυτοί [5' – GG TCAACAAATCATAAAGATATTGG - 3' - 5' – TAAACTTCAGGGTGACCAAAAA ATCA - 3'] κωδικοποιούν το γονιδιακό τμήμα του μιτοχονδριακού DNA που εκφραζόμενο συμμετέχει στη σύνθεση της υπομονάδας I της κυτοχρωμικής οξειδάσης. Η κυτοχρωμική οξειδάση βρίσκεται στο μιτοχόνδριο και αποτελεί το τρίτο και τελευταίο ένζυμο της αλυσίδας μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο ρόλος της είναι σημαντικός τόσο στη διαδικασία της αναπνοής όσο και στη διαδικασία παραγωγής ενέργειας.

Το γονιδιακό τμήμα που παράγεται έχει μήκος μέχρι 700 ζεύγη βάσεων και μέχρι σήμερα έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλούς οργανισμούς που ανήκουν στο βασίλειο των ζώων (Annelida, Arthropoda, Chordota, Coelenterata, Echinodermata, Mollusca, Platyhelminthes κλπ), των μυκήτων (Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota κλπ), των φυτών (Magnoliophyta, Rhodophyta, Pinophyta, Pteridophyta, Bryophyta κλπ) και των πρωτίστων (<http://www.barcodinglife.com/>). Ένας μικρός αριθμός αλληλουχιών από το γονίδιο χρησιμοποιείται για την εύρεση των διαφορών και η ονομασία barcode χρησιμοποιείται όπως και στο γραμμικό αποτύπωμα (barcode) στα προϊόντα στην αγορά. Φαίνεται να αποτελεί ικανοποιητικό δείκτη διάκρισης ειδών, αλλά ταυτόχρονα παρέχει πληροφορίες για νέα είδη, αναγνώριση οργανισμών, ανασυγκρότηση δένδρων και

σχέσεων που υπάρχουν στα διάφορα taxa, καθώς και ανίχνευση ασθενειών (Εικόνα 1-8) ή φορέων τους (Hebert *et al*, 2003).

Πρόσφατα εφαρμόστηκε εντατικά και σε φυτικούς οργανισμούς (Ausubel, 2009). Μάλιστα για τους φυτικούς οργανισμούς το ενδιαφέρον που έχει προκύψει είναι μεγάλο και κατάληξη αυτού είναι η υπογραφή συμφωνίας στην τρίτη διεθνή συνδιάσκεψη “Barcode of Life” στο Μεξικό (Νοέμβριος 2009). Σύμφωνα με αυτήν θα δημιουργηθεί μία παγκόσμια βάση δεδομένων για τα φυτά, ανάλογη με αυτή που ήδη έχει αναπτυχθεί από το 2003 για τα ζώα, ώστε να έχουν πρόσβαση οι επιστήμονες ανά τον κόσμο. Αναμένεται τα επόμενα 5 χρόνια να μπουν στη βάση αυτή 500.000 είδη φυτικών οργανισμών (<http://www.dnabarcodes2009.org>).

Το *M. melanotoma* (=caliginosus) έχει μελετηθεί γι’ αυτούς τους εκκινητές (<http://www.barcodinglife.com/>), όχι όμως και το *M. pygmaeus*.

Εικόνα 1-8: Η μέθοδος barcode βοηθά στο να διαπιστωθεί αν το αίμα που έλαβε το κουνούπι ανήκε σε φορέα κάποιας ασθένειας

(Πηγή: The barcode of life – University of Rockefeller, blog)



1.6 ΣΚΟΠΟΣ ΜΕΛΕΤΗΣ

Σύμφωνα με τις βιβλιογραφικές πηγές υπάρχει μία σύγχυση ως προς τον προσδιορισμό των ειδών του γένους *Macrolophus* και πιο συγκεκριμένα για τα είδη *Macrolophus melanotoma* και *Macrolophus pygmaeus*. Οι κλασικοί τρόποι συστηματικής ταξινόμησης δείχνουν να μην μπορούν να κατατάξουν με αντικειμενικά και ακριβή κριτήρια σε ποιο είδος ανήκει το κάθε έντομο. Οι πιο σύγχρονοι τρόποι ταξινόμησης που αναφέρονται στις διάφορες μοριακές μεθόδους έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο. Κάποιες από αυτές δείχνουν ότι μπορούν να δώσουν περισσότερα στοιχεία ώστε να καταλήξουμε συνολικά πιο κοντά στην ορθή κατάταξη των δύο ειδών.

Αυτή τη λογική υιοθετεί και η παρούσα ερευνητική εργασία. Συγκεκριμένα, εξετάζονται με σκοπό να κριθούν οι ήδη υπάρχοντες τρόποι ταξινόμησης, δηλαδή μορφολογικά χαρακτηριστικά και φυτά ξενιστές. Ταυτόχρονα, γίνονται και διασταυρώσεις μεταξύ των φαινομενικά διαφορετικών ειδών. Επιπλέον, πραγματοποιείται προσδιορισμός κάποιων γονιδιακών τμημάτων της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του μιτοχονδριακού γονιδιώματος των ειδών, με στόχο την προσθήκη ενός ακόμα δείκτη διάκρισης. Αφού συγκεντρωθούν τα αποτελέσματα των παραπάνω ενεργειών θα συνεκτιμηθούν ώστε να καθοριστεί αν είναι ικανά να αποτελέσουν κριτήρια διάκρισης των ειδών του γένους. Τέλος, εμβαθύνοντας λίγο περισσότερο εξετάζεται και η γενετική ποικιλότητα που μπορεί να υπάρχει στο κάθε είδος, μελετώντας τι συμβαίνει σε πληθυσμούς από διαφορετικές περιοχές όπου έγινε η δειγματοληψία.

2

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΕΙΓΜΑΤΟΛΗΨΙΑ

Στο πλαίσιο της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν πληθυσμοί των αρπακτικών εντόμων *Macrolophus pygmaeus* και *Macrolophus melanotoma* από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, καθώς και δείγματα από μία περιοχή της Ισπανίας. Πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα (Alomar *et al*, 1994; Lykouressis *et al*, 2000) υποδεικνύουν ότι τα δύο είδη εντοπίζονται σε διαφορετικά φυτά ξενιστές και για το λόγο αυτό οι δειγματοληψίες έγιναν ως εξής:

- *M. pygmaeus* σε φυτά της οικογένειας Solanaceae και συγκεκριμένα, σε καλλιέργειες τομάτας ή στο αυτοφυές φυτό *Solanum nigrum* (στύφνος ή αγριοντοματιά) (Εικόνα 2-1)
- *M. melanotoma*, στο αυτοφυές *Dittrichia viscosa* (ψυλλήθρα ή μεγάλη ακονυζιά) (Εικόνα 2-2).



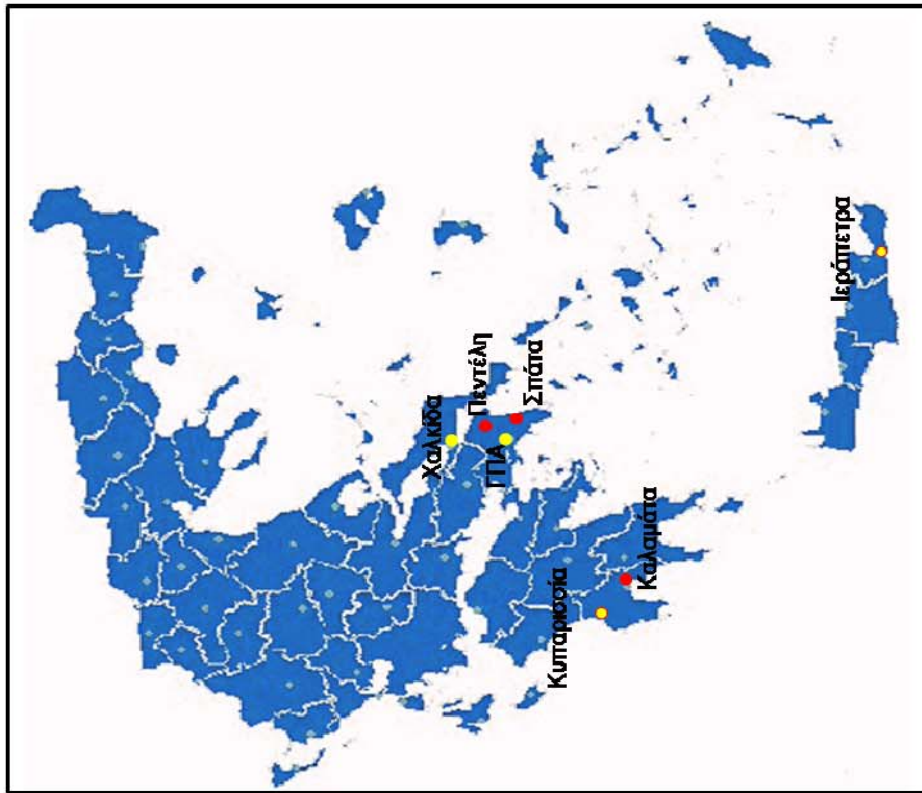
Εικόνα 2-1: Φυτό του είδους *Solanum nigrum* (Solanaceae)
[Πηγή διαδικτυο]



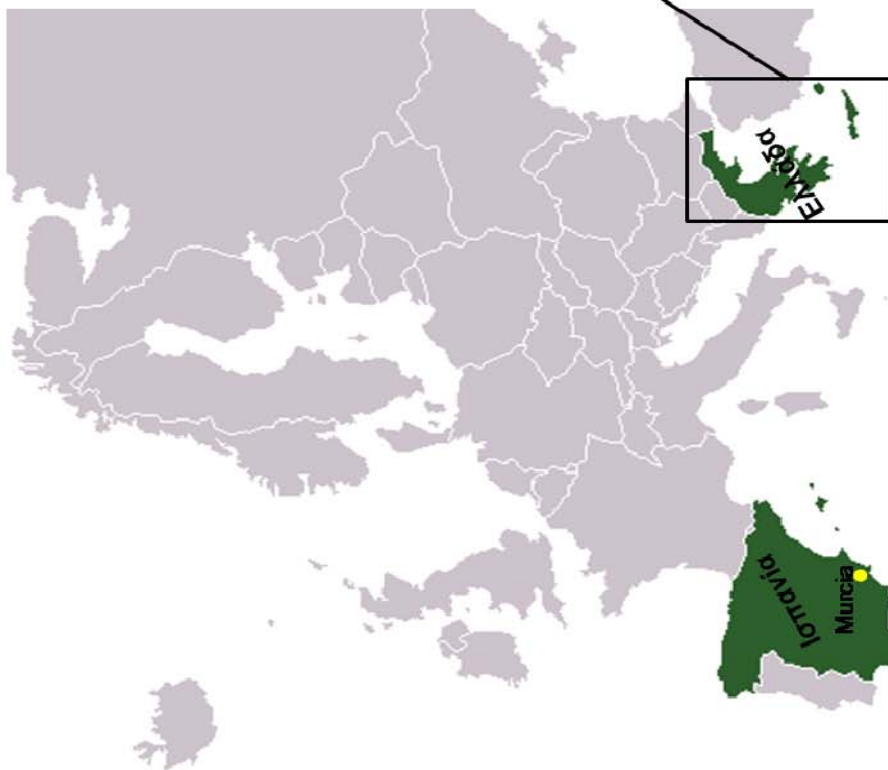
Εικόνα 2-2: Φυτό του είδους *Dittrichia viscosa* (Asteraceae)
[Πηγή διαδικτυο]

Τα ακμαία άτομα (10 ανά πληθυσμό) συλλέγονταν με τη βοήθεια αναροφητήρα, τοποθετούνταν ζωντανά σε φιαλίδια (tubes) και ύστερα στους -20°C όπου και παρέμεναν χωρίς να υποστούν αλλοίωση, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Εναλλακτικά, εισάγονταν ζωντανά σε φιαλίδια τύπου falcon που περιείχαν αλκοόλη 95-100% και διατηρούνταν στους -20°C .

Οι περιοχές δειγματοληψίας για το *M. pygmaeus* εντοπίζονται σε Βοτανικό (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών - AUA), Κρήτη (Ιεράπετρα - KRT), Κυπαρισσία (ΚΥΡ), Χαλκίδα (ΧΑΛ) και Ισπανία (Murcia - SPN), ενώ για το *M. melanotoma* σε Καλαμάτα (ΚΑΛ), Κρήτη (Ιεράπετρα - KRT), Κυπαρισσία (ΚΥΡ), Πεντέλη (ΡΕΝ) και Σπάτα (Διεθνής Αερολιμένας Αθηνών - AIR). Στην περίπτωση του πρώτου είδους και για τις περιοχές της Χαλκίδας και της Κυπαρισσίας, υπήρχαν εκτροφές στο θερμοκήπιο (25°C, φυσικό φως) του Εργαστηρίου Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Συγκεκριμένα, η αρχική συλλογή έγινε σε υπαίθριες καλλιέργειες τομάτας της εκάστοτε περιοχής όπου και υπήρχε ο γηγενής πληθυσμός και ύστερα από μεταφορά του στο εργαστήριο τοποθετήθηκε σε κλωβούς που περιείχαν φυτά μελιτζάνας παρασιτισμένα από την αφίδα *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae). Η αφίδα αποτελεί κατάλληλη τροφή για το συγκεκριμένο είδος. Όλα τα υπόλοιπα δείγματα συλλέγονταν από τα αντίστοιχα αυτοφυή φυτά. Οι περιοχές δειγματοληψίας φαίνονται και στην εικόνα 2-3.



- *M. pygmaeus*
- *M. melanotoma*
- *M. pygmaeus* + *M. melanotoma*

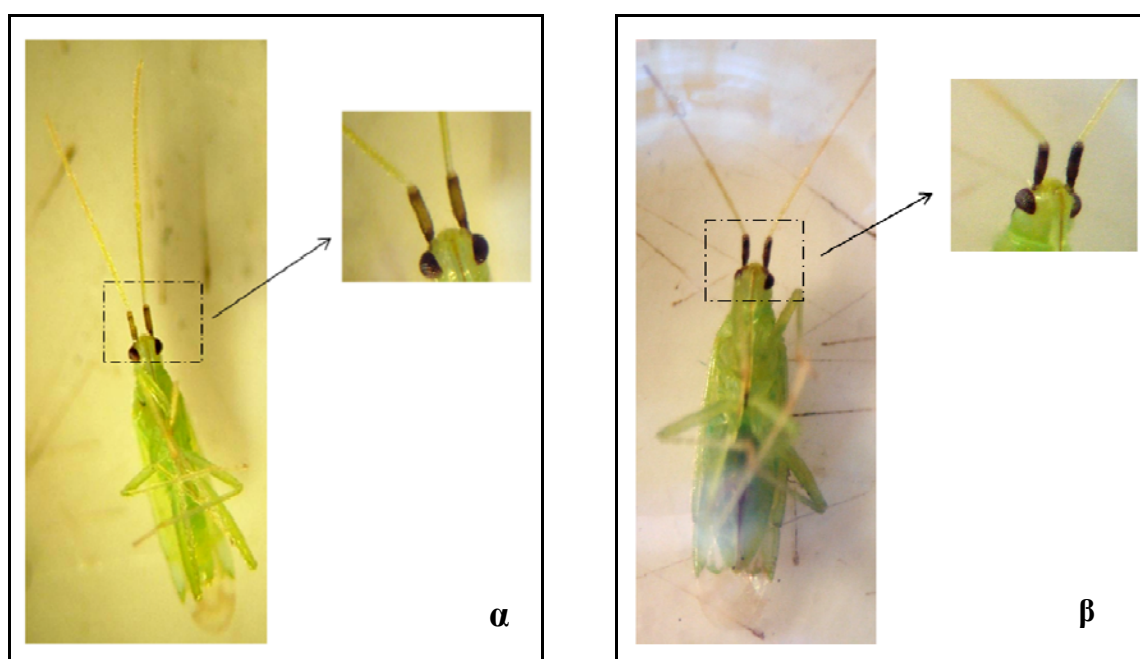


Εικόνα 2-3: Περιοχές δειγματοληψίας των *M. pygmaeus* και *M. melanotoma*.

2.2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Με βάση τη συστηματική ταξινόμηση, η οποία βασίζεται σε μορφολογικά χαρακτηριστικά, τα δύο είδη διαχωρίζονται μεταξύ τους χρησιμοποιώντας ως στοιχείο διάκρισης το χρώμα του πρώτου άρθρου της κεραίας (Josifov, 1992). Στην περίπτωση που αυτό είναι μαύρο με μία ανοιχτόχρωμη λευκή-γκριζωπή περιοχή στο μέσον του, τότε το έντομο θεωρείται ότι ανήκει στο είδος *M. melanotoma* (Εικόνα 2-4α). Αν, όμως, είναι μαύρο σε όλο το μήκος του, τότε το είδος είναι το *M. pygmaeus* (Εικόνα 2-4β).

Ωστόσο, επειδή τα μορφολογικά χαρακτηριστικά στα συγκεκριμένα είδη είναι αμφιλεγόμενοι δείκτες διάκρισης, πραγματοποιήθηκε απλά καταγραφή του χρώματος του άρθρου (Μ=Μαύρο, Λ=Μαύρο με λευκή ζώνη) σε δέκα άτομα ανά πληθυσμό θεωρώντας ορθή την ταξινόμηση με βάση το φυτό ξενιστή. Αν το χρώμα δεν ήταν αντιπροσωπευτικό, πχ λόγω παραμονής για μεγάλο χρονικό διάστημα στην αλκοόλη, δεν συμπεριλαμβανόταν στα αποτελέσματα.



Εικόνα 2-4 : Λεπτομέρεια στο 1^ο άρθρο της κεραίας

- α)** Άτομο του είδους *M. melanotoma* (Λ=Μαύρο με λευκή ζώνη) και
- β)** *M. pygmaeus*(Μ=Μαύρο)

2.3 ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ

Οι πολλές ομοιότητες που παρουσιάζουν τα προς μελέτη άτομα στα μορφολογικά τους χαρακτηριστικά θα μπορούσαν να σημαίνουν ότι τελικά δεν έχουμε δύο αλλά για ένα είδος. Για τη διερεύνηση αυτής της πλευράς πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ των δύο διαφορετικών ειδών με βάση τους ξενιστές τους. Αν τελικά δώσουν γόνιμους απογόνους τότε θα πρόκειται για ένα και μόνο είδος.

Αρχικά, συλλέχτηκαν ανήλικα άτομα από τα φυτά ξενιστές ως εξής:

- *M. melanotoma*: *D. viscosa* από την περιοχή αεροδρομίου.
- *M. pygmaeus*: *S. nigrum* από την περιοχή του ΓΠΑ.

Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε πλαστικό μπουκαλάκι καλυμμένο με μουσελίνα, που περιείχε φύλλο από το αντίστοιχο φυτό. Στη βάση του φύλλου υπήρχε βαμβάκι το οποίο βρεχόταν καθημερινά, ενώ μία φορά την εβδομάδα εισάγονταν ωά του λεπιδοπτέρου *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae) (ENDOFOOD - Χαραντώνης) ως τροφή για τα άτομα, επιταχύνοντας την ανάπτυξή τους.

Στα ενήλικα άτομα ελέγχονταν και καταγραφόταν το χρώμα του πρώτου άρθρου της κεραίας. Εκείνα τα άτομα που στο άρθρο της κεραίας τους έφεραν γκρίζα περιοχή, αφήνονταν για μία μέρα ακόμα, ώστε να είναι ξεκάθαρο το χρώμα, και ύστερα συμμετείχαν στις διασταυρώσεις.

Τα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν στις διασταυρώσεις ήταν 3:

1. *D. viscosa* από την περιοχή αεροδρομίου
2. *S. nigrum* από την περιοχή του ΓΠΑ
3. *Phaseolus vulgaris* ποικιλία “ζαργάνα”

Και στα τρία είδη μπορούσε το έντομο να ολοκληρώσει τον βιολογικό του κύκλο και να δώσει γόνιμους απογόνους. Το φυτό του φασιολιού επιλέχθηκε ως ουδέτερος ξενιστής στον οποίο το έντομο, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μπορεί να δημιουργήσει αποικία. Επειδή τα φυτά πρέπει να είναι απαλλαγμένα από οποιοδήποτε έντομο, αφέθηκαν για διάστημα 10 ημερών σε προστατευμένο χώρο σε θερμοκήπιο ώστε να εκκολαφθούν και να απομακρυνθούν ωά που μπορεί να είχαν εναποτεθεί εκεί σε προηγούμενη φάση.

Έχοντας πλέον καθαρά φυτά σε γλαστράκια διαμέτρου 10cm καλυμμένα με κυλινδρική κατασκευή που αποτελούταν από πλαστικό και μουσελίνα, εισήχθησαν σε κάθε φυτό 2 θηλυκά άτομα του ενός είδους και 2 αρρενα του άλλου. Στην περίπτωση που κάποιο άτομο βρισκόταν νεκρό, αντικαθίστατο με νέο. Τα άτομα αφέθηκαν εκεί για διάστημα 40 ημερών και καθημερινά ελέγχονταν για τη ύπαρξη νέων ατόμων ατελών σταδίων. Μία φορά την εβδομάδα τροφοδοτούνταν τα φυτά με νερό και τα έντομα με ωά του *E. kuehniella*. Κάθε διασταύρωση έγινε μία ακόμα φορά. Παράλληλα,

πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ ατόμων του ίδιου είδους και στα τρία φυτά ξενιστές σε ρόλο μαρτύρων. Αναλυτικά οι διασταυρώσεις φαίνονται στον πίνακα 2-1.

		♀		
		p (M)	m (M)	m(Λ)
♂	p (M)	<i>Dittrichia viscosa</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Dittrichia viscosa</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Dittrichia viscosa</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>
	m (M)	<i>Dittrichia viscosa</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Dittrichia viscosa</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Dittrichia viscosa</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>
	m(Λ)	<i>Dittrichia viscosa</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Dittrichia viscosa</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Dittrichia viscosa</i> <i>Solanum nigrum</i> <i>Phaseolus vulgaris</i>

Πίνακας 2-1 : Διασταυρώσεις των δύο ειδών ανά φυτό ανάλογα με το φύλο και το χρώμα του πρώτου άρθρου της κεραίας τους.

p: *Macrolophus pygmaeus*,

m: *Macrolophus melanotoma*

(M): Μαύρο πρώτο άρθρο κεραίας,

(Λ): Λευκή ζώνη στο πρώτο άρθρο κεραίας

2.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΩΝ ΤΜΗΜΑΤΩΝ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA (mtDNA)

2.4-1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ DNA (DNA Extraction)

Η απομόνωση του ολικού DNA πραγματοποιήθηκε με το *DNeasy Blood and Tissue Kit* - Qiagen και ακολουθήθηκε με κάποιες παραλλαγές το πρωτόκολλο της εταιρίας σύμφωνα με το οποίο χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα και συσκευές:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- **PBS** (Phosphate Buffered Saline), το οποίο παρασκευάστηκε με το πρωτόκολλο που ακολουθεί:

Ζυγίζονται οι παρακάτω ποσότητες αλάτων:

- 8gr χλωριούχο νάτριο (Sodium chloride) - Merck
- 0,2gr χλωριούχο κάλιο (Kalium chloride) - Merck
- 1,44gr δισόξινο φωσφορικό νάτριο (Disodium phosphate) - Merck
- 0,24gr δισόξινο φωσφορικό κάλιο (Potassium phosphate) - Merck

και προστίθενται σε 800ml απιονισμένου νερού (d H₂O). Ακολουθεί σταθεροποίηση του pH στο 7,4 με τη βοήθεια υδροχλωρικού οξέος (HCl) και προσθήκη d H₂O μέχρι του ενός λίτρου. (Sambrook *et al*, 1989).

- **Πρωτεΐνάση K**, DNeasy Blood and Tissue Kit (50) - Qiagen
- **Διάλυμα AL**, DNeasy Blood and Tissue Kit (50) - Qiagen
- Καθαρή **αιθανόλη** C₂H₅OH (ethanol) - Merck
- **Διάλυμα AW1**, DNeasy Blood and Tissue Kit (50) - Qiagen
- **Διάλυμα AW2**, DNeasy Blood and Tissue Kit (50) - Qiagen
- **Διάλυμα AE**, DNeasy Blood and Tissue Kit (50) - Qiagen

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- **Κλίβανος** αποστείρωσης, Koch - Pbi International
- **Αποστακτήρας νερού**, Nova 4 - Jencons
- **Ζυγός ακριβείας**, 100-3 - Kern
- **Μαγνητικός Αναδευτήρας**, MS-3000 - HVD Life Sciences
- **Συσκευή στροβιλίσματος**, Top mix 11118 - Fisherbra
- **Πεχάμετρο**, Consort C860 - Crison micro PH, Controla AC

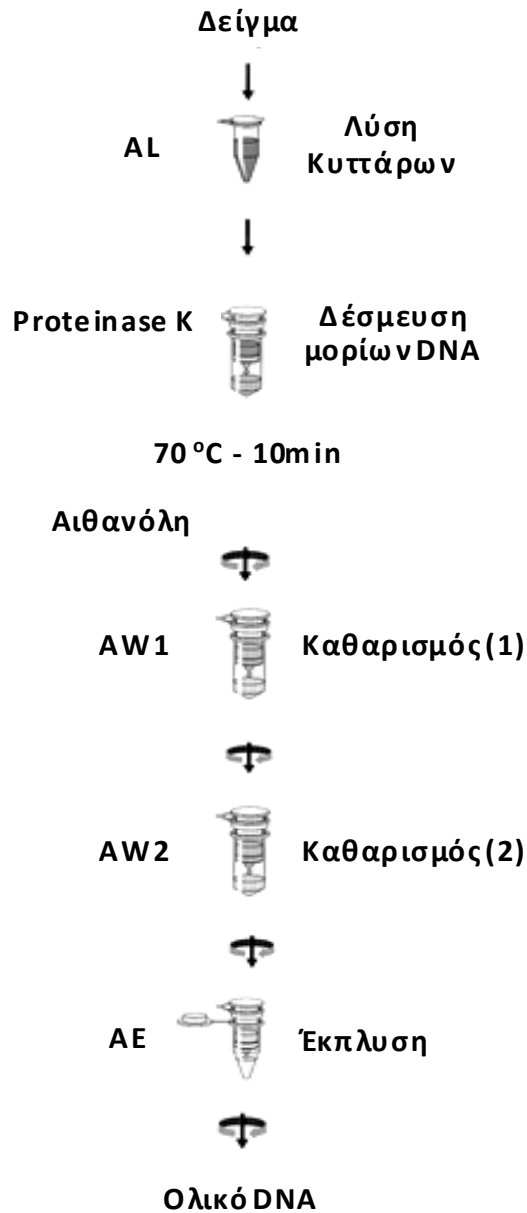
- ◆ **Υδατόλουτρο** - Memmert
- ◆ **Πιπέττες** τύπου erpendorf
- ◆ **Erpendorfs**
- ◆ **Ράβδος** ομογενοποίησης
- ◆ **Φίλτρα και στήλες**, DNeasy Blood and Tissue Kit (50) - Qiagen
- ◆ **Φυγόκεντρος**, Iec Micromax Microcentrifuge (ventilated) M.3591 - Thermo Electron Corporation
- ◆ **Καταψύκτης**, GSV22V20 - Bosch
- ◆ **Ψυγείο**, RN110 CE - Voxson

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η απομόνωση DNA γινόταν απευθείας για τα άτομα που βρίσκονταν στους -20°C . Αντίθετα, για εκείνα τα δείγματα που είχαν διατηρηθεί σε αλκοόλη η διαδικασία περιελάμβανε ένα επιπλέον στάδιο. Συγκεκριμένα, παρέμεναν για 5 λεπτά σε υδατόλουτρο με θερμοκρασία 70°C ώστε να απομακρυνθεί και η παραμικρή ποσότητα αλκοόλης, που πιθανώς να δημιουργούσε προβλήματα στη συνέχεια. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 5-7 άτομα ανά πληθυσμό.

Αρχικά, πραγματοποιήθηκε ομογενοποίηση του δείγματος - εντόμου χρησιμοποιώντας το διάλυμα ομογενοποίησης ιστών (PBS). Έπειτα, προστέθηκε το διάλυμα που οδηγούσε στη λύση των κυττάρων (AL) και ποσότητα πρωτεΐνάσης K, η οποία δέσμευε τα μόρια DNA που υπήρχαν στο διάλυμα. Το περιεχόμενο του erpendorf ανακινήθηκε και τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 70°C για 10 λεπτά. Στη συνέχεια, εισήχθη αιθανόλη και ακολούθησε ανακίνηση και εισαγωγή του ολικού διαλύματος σε φίλτρο – στήλη, που περιέχονταν στο kit. Ύστερα από φυγοκέντρηση απορρίφθηκε το υποκείμενο διάλυμα.

Στην επόμενη φάση προστέθηκαν τα διαλύματα καθαρισμού ακολουθούμενα από φυγοκεντρήσεις και απορρίψεις του υποκείμενου διαλύματος ανά περίπτωση. Το φίλτρο τοποθετήθηκε σε νέο erpendorf, προστέθηκε το διάλυμα έκπλυσης (AE) και αφέθηκε για μικρό χρονικό διάστημα σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να απομακρυνθεί πιθανή ποσότητα αιθανόλης. Ύστερα από μία τελευταία φυγοκέντρηση, συλλέχθηκε το υποκείμενο διάλυμα το οποίο και περιελάμβανε το ολικό απομονωμένο DNA. Αυτό διατηρούταν σε θερμοκρασία των -20°C για περαιτέρω χρήση. Στην εικόνα που ακολουθεί περιγράφεται συνοπτικά η διαδικασία της απομόνωσης DNA (Εικόνα 2-5).



Εικόνα 2-5: Η διαδικασία απομόνωσης DNA [Επεξεργασμένη εικόνα από το εγχειρίδιο του kit]

2.4-2 ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (Polymerase Chain Reaction - PCR)

Για την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα και οι συσκευές που ακολουθούν:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ◆ Αποστειρωμένο **H₂O** [Ultra pure water] - Biochrom AG
- ◆ Διάλυμα χλωριούχου μαγνησίου [50mM **MgCl₂**] - Invitrogen
- ◆ Διάλυμα τριφωσφο-δεσοξυριβονουκλεοτιδίων [2mM (**dNTPs**: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Nucleotide solution mix] - BioLabs
- ◆ **Ρυθμιστικό διάλυμα** [10x PCR buffer -MgCl₂] - Invitrogen
- ◆ Δύο ζεύγη **εκκινητών** 100μM (primers):
 1. Ζεύγος εκκινητών (Folmer *et al*, 1994).

5' - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'

5' - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3'
 2. Ζεύγος εκκινητών (Palumbi *et al*, 1991).

5' - AAA CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA T - 3'

5' - GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT - 3'
- ◆ **Taq DNA πολυμεράση** [Taq DNA Polymerase] – Invitrogen
- ◆ Απομονωμένο **DNA** των εντόμων *M. pygmaeus* ή *M. melanotoma* που έχει ληφθεί με την διαδικασία που περιγράφεται πιο πάνω

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ◆ **Κλίβανος** αποστείρωσης, Koch - Pbi International
- ◆ **Παγομηχανή**, Laser KF 35 - Migel Iceline
- ◆ **Καταψύκτης**, GSV22V20 - Bosch
- ◆ **Eppendorfs**
- ◆ **PCR tubes**
- ◆ **Πιπέττες** τύπου erpendorf
- ◆ **Θερμοκυκλοποιητής** (PCR machine), Primus Advanced 25 - Peqlab
- ◆ **Ψυγείο**, RN110 CE - Voxson

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Η μέθοδος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης αποτελεί τρόπο επιλογής και δημιουργίας μεγάλου αριθμού αντιγράφων μίας συγκεκριμένης νουκλεοτιδικής αλυσίδας χωρίς να εμπλέκεται ζωντανός ιστός ή κύτταρο (*in vitro*). Σκοπός είναι να

δημιουργηθεί ικανή ποσότητα αντιγράφων των τμημάτων που επιθυμούμε να μελετηθούν.

Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικά ζεύγη εκκινητών (primers):

- Ζεύγος εκκινητών οι οποίοι οριοθετούν γονιδιακό τμήμα (περίπου 700bp) που ελέγχει τη σύνθεση της υπομονάδας I του συμπλόκου της κυτοχρωμικής οξειδάσης (COI) - BioLabs. Η διαμεμβρανική αυτή πρωτεΐνη των μιτοχονδρίων συμμετέχει στη μεταφορά ιόντων εντός και εκτός του οργανιδίου, επιτρέποντας την ομαλή εξέλιξη της αναπνοής και της παραγωγής ενέργειας (Folmer *et al*, 1994).

5' - GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'

5' - TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3'

- Ζεύγος εκκινητών που προσδιορίζουν εκείνο το γονιδιακό τμήμα (περίπου 400bp) το οποίο ελέγχει τη σύνθεση της μικρής υπομονάδας του ριβοσώματος (12sr) - BioLabs. Η άρτια κατασκευή των ριβοσωμάτων αποτελεί σημαντική διαδικασία καθώς συμμετέχουν και επηρεάζουν άμεσα την πρωτεϊνοσύνθεση (Palumbi *et al*, 1991).

5' - AAA CTG GGA TTA GAT ACC CCA CTA T - 3'

5' - GAG GGT GAC GGG CGG TGT GT - 3'

Τα διάφορα διαλύματα χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές ποσότητες ανάλογα με το ζεύγος εκκινητών:

- Για τους εκκινητές της κυτοχρωμικής οξειδάσης (ανά δείγμα)

Αντιδραστήριο	Ρόλος	Όγκος (μL)
H ₂ O		32,7
MgCl ₂ (50mM)	δρα ως προσθετική ομάδα	3
dNTPs (2mM)	πρώτη ύλη για σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	5
buffer	ευνοεί τη δράση της Taq πολυμεράσης	5
primer 1 (10μM)	προσδιορισμός θέσης έναρξης σύνθεσης DNA	0,5
primer 2 (10μM)	προσδιορισμός θέσης έναρξης σύνθεσης DNA	0,5
Taq πολυμεράση	ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες	0,3
Σύνολο		(47)
DNA		3
Γενικό Σύνολο		50

- Για τους εκκινητές της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (ανά δείγμα)

Αντιδραστήριο	Ρόλος	Όγκος (μL)
H ₂ O		30,5
MgCl ₂ (50mM)	δρα ως προσθετική ομάδα	5
dNTPs (2mM)	πρώτη ύλη για σύνθεση νέων αλυσίδων DNA	5
buffer	ευνοεί τη δράση της Taq πολυμεράσης	5
primer 1 (20μM)	προσδιορισμός θέσης έναρξης σύνθεσης DNA	0,5
primer 2 (20μM)	προσδιορισμός θέσης έναρξης σύνθεσης DNA	0,5
Taq πολυμεράση	ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες	0,48
Σύνολο		(47)
DNA		3
Γενικό Σύνολο		50

Σε κάθε περίπτωση αναμίχθηκαν οι αντίστοιχες ποσότητες των αντιδραστηρίων και έπειτα εισήχθη η ποσότητα του απομονωμένου DNA. Στη συνέχεια τα tubes τοποθετήθηκαν στον θερμοκυκλοποιητή (PCR machine) όπου εφαρμόστηκε διαφορετικό πρόγραμμα σε κάθε περίπτωση εκκινητών. Το βασικό χαρακτηριστικό της συσκευής αυτής είναι η ικανότητά της να διατηρεί σταθερές θερμοκρασίες για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα που έχει οριστεί από τον χρήστη. Ο συνδυασμός των παραγόντων θερμοκρασία και χρόνος στο πείραμα αυτό παρουσιάζονται αναλυτικά στη συνέχεια.

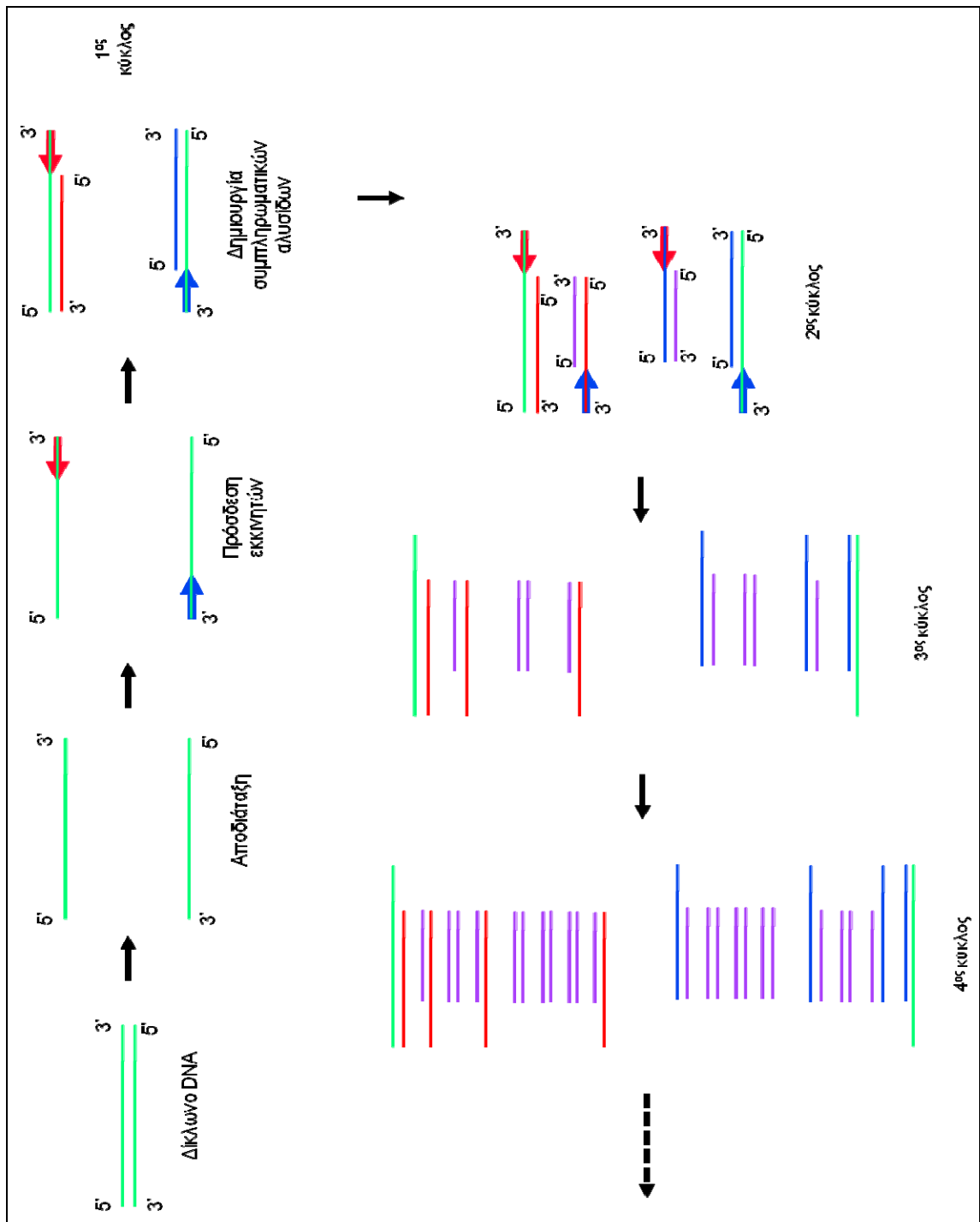
- Για τους εκκινητές της κυτοχρωμικής οξειδάσης:

1 X	94°C για 1min	
	94°C για 1min	Αποδιάταξη (denaturation)
6 X	45°C για 1min και 30sec	Υβριδισμός (annealing)
	72°C για 1min και 15sec	Επιμήκυνση (extension)
	94°C για 1min	Αποδιάταξη (denaturation)
36 X	51°C για 1min και 30sec	Υβριδισμός (annealing)
	72°C για 1min και 15sec	Επιμήκυνση (extension)
1 X	72°C για 5min	

• Για τους εκκινητές της μικρής ριβοσωμικής υπομονάδας (ανά δείγμα):

1 X	94°C για 4min	
35 X	94°C για 1min	Αποδιάταξη (denaturation)
	44°C για 1min	Υβριδισμός (annealing)
	72°C για 2min	Επιμήκυνση (extension)
1 X	72°C για 6min	

Η αύξηση της θερμοκρασίας ευνοεί την αποδιάταξη (denaturation) των δύο κλώνων του μιτοχονδριακού DNA, ενώ η μείωσή της την πρόσδεση των εκκινητών στα συμπληρωματικά τους σημεία (annealing). Η θερμοκρασία των 72°C βοηθά την Taq πολυμεράση να τοποθετήσει στις κατάλληλες θέσεις τα ολιγονουκλεοτίδια που έχουν προστεθεί στο διάλυμα, επιμηκύνοντας τις νέες αλυσίδες (extension). Δημιουργούνται με αυτόν τον τρόπο συμπληρωματικές αλυσίδες και τελικά πολλά αντίγραφα του συγκεκριμένου γονιδιακού τμήματος (Εικόνα 2-6) (Mullis and Faloona, 1987).



Εικόνα 2-6: Απεικόνιση σταδίων της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR)

Μετά το τέλος της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης τα δείγματα τοποθετούνταν στο ψυγείο (4°C) και ακολουθούσε ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης, όπως αυτή περιγράφεται στο επόμενο κεφάλαιο.

2.4-3 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΗΓΜΑΤΟΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ (Agarose Gel Electrophoresis)

Για την τεχνική της ηλεκτροφόρησης με πήγμα αγαρόζης χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα και συσκευές:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

- ◆ Απεσταγμένο H_2O
- ◆ Ρυθμιστικό **διάλυμα 3X TBE** (Tris/Borate/EDTA), το οποίο παρασκευάστηκε με το πρωτόκολλο που ακολουθεί:

Ζυγίζονται οι παρακάτω ποσότητες αλάτων:

- 4,48gr EDTA (disodium salt dihydrate) - Applichem BioChemica
- 0,48gr καυστικό νάτριο (Sodium hydroxide) - Merck
- 64,8gr Tris ultrapure - Applichem BioChemica
- 33gr Boric Acid - Applichem BioChemica

και προστίθενται σε 400ml απιονισμένου νερού (d H_2O). Ακολουθεί ανάδευση έως ότου διαλυθούν τα άλατα και προσθήκη d H_2O ώστε το συνολικό διάλυμα να έχει όγκο 2L (Sambrook *et al*, 1989).

- ◆ Ρυθμιστικό **διάλυμα 0,5X TBE** (Tris/Borate/EDTA), το οποίο προκύπτει μετά από σχετική αραίωση του TBE 3X με απεσταγμένο νερό
- ◆ Σκόνη **αγαρόζης** [Agarose electroforisis grade] - Invitrogen
- ◆ **Διάλυμα φόρτωσης** [Loading buffer DNA IV] - Applichem BioChemica
- ◆ **PCR Μάρτυρας** (100bp DNA Ladder) - BioLabs
- ◆ Βρωμιούχο αιθίδιο (Ethidiumbromide 1%) - Applichem BioChemica

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ◆ **Κλίβανος αποστείρωσης**, Koch - Pbi International
- ◆ **Αποστακτήρας** νερού, Nova 4 - Jencons
- ◆ **Ζυγός ακριβείας**, 100-3 - Kern
- ◆ **Φούρνος μικροκυμάτων**, WP700s117-2 - Greenpoint
- ◆ **Πιπέττες** τύπου erpendorf
- ◆ **Eppendorfs**
- ◆ **Μήτρα σταθεροποίησης gel**
- ◆ **Συσκευή Οριζόντιας Ηλεκτροφόρησης**
- ◆ **Τροφοδοτικό**, Consort EV 265
- ◆ **Ηλεκτροφοριστική συσκευή** διαστάσεων 28X29X9 cm³, CSSU2515 Classic (TM) - Thermo Electron Corporation

- ◆ **Οδοντωτή μήτρα** 25 θέσεων (7mm)
- ◆ **Δοχείο** διαστάσεων 25X17X7 cm³
- ◆ **Συσκευή ανακίνησης (Rocker)**, ST(5) – CAT
- ◆ **Gel Documentation System**
- ◆ **Συσκευή Υπεριώδους Ακτινοβολίας**, ETX-20M - Vilber lourmat
- ◆ **Κάρτα μνήμης 128 MB** - Kingston
- ◆ **USB Card reader** - Trascend
- ◆ **Καταψύκτης**, GSV22V20 - Bosch
- ◆ **Ψυγείο**, RN110 CE - Voxson

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Για τον έλεγχο του απομονωμένου DNA και των προϊόντων της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 2% (Sambrook *et al*, 1989). Το πήγμα (gel) αφέθηκε στη μήτρα έως ότου κρυσώσει και σταθεροποιηθεί, δηλαδή για περίπου 30 λεπτά.

Στη συνέχεια το gel τοποθετήθηκε στην οριζόντια συσκευή ηλεκτροφόρησης και οι θέσεις φόρτισης (πηγαδάκια) πληρώθηκαν με το μίγμα των προϊόντων PCR και του διαλύματος φόρτωσης (loading buffer). Ο λόγος που χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα φόρτισης ήταν για να ελέγχεται η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης. Επιπλέον, προστέθηκε ποσότητα του μάρτυρα (PCR marker) αναμεμιγμένη με ποσότητα χρωστικής, αντίστοιχα με το προϊόν PCR και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση με την εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου σταθερής τάσης 110V, για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά.

Έπειτα το gel τοποθετήθηκε σε δοχείο που περιείχε απεσταγμένο νερό και φθορίζουσα ουσία (βρωμιούχο αιθίδιο), η οποία έχει την ιδιότητα να δημιουργεί σύμπλοκο με τα μόρια του DNA και να είναι εμφανές όταν υποστεί υπεριώδη ακτινοβολία. Το δοχείο ανακινήθηκε με τη βοήθεια συσκευής ανακίνησης όπου παρέμενε για 20-30 λεπτά, χρόνος αρκετός ώστε να υπάρξει σύμπλοκο, και με ρυθμό ανακίνησης στις 37 στροφές ανά λεπτό. Τέλος, το gel φωτογραφήθηκε στην τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας.

2.4-4 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΟΪΟΝΤΟΣ PCR (PCR Purification)

Το επόμενο στάδιο αφορά τον καθαρισμό του προϊόντος της διαδικασίας της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Σε αυτό απομακρύνονται όλα τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν προηγούμενα με στόχο να παραμείνει μόνο το τμήμα του DNA

του οποίου η αλληλουχία θα προσδιοριστεί. Στη φάση αυτή χρησιμοποιήθηκε το *NucleoSpin Extract II kit* - Macherey-Nagel και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο της εταιρίας σύμφωνα με το οποίο συμμετείχαν τα παρακάτω διαλύματα και συσκευές:

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

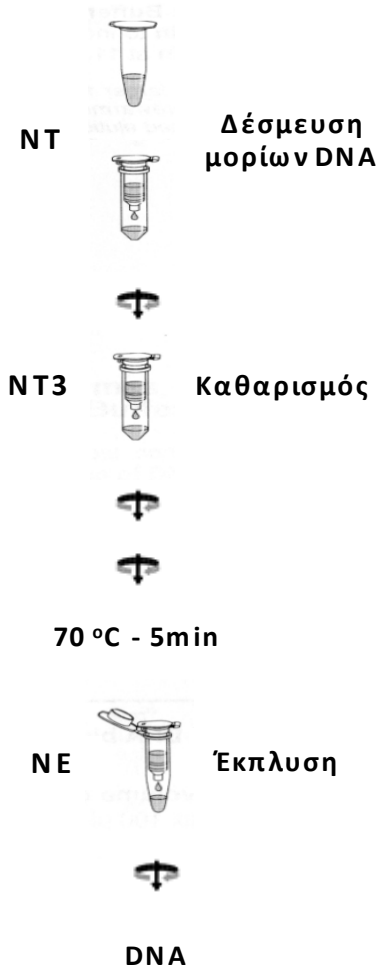
- ◆ Προϊόν PCR,
- ◆ Διάλυμα NT, NucleoSpin Extract II kit - Macherey-Nagel
- ◆ Διάλυμα NT₃, NucleoSpin Extract II kit - Macherey-Nagel
- ◆ Διάλυμα NE, NucleoSpin Extract II kit - Macherey-Nagel

ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- ◆ Κλίβανος αποστείρωσης, Koch - Pbi International
- ◆ Αποστακτήρας νερού, Nova 4 - Jencons
- ◆ Υδατόλουτρο, Memmert
- ◆ Πιπέττες τύπου erpendorf
- ◆ Erpendorfs
- ◆ Φίλτρα και στήλες, NucleoSpin Extract II kit - Macherey-Nagel
- ◆ Φυγόκεντρος, Iec Micromax Microcentrifuge (vertilated) M.3591 - Thermo Electron Corporation
- ◆ Καταψύκτης, GSV22V20 - Bosch
- ◆ Ψυγείο, RN110 CE - Voxson

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Αρχικά, προστέθηκε το διάλυμα δέσμευσης των μορίων DNA που συντέθηκαν κατά την αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (NT), στο προϊόν της PCR το οποίο έχει απομείνει μετά από την ηλεκτροφόρηση. Το συνολικό διάλυμα εισήχθη σε φίλτρο και κολώνα που περιέχονται στο kit και πραγματοποιήθηκε φυγοκέντρηση. Το υποκείμενο διάλυμα απορρίφθηκε και εισήχθη το διάλυμα καθαρισμού (NT₃). Ακολούθησε φυγοκέντρηση για δύο φορές κι έπειτα τοποθετήθηκε στο υδατόλουτρο στους 70°C για 5 λεπτά. Τέλος, ακολούθησε εισαγωγή του διαλύματος έκπλυσης (NE), φυγοκέντρηση και διατήρηση του υποκείμενου διαλύματος. Αυτό περιείχε την αλληλουχία των νεοκλεοτιδίων που θέλαμε να μελετήσουμε και διατηρούταν στη θερμοκρασία των -20°C. Στην εικόνα που ακολουθεί περιγράφεται συνοπτικά η διαδικασία του καθαρισμού του προϊόντος PCR (Εικόνα 2-7).



Εικόνα 2-7: Η διαδικασία καθαρισμού του προϊόντος της PCR
 [Επεξεργασμένη εικόνα από το εγχειρίδιο του kit]

2.4-5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΟΤΙΔΙΚΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ (DNA Sequencing)

Για να προσδιοριστεί η προς εξέταση αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, τα καθαρά προϊόντα της PCR στέλνονταν στην εταιρία *Macrogen, Inc*. Η όλη διαδικασία βασίζεται σε μία μέθοδο που έχει αναπτυχθεί από τους *Sanger et al* και η οποία πλεονεκτεί σε χρόνο και ακρίβεια συγκριτικά με τις υπόλοιπες (*Sanger et al, 1977; Sanger & Coulson, 1975*). Σύμφωνα με αυτή οι δύο κλώνοι του DNA ανοίγουν και δημιουργούνται δύο μονόκλιωνα μόρια. Έπειτα, χρησιμοποιούνται ο ίδιοι συνήθως εκκινητές με την Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR) και με τη συμμετοχή πολυμεράσης και ολιγονουκλεοτιδίων, παράγονται αντίγραφα των αρχικών μορίων.

Εισάγοντας διδεοξυνουκλεοτίδιο καταστέλλεται η αντιγραφή σε συγκεκριμένη νουκλεοτιδική αλληλουχία, καθώς λόγω απουσίας υδροξυλίου στη θέση 3' της 2-δεοξυριβόζης το διδεοξυνουκλεοτίδιο δε μπορεί να αναπτύξει φωσφοδιεστερικό δεσμό με το επόμενο νουκλεοτίδιο. Τα τελικά τμήματα DNA εμπλέκονται περαιτέρω σε διαδικασία ραδιοσήμανσης, ηλεκτροφόρησης και αυτοραδιογραφίας.

2.4-6 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Με την παραλαβή των αποτελεσμάτων πραγματοποιούταν έλεγχος των αλληλουχιών (βάση προς βάση) με το πρόγραμμα *FinchTV v.1.4.0* (Geospiza) κι ακολούθως συστοίχισή τους καταφεύγοντας στην ηλεκτρονική βάση δεδομένων *GenBank* του *NCBI* (Altschul *et al*, 1990). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιώντας την εφαρμογή *BLAST* (Basic Local Alignment Search Tool), συγκρινόντουσαν οι αλληλουχίες που λαμβάνονταν με ήδη κατατεθειμένες στη βάση δεδομένων. Έτσι, υπήρχε έλεγχος του γονιδιακού τμήματος του οποίου η αλληλουχία προσδιορίστηκε. Αν το ποσοστό ταύτισης ήταν μικρότερο του 90% οι αλληλουχίες απορρίπτοναν και δε συμμετείχαν στην περαιτέρω στατιστική επεξεργασία.

Στη συνέχεια, για την ευθυγράμμιση των αλληλουχιών χρησιμοποιήθηκε το υπολογιστικό πακέτο *CLUSTAL W2* (Thomson *et al*, 1994). Επιπλέον, με το πρόγραμμα *DnaSP 5.10* (Librado and Rozas, 2009) εκτιμήθηκαν οι απλότυποι και οι θέσεις που παρουσιάζονται οι διαφορές στους πληθυσμούς των δύο ειδών ανά γονίδιο. Ο απλότυπος αναφέρεται στο σύνολο των αλληλόμορφων γονιδίων ενός ατόμου και στην εγγενή αναπαραγωγή μπορεί να δώσει πληροφορίες για τους γονείς ενός πληθυσμού, καθώς κάθε άτομο έχει ένα αλληλόμορφο από κάθε γονέα (γονότυπος). Αξίζει να αναφερθεί ότι μετάλλαξη ακόμα και σε ένα νουκλεοτίδιο δίνει διαφορετικό απλότυπο.

Με το στατιστικό πακέτο *Mega v. 4.0.0* (Kumar *et al*, 2004) συγκεντρώθηκαν πληροφορίες για τις γενετικές αποστάσεις των πληθυσμών και των ειδών για τα δύο γονιδιακά τμήματα. Ακόμα, δημιουργήθηκαν διάφορα φυλογενετικά δένδρα, τα οποία έδωσαν καλύτερη εικόνα των αποτελεσμάτων. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή τους ήταν της ελάχιστης εξέλιξης (Rzhetsky and Nei, 1993), της μέγιστης φειδωλότητας (Saitou and Imanishi, 1989) και του Neighbour-Joining (μήτρες απόστασης) (Saitou and Nei, 1987), που αναλύονται και στην παράγραφο 2.4-7 που ακολουθεί.

2.4-7 ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΦΥΛΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΔΕΝΔΡΩΝ

Τα φυλογενετικά δένδρα είναι διαγράμματα που απεικονίζουν τις σχέσεις που μπορεί να υπάρχουν μεταξύ οργανισμών, όπως αυτές διαμορφώνονται μέσα από τη θεωρία της εξέλιξης. Οι αποστάσεις που υπάρχουν μεταξύ διαφορετικών ομάδων, όπως αυτές υποδηλώνονται από τους κλάδους των δένδρων, υποδεικνύουν το κατά πόσο σχετίζεται μία ομάδα με μία άλλη (Baum and Offner, 2008). Δίνουν μία εικόνα για πιθανή κοινή καταγωγή με βάση μορφολογικά χαρακτηριστικά, γονιδιακές αλληλουχίες κλπ.

Η κατασκευή των φυλογενετικών δένδρων βασίζεται σε μία σειρά από αλγόριθμους οι οποίοι εκτελούνται από τις διάφορες ηλεκτρονικές εφαρμογές. Κάθε αλγόριθμος χρησιμοποιεί διαφορετικά χαρακτηριστικά των πληθυσμών που συγκρίνονται, δίνοντας έτσι και διαφορετικό δένδρο. Υπάρχουν τέσσερις μεγάλες κατηγορίες μεθόδων κατασκευής δένδρων (Penny *et al*, 1992):

1. Μέθοδοι Μητρών Απόστασης - Distance Matrix Methods
2. Μέθοδοι Φειδωλότητας - Maximum Parsimony Methods
3. Μέθοδοι Μεγίστης Πιθανοφάνειας - Maximum Likelihood Methods
4. Μέθοδοι Ελάχιστης Εξέλιξης - Minimum Evolution Methods

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΗΤΡΩΝ ΑΠΟΣΤΑΣΗΣ - Distance Matrix Methods

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή υπολογίζονται οι γενετικές αποστάσεις πολλαπλών γονιδιακών αλληλουχιών χρησιμοποιώντας ως αρχικό στοιχείο τη θέση των βάσεων στα γονιδιακά τμήματα που εξετάζονται. Οι συγκρίσεις γίνονται ανά δύο αλληλουχίες σύμφωνα με μία αρχική μήτρα που έχει προσδιοριστεί από συγκεκριμένο αλγόριθμο. Ακολουθούν οι μέθοδοι μητρών απόστασης που χρησιμοποιούνται περισσότερο.

- **Μέθοδος UPGMA** (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages – Μη Σταθμισμένη Σύνδεση ανά Ομάδα Ζευγών βάσει του Αριθμητικού Μέσου) (Sneath and Sokal, 1973)

Αποτελεί την πιο απλή μέθοδο κατασκευής δέντρων και ενώ αρχικά λειτουργούσε με βάση μορφολογικά στοιχεία, έπειτα χρησιμοποιήθηκαν και σε γονιδιακές αλληλουχίες. Σε πρώτη φάση γίνεται μία πρόχειρη καταγραφή της απόστασης μεταξύ των αλληλουχιών από το εκάστοτε στατιστικό πακέτο και δημιουργείται ένας αλγόριθμος. Εκείνες οι αλληλουχίες που έχουν περισσότερα κοινά σημεία επιλέγονται και μπαίνουν αρχικά στο δένδρο. Έπειτα δημιουργείται νέα μήτρα με τις επόμενες αλληλουχίες που μοιάζουν περισσότερο μεταξύ τους και σταδιακά, με τον ίδιο τρόπο και ανάλογα με το

πόσο απέχουν, προστίθενται και οι υπόλοιπες. Έτσι, στο τέλος προκύπτει ένα δένδρο με εξελικτική συμμετρία, το οποίο έχει πάντα ρίζα.

◆ **Μέθοδος Neighbor-Joining** (Saitou and Nei, 1987)

Όπως και στην προηγούμενη μέθοδο, έτσι κι εδώ χρησιμοποιείται αρχικά μία μήτρα-αλγόριθμος που βασίζεται στις ομοιότητες των εξεταζόμενων αλληλουχιών και επομένως στις γενετικές αποστάσεις των οργανισμών που αντιπροσωπεύουν. Τα διαφορετικά εμπλεκόμενα στοιχεία διατάσσονται όλα μαζί σε ένα πολύπλοκο δένδρο και ύστερα ανάλογα με τις μεταξύ τους αποστάσεις παίρνουν καλύτερη και έπειτα από συνδυασμούς την τελική τους θέση. Στο τελικό φυλογενετικό δένδρο οι επιμέρους κλάδοι έχουν μήκος που είναι το ελάχιστο δυνατό (Simonsen *et al*, 2008).

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΦΕΙΔΩΛΟΤΗΤΑΣ - Maximum Parsimony Methods

Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή υπολογίζονται οι γενετικές αποστάσεις διαφορετικών γονιδιακών αλληλουχιών. Δίνει καλύτερα αποτελέσματα και εικόνα για πληθυσμούς που βρίσκονται πολύ κοντά εξελικτικά ως προς τον γενετικό τους κώδικα, όπως για είδη και φυλές οργανισμών. Για τον σχηματισμό των δένδρων εστιάζει κυρίως στις θέσεις των αλληλουχιών DNA που υπάρχουν τακτικές διαφορές σε περισσότερες των δύο περιπτώσεων. Το τελικό δένδρο που προκύπτει περιλαμβάνει τις ελάχιστες διαφοροποιήσεις σε εξελικτικούς χαρακτήρες. Η μέθοδος αυτή αφορά δέντρα χωρίς ρίζα και περιλαμβάνει τις περιπτώσεις Wagner (Kluge and Farris, 1969) και Dollo (Farris, 1977).

ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΓΙΣΤΗΣ ΠΙΘΑΝΟΦΑΝΕΙΑΣ - Maximum Likelihood Methods

Στις πιο σύγχρονες μελέτες χρησιμοποιείται για την κατασκευή φυλογενετικών δένδρων το κριτήριο της μέγιστης πιθανότητας που μπορεί να υπάρχει για να ισχύει ο τρόπος σύνταξης των δεδομένων στο δένδρο στα πλαίσια της εξέλιξης. Με αυτές τις μεθόδους κατασκευάζεται ένα δέντρο και μετά επιλέγεται το μήκος του κλάδου, έτσι ώστε να μεγιστοποιηθεί η πιθανότητα των δεδομένων που δίνουν το συγκεκριμένο δέντρο. Δημιουργούνται δηλαδή περισσότερα του ενός πιθανά δένδρα και στο τέλος επιλέγεται εκείνο με τη μεγαλύτερη πιθανότητα και άρα αυτό που εκτιμά καλύτερα την παρούσα ή και μελλοντική κατάσταση, με βάση την εξέλιξη (Saitou and Imanishi, 1989).

ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΛΑΧΙΣΤΗΣ ΕΞΕΛΙΞΗΣ - Minimum Evolution Methods

Μία άλλη μέθοδος που χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια για την κατασκευή φυλογενετικών δένδρων είναι αυτή της ελάχιστης εξέλιξης (Rzhetsky and

Nei, 1993). Βασίζεται στην υπόθεση ότι όσο πιο μικρό το μήκος των κλάδων ενός δένδρου, τόσο πιο κοντά στην παραγματικότητα βρίσκεται. Το μέγεθος των κλάδων εκτιμάται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Έχει κοινά με την μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) και γι' αυτό τις περισσότερες φορές τα δένδρα που προκύπτουν ομοιάζουν μεταξύ τους. Διαφορές εντοπίζονται μόνο όταν ο αριθμός των πληθυσμών που συγκρίνονται είναι μεγάλος (Takahashi and Nei, 2000). Το βασικό του μειονέκτημα είναι ότι η επεξεργασία του αλγόριθμου και των αλληλουχιών από το πρόγραμμα απαιτεί μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τις άλλες περιπτώσεις και μάλιστα αυτός είναι μεγαλύτερος όσο αυξάνεται ο αριθμός των αλληλουχιών.

3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ – ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Το μορφολογικό χαρακτηριστικό που εξετάστηκε αφορούσε το χρώμα του πρώτου άρθρου της κεραίας. Εξετάστηκαν 50 άτομα που είχαν συλλεχθεί από φυτά της οικογένειας Solanaceae (*M. pygmaeus*) και 50 άτομα από το φυτό *Dittrichia viscosa* (*M. melanotoma*). Σε τρία άτομα *M. pygmaeus* από τον πληθυσμό της Ισπανίας που είχαν παραμείνει στην αλκοόλη, το άρθρο της κεραίας είχε χάσει το χρώμα του και δεν χρησιμοποιήθηκε ως παρατήρηση.

Το μαύρο άρθρο ήταν χαρακτηριστικό στο *M. pygmaeus*, ενώ στο άλλο είδος υπήρχαν και οι δύο χρωματικοί τύποι. Τα αποτελέσματα σε συνδυασμό με το φύλο των ατόμων συνοψίζονται στους πίνακες 3-1, 3-2 και τα διαγράμματα 3-1, 3-2.

<i>Macrolophus pygmaeus</i>					
	Φύλο	Κεραία		Φύλο	Κεραία
Χαλκίδα	A	M	Ισπανία	Θ	M
	A	M		Θ	M
	A	M		A	M
	A	M		Θ	M
	A	M		A	M
	A	M		Θ	M
	Θ	M		A	M
	Θ	M		Θ	M
	Θ	M		A	M
	Θ	M		A	M
ΓΠΑ	A	M	Κρήτη	Θ	M
	A	M		Θ	M
	A	M		A	M
	A	M		A	M
	Θ	M		A	M
	A	M		Θ	M
	Θ	M		Θ	M
	Θ	M		Θ	M
	Θ	M		A	M
	Θ	M		Θ	M

Κυπαρισσία	A	M	Κυπαρισσία	A	M
	A	M		Θ	M
	Θ	M		Θ	M
	A	M		Θ	M
	A	M		Θ	M

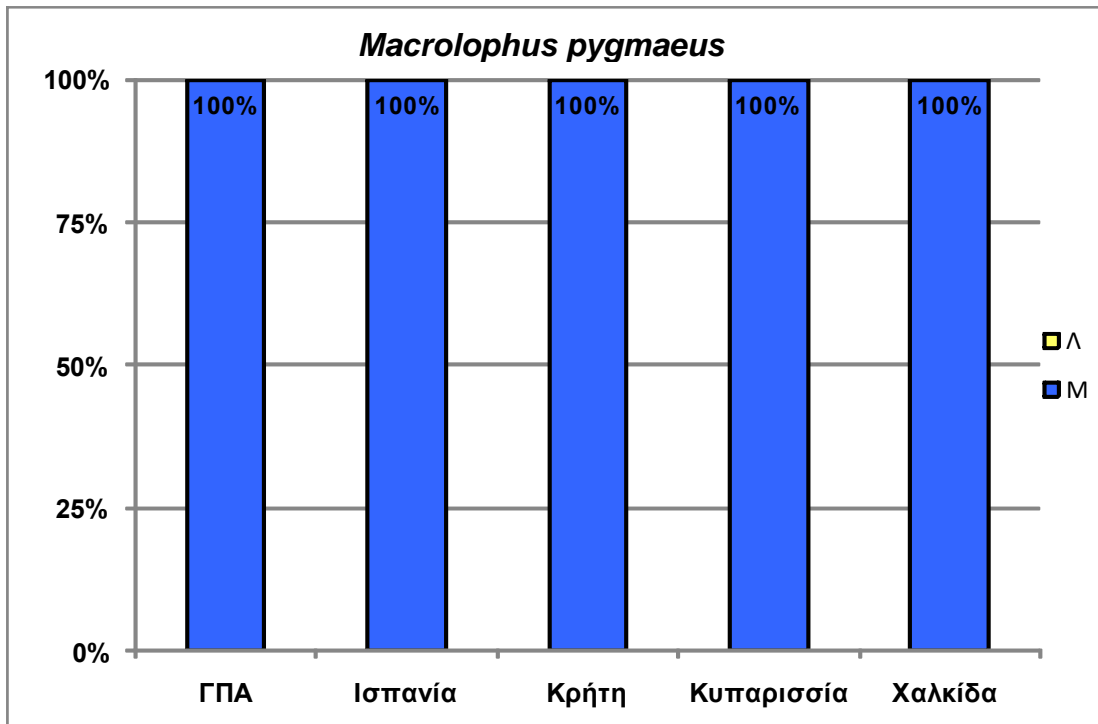
Πίνακας 3-1 : Στοιχεία φύλου και χρώματος 1^{ου} άρθρου κεραίας του αρπακτικού *Macrolophus pygmaeus*.

(A = Αρσενικό, Θ = Θηλυκό, M = Μαύρο άρθρο, Λ = Παρεμβολή λευκής ζώνης στο άρθρο)

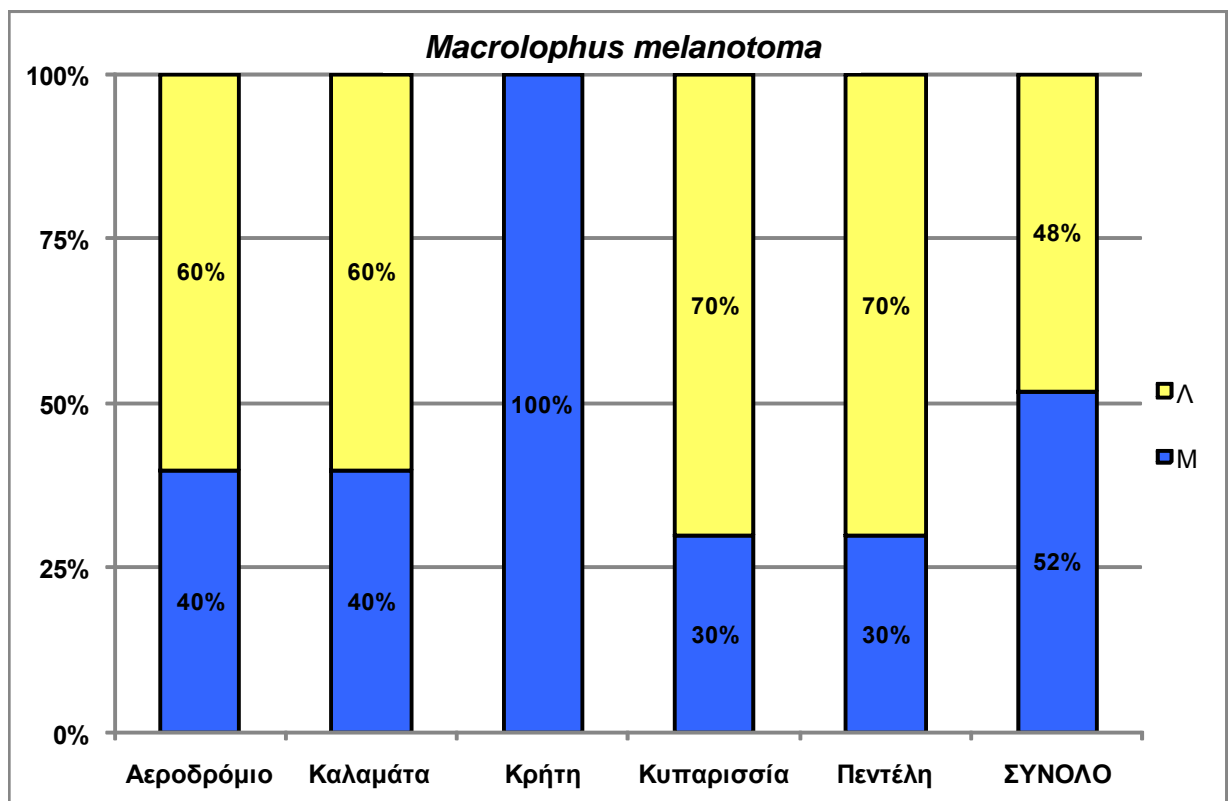
Macrolophus melanotoma					
	Φύλο	Κεραία		Φύλο	Κεραία
Καλαμάτα	A	Λ	Πεντέλη	Θ	M
	A	M		Θ	Λ
	Θ	M		Θ	Λ
	Θ	Λ		A	Λ
	A	Λ		A	Λ
	A	M		A	Λ
	A	Λ		A	M
	Θ	Λ		A	Λ
	Θ	M		Θ	M
	Θ	Λ		Θ	Λ
Αεροδρόμιο	Θ	M	Κρήτη	A	M
	A	Λ		A	M
	Θ	Λ		Θ	M
	Θ	Λ		Θ	M
	Θ	Λ		Θ	M
	A	M		A	M
	Θ	M		A	M
	A	Λ		A	M
	A	Λ		Θ	M
	A	M		Θ	M
Κυπαρισσία	A	Λ	Κυπαρισσία	Θ	Λ
	A	Λ		Θ	Λ
	Θ	M		Θ	Λ
	A	Λ		Θ	Λ
	A	M		A	M

Πίνακας 3-2 : Στοιχεία φύλου και χρώματος 1^{ου} άρθρου κεραίας του αρπακτικού *Macrolophus melanotoma*.

(A = Αρσενικό, Θ = Θηλυκό, M = Μαύρο άρθρο, Λ = Παρεμβολή λευκής ζώνης στο άρθρο)



Διάγραμμα 3-1 : Ποσοστιαία απεικόνιση των ατόμων με κριτήριο το χρώμα του 1^{ου} άρθρου της κεραίας του *Macrolophus pygmaeus*.
(M = Μαύρο άρθρο, Λ = Παρεμβολή λευκής ζώνης στο άρθρο)



Διάγραμμα 3-2 : Ποσοστιαία απεικόνιση των ατόμων με κριτήριο το χρώμα του 1^{ου} άρθρου της κεραίας του *Macrolophus melanotoma*.
(M = Μαύρο άρθρο, Λ = Παρεμβολή λευκής ζώνης στο άρθρο)

3.2 ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ

Τα άτομα που διασταυρώθηκαν μεταξύ τους κι έδωσαν γόνιμους απογόνους ήταν του ίδιου είδους, σύμφωνα με το κριτήριο του φυτού που είχε επιλεγεί στην αρχή για τη διάκρισή τους. Συγκεκριμένα, στις περιπτώσεις των μαρτύρων που χρησιμοποιήθηκαν είχε δημιουργηθεί μία μικρή εκτροφή μετά το πέρας των 40 περίπου ημερών από τη έναρξη του πειράματος. Η εκτροφή αυτή περιλάμβανε περίπου 30 άτομα, γεγονός που από μόνο του υποδηλώνει την ύπαρξη γόνιμων απογόνων. Ωστόσο, για την ορθότερη ανάλυση της διαδικασίας, οι απόγονοι (F1) της πατρικής γενιάς συμμετείχαν σε επόμενο πείραμα, όπου διασταυρώθηκαν μεταξύ τους κι έδωσαν και πάλι απογόνους (F2). Αντίθετα, όταν διασταυρώθηκαν άτομα του ενός είδους με άτομα του άλλου δεν δημιουργήθηκαν απόγονοι. Για τα διαφορετικά φυτά ξενιστές δεν υπήρχαν διαφορετικές παρατηρήσεις. Ότι προέκυψε στο ένα φυτό παρατηρήθηκε και στα άλλα δύο, ανά περίπτωση διασταύρωσης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στον πίνακα 3-3.

		♀		
		p (M)	m (M)	m(Λ)
♂	p (M)	+		
	m (M)		+	+
	m(Λ)		+	+

Πίνακας 3-3: Αποτελέσματα διασταυρώσεων των δύο ειδών ανάλογα με το φύλο και το χρώμα του πρώτου άρθρου της κεραίας τους. Με + συμβολίζονται οι γόνιμοι απόγονοι.

p: *Macrolophus pygmaeus*,

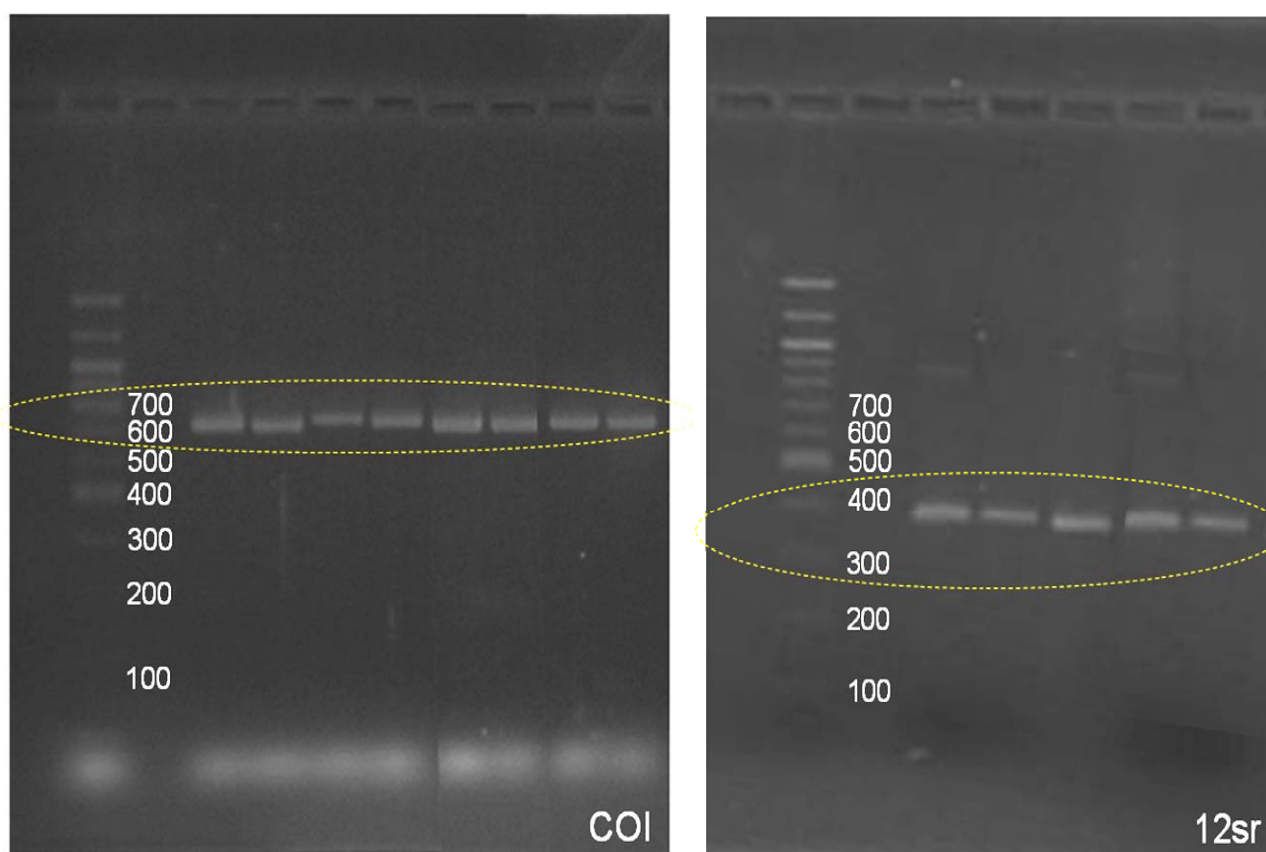
m: *Macrolophus melanotoma*

(M): Μαύρο πρώτο άρθρο κεραίας,

(Λ): Λευκή ζώνη στο πρώτο άρθρο κεραίας

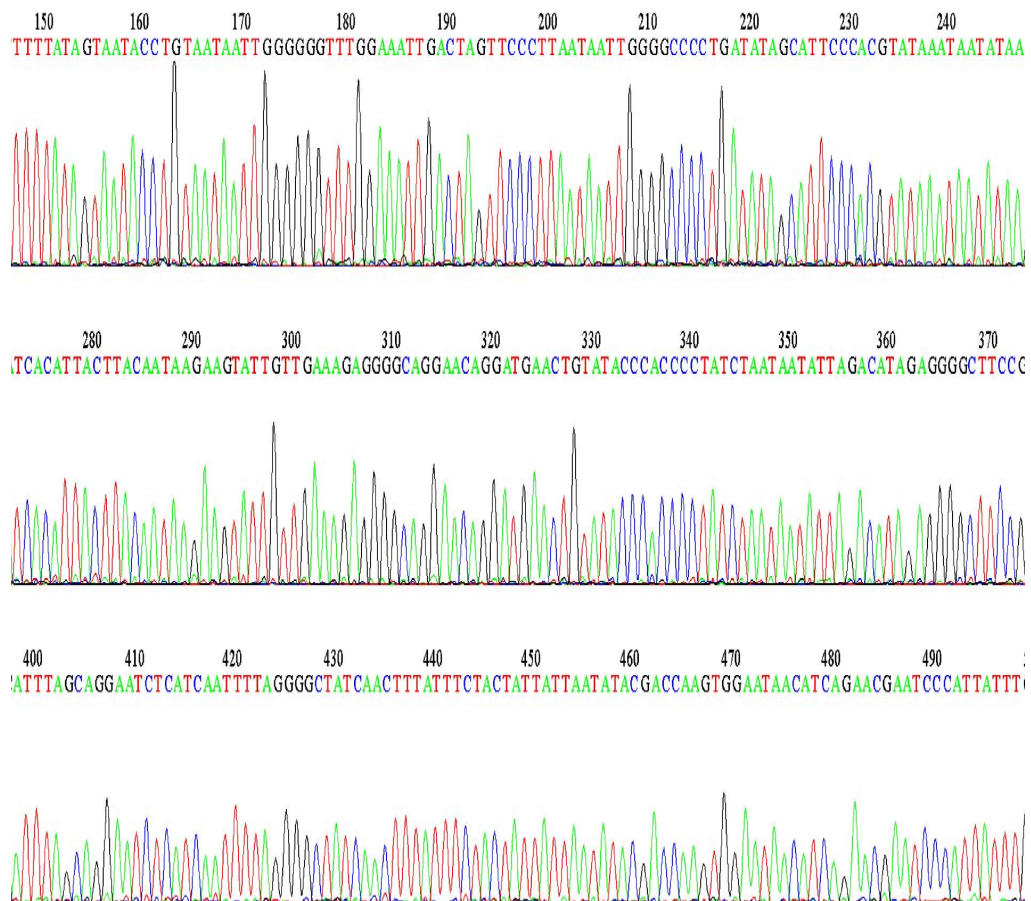
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΜΙΤΟΧΟΝΔΡΙΑΚΟΥ DNA

Κατά τις επιμέρους μοριακές τεχνικές που συμμετέχουν στη μέθοδο που ακολουθήθηκε στην παρούσα πειραματική διαδικασία λαμβάνονται αποτελέσματα που παρέχουν πληροφορίες και συμβάλουν στον έλεγχο της εκάστοτε τεχνικής. Η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης είναι ένας ποιοτικός έλεγχος που δίνει πληροφορίες για την ύπαρξη γενετικού υλικού, το οποίο αναπαρίσταται με τις ζώνες που εμφανίζονται (Εικόνα 3-1). Ανάλογα με το μήκος του γονιδιακού τμήματος οι ζώνες αυτές βρίσκονται σε διαφορετικό σημείο και με τη βοήθεια ενός μάρτυρα που χρησιμοποιείται μπορεί το μήκος του να υπολογισθεί κατά προσέγγιση. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία τα γονίδια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν μήκος 650-700 ζεύγη βάσεων για το COI και 350-400 για το 12sr, γεγονός που συνάδει με τα αποτελέσματά μας στην εικόνα 3-1. Συγκεκριμένα, μετά τη στοιχίση που αναφέρεται στη συνέχεια, το τμήμα του COI είχε μήκος 656bp και του 12sr 366bp.

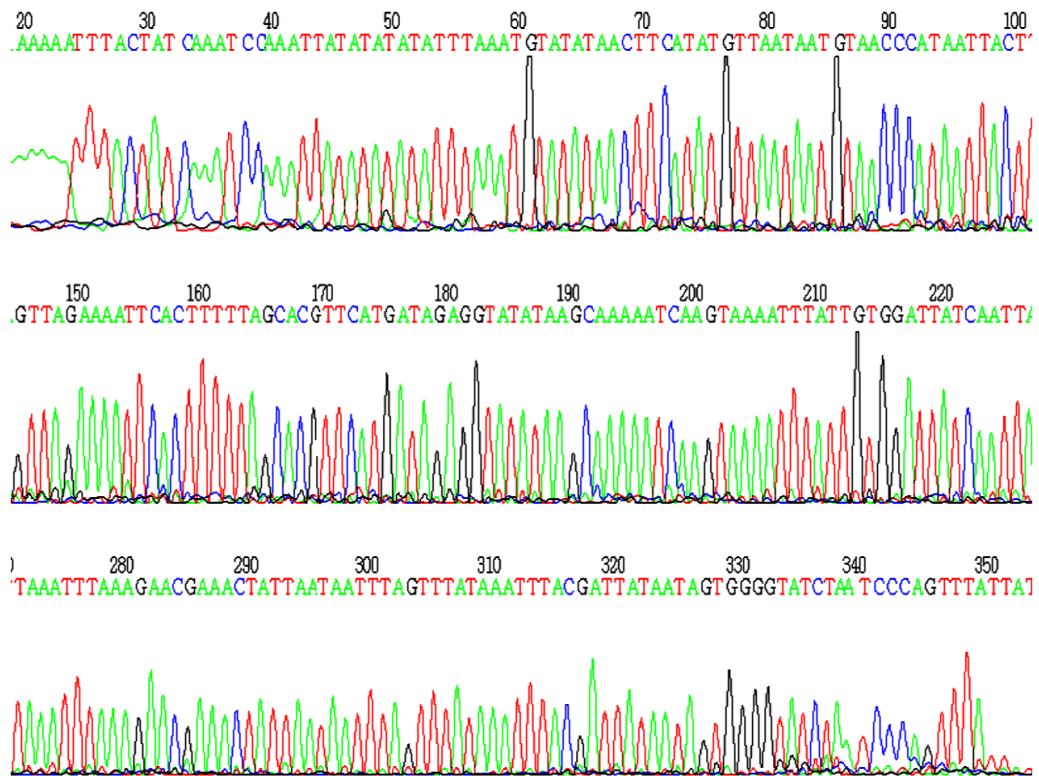


Εικόνα 3-1: Αποτέλεσμα διαδικασίας ηλεκτροφόρησης προϊόντων Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης (PCR) με διαφορετικούς εκκινητές (COI, 12sr).

Το αποτέλεσμα του προσδιορισμού της γονιδιακής αλληλουχίας, ανά δείγμα, που καθορίζεται από τα δύο ζεύγη εκκινητών φαίνεται στις εικόνες 3-2 και 3-3. Κάθε μέγιστο (μεγαλύτερη κορυφή) του γραφήματος αντιστοιχεί σε ένα νουκλεοτίδιο που περιέχει κάποια από τις τέσσερις αζωτούχες βάσεις. Διαβάζοντας το γράφημα παίρνουμε την αλληλουχία που μας ενδιαφέρει να μελετήσουμε. Κάποια από τα αποτελέσματα δεν ήταν ικανοποιητικά, καθώς τα μέγιστα δεν ήταν ευκρινώς διακριτά μεταξύ τους και μάλιστα, όταν συστοιχήθηκαν με τις ήδη κατατεθειμένες αλληλουχίες στη Genbank δεν έδωσαν τα αντίστοιχα γονίδια, όπως θα ήταν το αναμενόμενο. Αυτές οι περιπτώσεις, όπως κι εκείνες που εμφάνιζαν ποσοστό ταύτισης μικρότερο του 90% κατά τη συστοίχιση, δεν συμπεριλήφθηκαν στην επεξεργασία των αποτελεσμάτων που ακολούθησε.



Εικόνα 3-2: Ενδεικτικό χαρτογράφημα προσδιοριζόμενης COI νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.



Εικόνα 3-3: Ενδεικτικό χαρτογράφημα προσδιοριζόμενης 12sr νουκλεοτιδικής αλληλουχίας.

Στη συνέχεια, ακολούθησε η στατιστική επεξεργασία η οποία δίνει μία γενικότερη και πιο πλήρη εικόνα για τα αποτελέσματα της πειραματικής διαδικασίας. Στοιχίζοντας τις γονιδιακές αλληλουχίες που προέκυψαν και με τη βοήθεια των προγραμμάτων βρέθηκε ο αριθμός των απλοτύπων των πληθυσμών στο κάθε γονίδιο. Όπως φαίνεται στους πίνακες 3-4 και 3-5, οι απλότυποι ήταν 24 για το γονίδιο COI και 23 για το 12sr, ενώ τα νουκλεοτίδια στα οποία διαφέρουν ήταν 139 και 160, αντίστοιχα.

Επιπλέον, παρατηρούνται κάποιες διαφορές που θα μπορούσαν να ομαδοποιήσουν τους πληθυσμούς ανά περιοχές, όμως μεταξύ των δύο ειδών η διάκριση είναι σαφής (Εικόνα 3-4). Εξαίρεση αποτελεί η αλληλουχία του πληθυσμού του *M. melanotoma* από την περιοχή της Κρήτης που παρουσιάζει περισσότερα κοινά με τις αλληλουχίες των *M. pygmaeus*. Την ίδια εικόνα δίνουν και οι γενετικές αποστάσεις των πληθυσμών που υπολογίστηκαν με τη μέθοδο pairwise (Dessimoz *et al*, 2008) (Πίνακας 3-6, 3-7) σε συνδυασμό με τα φυλογενετικά δένδρα που κατασκευάστηκαν με διαφορετικές μεθόδους (Εικόνες 3-5 – 3-10). Οι αριθμοί που εμφανίζονται στις διακλαδώσεις δηλώνουν την βεβαιότητα των αποτελεσμάτων (bootstrap). Όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός (μέγιστο = 100), τόσο πιο κοντά στην πραγματικότητα βρίσκεται η διακλάδωση που αντιπροσωπεύει.

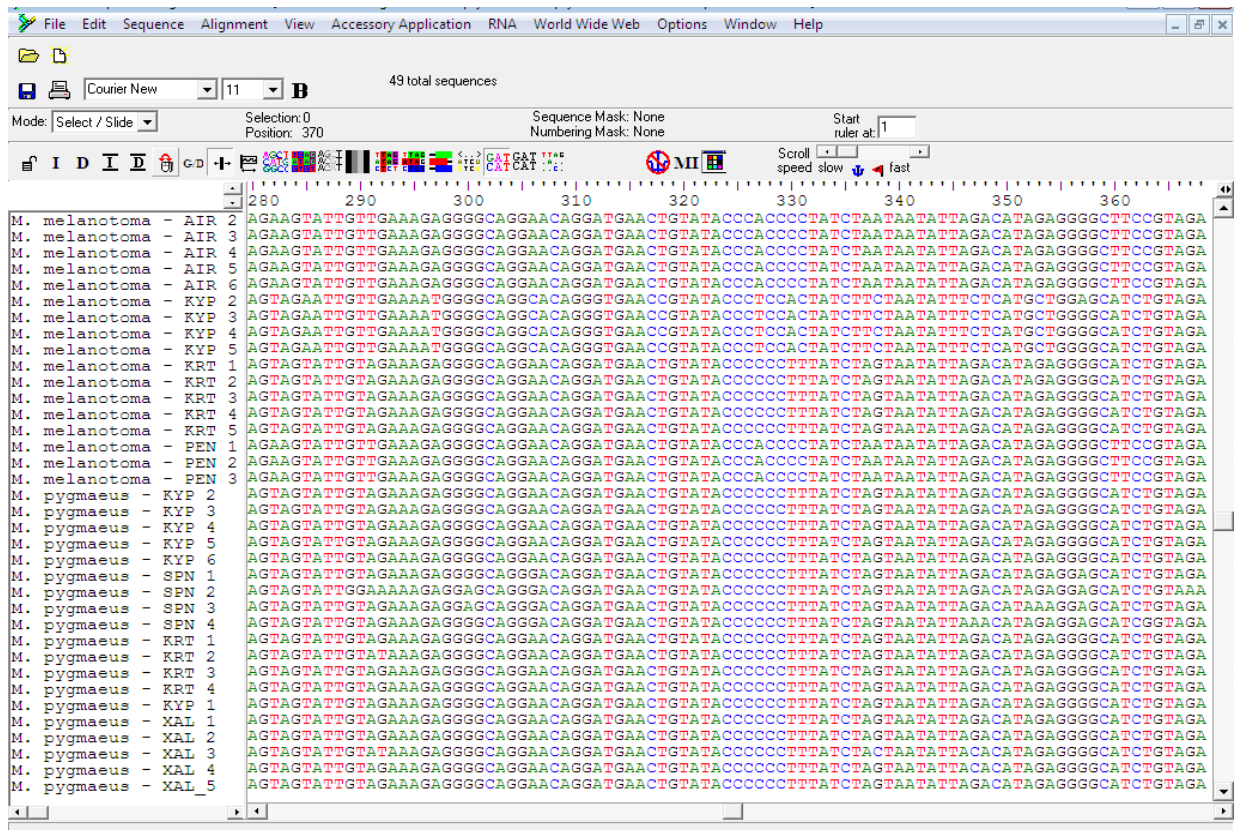
Αξίζει να σημειωθεί ότι δημιουργήθηκαν και φυλογενετικά δένδρα όπου συμμετείχαν ταυτόχρονα και τα δύο γονίδια ανά άτομο, αλλά επειδή οι πληροφορίες που δίνουν δε μεταβάλουν την εικόνα των φυλογενετικών δένδρων όπου τα γονίδια συμμετείχαν ξεχωριστά, δεν συμπεριλήφθηκαν στα αποτελέσματα.

Αναλυτικά, για το γονίδιο COI (Πίνακας 3-6) τις μεγαλύτερες γενετικές αποστάσεις παρουσιάζει το *M. pygmaeus* από την περιοχή της Ισπανίας με το *M. melanotoma* από τις περιοχές της Πεντέλης (0,146-0,148), της Καλαμάτας και του Αεροδρομίου (0,146). Οι μικρότερες γενετικές αποστάσεις εμφανίζονται κυρίως ενδοπληθυσμικά ανά είδος. Υπάρχει όμως η περίπτωση του *M. melanotoma* της Κρήτης που δεν απέχει γενετικά (0,000) από το *M. pygmaeus* της ίδια περιοχής, αυτής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου και της Κυπαρισσίας. Επιπλέον, μικρές γενετικές αποστάσεις παρουσιάζουν οι πληθυσμοί του *M. melanotoma* σε Αεροδρόμιο, Καλαμάτα και Πεντέλη (0,000-0,002). Ο μέσος όρος των γενετικών αποστάσεων για τους πληθυσμούς στο συγκεκριμένο γονίδιο ήταν 0,052.

Για το γονίδιο 12sr (Πίνακας 3-7) μεγαλύτερη είναι η γενετική απόσταση των *M. pygmaeus* από την Κρήτη με το *M. melanotoma* από την Κυπαρισσία (0,490). Πιο κοντά γενετικά βρίσκονται τα άτομα εντός των ίδιων πληθυσμών ανά είδος, αλλά και τα *M. melanotoma* των περιοχών του Αεροδρομίου, της Καλαμάτας και της Πεντέλης (0,000). Το *M. melanotoma* από την Κρήτη βρίσκεται πολύ κοντά γενετικά με το *M. pygmaeus* του Αεροδρομίου, της Κρήτης, της Κυπαρισσίας και του Γεωπονικού Πανεπιστημίου (0,000-0,032). Σε αυτό το γονίδιο ο μέσος όρος των γενετικών αποστάσεων είναι 0,102.

Ανάλογη είναι και η εικόνα των φυλογενετικών δένδρων. Στις εικόνες 3-5 με 3-7 τα δένδρα αφορούν το γονίδιο COI, ενώ στις 3-8 με 3-10 το γονίδιο 12sr. Έχουν κατασκευαστεί με τις μεθόδους της ελάχιστης εξέλιξης, της μέγιστης πιθανοφάνειας και τη μέθοδο Neighbor-Joining και κοινό τους αποτέλεσμα είναι ότι υπάρχουν δύο κλάδοι οι οποίοι διακρίνουν ξεκάθαρα τα δύο είδη του γένους *Macrolophus*. Εξαίρεση αποτελεί ο πληθυσμός του *M. melanotoma* της Κρήτης που ομαδοποιείται σε έναν κλάδο με τα *M. pygmaeus*. Επιπλέον, σε ενδοπληθυσμιακό επίπεδο ο δείκτης βεβαιότητας (bootstrap) είναι μικρότερος απ' ό,τι σε επίπεδο είδους ή διασφορετικών πληθυσμών.

Στα δένδρα που σχετίζονται με το γονίδιο COI τη μεγαλύτερη απόκλιση από τους υπόλοιπους πληθυσμούς του είδους *M. pygmaeus* παρουσιάζει ο πληθυσμός της Ισπανίας, ενώ για το *M. melanotoma* αυτός της Κυπαρισσίας. Οι δύο αυτοί πληθυσμοί όπως και ο πληθυσμός του Αεροδρομίου για το *M. melanotoma* ομαδοποιούνται συγκριτικά με τους υπόλοιπους. Στην περίπτωση του γονιδίου 12sr ομαδοποιείται και απέχει από τους άλλους ο πληθυσμός της Κυπαρισσίας του *M. melanotoma*, ενώ για το *M. pygmaeus* δεν υπάρχει εμφανής διάκριση των πληθυσμών.



Εικόνα 3-4: Τμήμα νουκλεοτιδικών αλληλουχιών όπως φαίνονται κατά την επεξεργασία με το στατιστικό πακέτο *CLUSTAL W2* (Thomson *et al*, 1994).

Απλότυπος 1	M.melanotoma-PEN_4, M.melanotoma-AIR_1, M.melanotoma-AIR_2, M.melanotoma-AIR_4, M.melanotoma-AIR_5
Απλότυπος 2	M.melanotoma-KAL_1, M.melanotoma-KAL_2, M.melanotoma-KAL_4, M.melanotoma-AIR_3, M.melanotoma-AIR_6, M.melanotoma-PEN_2, M.melanotoma-PEN_3
Απλότυπος 3	M.melanotoma-KAL_3
Απλότυπος 4	M.melanotoma-KYP_2
Απλότυπος 5	M.melanotoma-KYP_3, M.melanotoma-KYP_4
Απλότυπος 6	M.melanotoma-KYP_5
Απλότυπος 7	M.melanotoma-KRT_1, M.melanotoma-KRT_2, M.melanotoma-KRT_3, M.melanotoma-KRT_4, M.pygmaeus-KYP_3, M.pygmaeus-KYP_5, M.pygmaeus-KYP_6, M.pygmaeus-KRT_1, M.pygmaeus-KRT_3, M.pygmaeus-AUA_1, M.pygmaeus-AUA_3, M.pygmaeus-AUA_5
Απλότυπος 8	M.melanotoma-KRT_5, M.pygmaeus-XAL_1
Απλότυπος 9	M.melanotoma-PEN_1
Απλότυπος 10	M.pygmaeus-KYP_2
Απλότυπος 11	M.pygmaeus-KYP_4
Απλότυπος 12	M.pygmaeus-SPN_1
Απλότυπος 13	M.pygmaeus-SPN_2
Απλότυπος 14	M.pygmaeus-SPN_3

Απλότυπος 15	M.pygmaeus-SPN_4
Απλότυπος 16	M.pygmaeus-KRT_2
Απλότυπος 17	M.pygmaeus-KRT_4, M.pygmaeus-XAL_2
Απλότυπος 18	M.pygmaeus-KYP_1
Απλότυπος 19	M.pygmaeus-XAL_3
Απλότυπος 20	M.pygmaeus-XAL_4
Απλότυπος 21	M.pygmaeus-XAL_5
Απλότυπος 22	M.pygmaeus-XAL_6
Απλότυπος 23	M.pygmaeus-AUA_2
Απλότυπος 24	M.pygmaeus-AUA_4

Πίνακας 3-4: Απλότυποι των πληθυσμών των δύο ειδών για το γονίδιο COI.

Απλότυπος 1	M.melanotoma-KAL_2, M.melanotoma-AIR_1, M.melanotoma-KAL_3, M.melanotoma-KAL_4, M.melanotoma-PEN_1, M.melanotoma-PEN_2, M.melanotoma-PEN_3, M.melanotoma-PEN_4, M.melanotoma-PEN_5, M.melanotoma-AIR_2, M.melanotoma-AIR_3
Απλότυπος 2	M.melanotoma-KYP_4, M.melanotoma-KYP_7
Απλότυπος 3	M. melanotoma-KYP_5, M. melanotoma-KYP_6
Απλότυπος 4	M. melanotoma-KYP_2
Απλότυπος 5	M. melanotoma-KYP_3
Απλότυπος 6	M. melanotoma-AIR_4
Απλότυπος 7	M. melanotoma-AIR_5
Απλότυπος 8	M. melanotoma-AIR_6
Απλότυπος 9	M.melanotoma-KRT_2, M.melanotoma-KRT_3, M.pygmaeus-AUA_1, M.pygmaeus-KYP_1, M.pygmaeus-SPN_2, M.pygmaeus-AUA_4, M. pygmaeus-AUA_5, M.pygmaeus-KYP_3, M.pygmaeus-KYP_4, M.pygmaeus-KRT_4, M.pygmaeus-KRT_6, M.pygmaeus-SPN_1, M.pygmaeus-KYP_2
Απλότυπος 10	M. melanotoma-KRT_1
Απλότυπος 11	M. pygmaeus-AUA_2
Απλότυπος 12	M. pygmaeus-XAL_6
Απλότυπος 13	M. pygmaeus-SPN_3
Απλότυπος 14	M. pygmaeus-KRT_5
Απλότυπος 15	M. pygmaeus-AUA_3
Απλότυπος 16	M. pygmaeus-KRT_1
Απλότυπος 17	M. pygmaeus-KRT_2
Απλότυπος 18	M. pygmaeus-KRT_3
Απλότυπος 19	M. pygmaeus-XAL_1
Απλότυπος 20	M. pygmaeus-XAL_2
Απλότυπος 21	M. pygmaeus-XAL_3
Απλότυπος 22	M. pygmaeus-XAL_4
Απλότυπος 23	M. pygmaeus-XAL_5

Πίνακας 3-5: Απλότυποι των πληθυσμών των δύο ειδών για το γονίδιο 12sr.

	M.melanotoma-PEN_4	M.melanotoma-KAL_1	M.melanotoma-KAL_2	M.melanotoma-KAL_3	M.melanotoma-KAL_4	M.melanotoma-AIR_1	M.melanotoma-AIR_2	M.melanotoma-AIR_3	M.melanotoma-AIR_4	M.melanotoma-AIR_5	M.melanotoma-AIR_6	M.melanotoma-KYP_2	M.melanotoma-KYP_3	M.melanotoma-KYP_4	M.melanotoma-KYP_5	M.melanotoma-KRT_1
M.melanotoma-PEN_4		0,001	0,001	0,002	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,071	0,071	0,071	0,070	0,085
M.melanotoma-KAL_1	0,001		0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,073	0,073	0,073	0,071	0,087
M.melanotoma-KAL_2	0,001	0,000		0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,073	0,073	0,073	0,071	0,087
M.melanotoma-KAL_3	0,002	0,001	0,001		0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	0,073	0,073	0,073	0,071	0,088
M.melanotoma-KAL_4	0,001	0,000	0,000	0,001		0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,073	0,073	0,073	0,071	0,087
M.melanotoma-AIR_1	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001		0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,071	0,071	0,071	0,070	0,085
M.melanotoma-AIR_2	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001	0,000		0,001	0,000	0,000	0,001	0,071	0,071	0,071	0,070	0,085
M.melanotoma-AIR_3	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001		0,001	0,001	0,000	0,073	0,073	0,073	0,071	0,087
M.melanotoma-AIR_4	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001	0,000	0,000	0,001		0,000	0,001	0,071	0,071	0,071	0,070	0,085
M.melanotoma-AIR_5	0,000	0,001	0,001	0,002	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000		0,001	0,071	0,071	0,071	0,070	0,085
M.melanotoma-AIR_6	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001		0,073	0,073	0,073	0,071	0,087
M.melanotoma-KYP_2	0,071	0,073	0,073	0,073	0,073	0,071	0,071	0,073	0,071	0,071	0,073		0,002	0,002	0,001	0,074
M.melanotoma-KYP_3	0,071	0,073	0,073	0,073	0,073	0,071	0,071	0,073	0,071	0,071	0,073	0,002		0,000	0,001	0,074
M.melanotoma-KYP_4	0,071	0,073	0,073	0,073	0,073	0,071	0,071	0,073	0,071	0,071	0,073	0,002	0,000		0,001	0,074
M.melanotoma-KYP_5	0,070	0,071	0,071	0,071	0,071	0,070	0,070	0,071	0,070	0,070	0,071	0,001	0,001	0,001		0,073
M.melanotoma-KRT_1	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	
M.melanotoma-KRT_2	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.melanotoma-KRT_3	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.melanotoma-KRT_4	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.melanotoma-KRT_5	0,087	0,088	0,088	0,090	0,088	0,087	0,087	0,088	0,087	0,087	0,088	0,076	0,076	0,076	0,074	0,001
M.melanotoma-PEN_1	0,002	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	0,074	0,074	0,074	0,073	0,087
M.melanotoma-PEN_2	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,073	0,073	0,073	0,071	0,087
M.melanotoma-PEN_3	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000	0,073	0,073	0,073	0,071	0,087
M.pygmaeus-KYP_2	0,087	0,088	0,088	0,090	0,088	0,087	0,087	0,088	0,087	0,087	0,088	0,076	0,073	0,073	0,074	0,001
M.pygmaeus-KYP_3	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.pygmaeus-KYP_4	0,087	0,088	0,088	0,090	0,088	0,087	0,087	0,088	0,087	0,087	0,088	0,076	0,076	0,076	0,074	0,001
M.pygmaeus-KYP_5	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.pygmaeus-KYP_6	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.pygmaeus-SPN_1	0,106	0,108	0,108	0,106	0,108	0,106	0,106	0,108	0,106	0,106	0,108	0,089	0,089	0,089	0,090	0,030
M.pygmaeus-SPN_2	0,102	0,103	0,103	0,102	0,103	0,102	0,102	0,103	0,102	0,102	0,103	0,086	0,086	0,086	0,087	0,033
M.pygmaeus-SPN_3	0,108	0,110	0,110	0,108	0,110	0,108	0,108	0,110	0,108	0,108	0,110	0,091	0,091	0,091	0,092	0,037
M.pygmaeus-SPN_4	0,144	0,146	0,146	0,144	0,146	0,144	0,144	0,146	0,144	0,144	0,146	0,119	0,119	0,119	0,120	0,070
M.pygmaeus-KRT_1	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.pygmaeus-KRT_2	0,087	0,088	0,088	0,090	0,088	0,087	0,087	0,088	0,087	0,087	0,088	0,076	0,076	0,076	0,074	0,001
M.pygmaeus-KRT_3	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.pygmaeus-KRT_4	0,084	0,085	0,085	0,087	0,085	0,084	0,084	0,085	0,084	0,084	0,085	0,073	0,073	0,073	0,071	0,001
M.pygmaeus-KYP_1	0,091	0,093	0,093	0,094	0,093	0,091	0,091	0,093	0,091	0,091	0,093	0,079	0,079	0,079	0,077	0,005
M.pygmaeus-XAL_1	0,087	0,088	0,088	0,090	0,088	0,087	0,087	0,088	0,087	0,087	0,088	0,076	0,076	0,076	0,074	0,001
M.pygmaeus-XAL_2	0,084	0,085	0,085	0,087	0,085	0,084	0,084	0,085	0,084	0,084	0,085	0,073	0,073	0,073	0,071	0,001
M.pygmaeus-XAL_3	0,101	0,103	0,103	0,104	0,103	0,101	0,101	0,103	0,101	0,101	0,103	0,088	0,088	0,088	0,086	0,018
M.pygmaeus-XAL_4	0,087	0,088	0,088	0,090	0,088	0,087	0,087	0,088	0,087	0,087	0,088	0,076	0,076	0,076	0,074	0,001
M.pygmaeus-XAL_5	0,090	0,092	0,092	0,093	0,092	0,090	0,090	0,092	0,090	0,090	0,092	0,079	0,079	0,079	0,077	0,005
M.pygmaeus-XAL_6	0,087	0,088	0,088	0,090	0,088	0,087	0,087	0,088	0,087	0,087	0,088	0,077	0,077	0,077	0,076	0,002
M.pygmaeus-AUA_1	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.pygmaeus-AUA_2	0,087	0,088	0,088	0,090	0,088	0,087	0,087	0,088	0,087	0,087	0,088	0,076	0,076	0,076	0,074	0,004
M.pygmaeus-AUA_3	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000
M.pygmaeus-AUA_4	0,114	0,116	0,116	0,118	0,116	0,114	0,114	0,116	0,114	0,114	0,116	0,098	0,095	0,095	0,096	0,028
M.pygmaeus-AUA_5	0,085	0,087	0,087	0,088	0,087	0,085	0,085	0,087	0,085	0,085	0,087	0,074	0,074	0,074	0,073	0,000

	M.melanotoma-KRT_2	M.melanotoma-KRT_3	M.melanotoma-KRT_4	M.melanotoma-KRT_5	M.melanotoma-PEN_1	M.melanotoma-PEN_2	M.melanotoma-PEN_3	M.pygmaeus-KYP_2	M.pygmaeus-KYP_3	M.pygmaeus-KYP_4	M.pygmaeus-KYP_5	M.pygmaeus-KYP_6	M.pygmaeus-SPN_1	M.pygmaeus-SPN_2	M.pygmaeus-SPN_3	M.pygmaeus-SPN_4
M.melanotoma-PEN_4	0,085	0,085	0,085	0,087	0,002	0,001	0,001	0,087	0,085	0,087	0,085	0,085	0,106	0,102	0,108	0,144
M.melanotoma-KAL_1	0,087	0,087	0,087	0,088	0,001	0,000	0,000	0,088	0,087	0,088	0,087	0,087	0,108	0,103	0,110	0,146
M.melanotoma-KAL_2	0,087	0,087	0,087	0,088	0,001	0,000	0,000	0,088	0,087	0,088	0,087	0,087	0,108	0,103	0,110	0,146
M.melanotoma-KAL_3	0,088	0,088	0,088	0,090	0,002	0,001	0,001	0,090	0,088	0,090	0,088	0,088	0,106	0,102	0,108	0,144
M.melanotoma-KAL_4	0,087	0,087	0,087	0,088	0,001	0,000	0,000	0,088	0,087	0,088	0,087	0,087	0,108	0,103	0,110	0,146
M.melanotoma-AIR_1	0,085	0,085	0,085	0,087	0,002	0,001	0,001	0,087	0,085	0,087	0,085	0,085	0,106	0,102	0,108	0,144
M.melanotoma-AIR_2	0,085	0,085	0,085	0,087	0,002	0,001	0,001	0,087	0,085	0,087	0,085	0,085	0,106	0,102	0,108	0,144
M.melanotoma-AIR_3	0,087	0,087	0,087	0,088	0,001	0,000	0,000	0,088	0,087	0,088	0,087	0,087	0,108	0,103	0,110	0,146
M.melanotoma-AIR_4	0,085	0,085	0,085	0,087	0,002	0,001	0,001	0,087	0,085	0,087	0,085	0,085	0,106	0,102	0,108	0,144
M.melanotoma-AIR_5	0,085	0,085	0,085	0,087	0,002	0,001	0,001	0,087	0,085	0,087	0,085	0,085	0,106	0,102	0,108	0,144
M.melanotoma-AIR_6	0,087	0,087	0,087	0,088	0,001	0,000	0,000	0,088	0,087	0,088	0,087	0,087	0,108	0,103	0,110	0,146
M.melanotoma-KYP_2	0,074	0,074	0,074	0,076	0,074	0,073	0,073	0,076	0,074	0,076	0,074	0,074	0,089	0,086	0,091	0,119
M.melanotoma-KYP_3	0,074	0,074	0,074	0,076	0,074	0,073	0,073	0,073	0,074	0,076	0,074	0,074	0,089	0,086	0,091	0,119
M.melanotoma-KYP_4	0,074	0,074	0,074	0,076	0,074	0,073	0,073	0,073	0,074	0,076	0,074	0,074	0,089	0,086	0,091	0,119
M.melanotoma-KYP_5	0,073	0,073	0,073	0,074	0,073	0,071	0,071	0,074	0,073	0,074	0,073	0,073	0,090	0,087	0,092	0,120
M.melanotoma-KRT_1	0,000	0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.melanotoma-KRT_2		0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.melanotoma-KRT_3	0,000		0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.melanotoma-KRT_4	0,000	0,000		0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.melanotoma-KRT_5	0,001	0,001	0,001		0,088	0,088	0,088	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,032	0,034	0,039	0,072
M.melanotoma-PEN_1	0,087	0,087	0,087	0,088		0,001	0,001	0,088	0,087	0,088	0,087	0,087	0,108	0,103	0,110	0,148
M.melanotoma-PEN_2	0,087	0,087	0,087	0,088	0,001		0,000	0,088	0,087	0,088	0,087	0,087	0,108	0,103	0,110	0,146
M.melanotoma-PEN_3	0,087	0,087	0,087	0,088	0,001	0,000		0,088	0,087	0,088	0,087	0,087	0,108	0,103	0,110	0,146
M.pygmaeus-KYP_2	0,001	0,001	0,001	0,002	0,088	0,088	0,088		0,001	0,002	0,001	0,001	0,029	0,032	0,036	0,069
M.pygmaeus-KYP_3	0,000	0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001		0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.pygmaeus-KYP_4	0,001	0,001	0,001	0,002	0,088	0,088	0,088	0,002	0,001		0,001	0,001	0,032	0,034	0,039	0,072
M.pygmaeus-KYP_5	0,000	0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001		0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.pygmaeus-KYP_6	0,000	0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000		0,030	0,033	0,037	0,070
M.pygmaeus-SPN_1	0,030	0,030	0,030	0,032	0,108	0,108	0,108	0,029	0,030	0,032	0,030	0,030		0,016	0,018	0,050
M.pygmaeus-SPN_2	0,033	0,033	0,033	0,034	0,103	0,103	0,103	0,032	0,033	0,034	0,033	0,033	0,016		0,016	0,056
M.pygmaeus-SPN_3	0,037	0,037	0,037	0,039	0,110	0,110	0,110	0,036	0,037	0,039	0,037	0,037	0,018	0,016		0,049
M.pygmaeus-SPN_4	0,070	0,070	0,070	0,072	0,148	0,146	0,146	0,069	0,070	0,072	0,070	0,070	0,050	0,056	0,049	
M.pygmaeus-KRT_1	0,000	0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.pygmaeus-KRT_2	0,001	0,001	0,001	0,002	0,088	0,088	0,088	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,032	0,033	0,039	0,072
M.pygmaeus-KRT_3	0,000	0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.pygmaeus-KRT_4	0,001	0,001	0,001	0,002	0,085	0,085	0,085	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,029	0,032	0,036	0,069
M.pygmaeus-KYP_1	0,005	0,005	0,005	0,006	0,093	0,093	0,093	0,006	0,005	0,006	0,005	0,005	0,032	0,036	0,037	0,070
M.pygmaeus-XAL_1	0,001	0,001	0,001	0,000	0,088	0,088	0,088	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,032	0,034	0,039	0,072
M.pygmaeus-XAL_2	0,001	0,001	0,001	0,002	0,085	0,085	0,085	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,029	0,032	0,036	0,069
M.pygmaeus-XAL_3	0,018	0,018	0,018	0,016	0,103	0,103	0,103	0,019	0,018	0,019	0,018	0,018	0,045	0,048	0,054	0,082
M.pygmaeus-XAL_4	0,001	0,001	0,001	0,002	0,088	0,088	0,088	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,032	0,034	0,039	0,072
M.pygmaeus-XAL_5	0,005	0,005	0,005	0,006	0,092	0,092	0,092	0,006	0,005	0,006	0,005	0,005	0,034	0,037	0,041	0,073
M.pygmaeus-XAL_6	0,002	0,002	0,002	0,004	0,088	0,088	0,088	0,004	0,002	0,004	0,002	0,002	0,033	0,036	0,040	0,072
M.pygmaeus-AUA_1	0,000	0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.pygmaeus-AUA_2	0,004	0,004	0,004	0,005	0,088	0,088	0,088	0,005	0,004	0,005	0,004	0,004	0,034	0,037	0,041	0,075
M.pygmaeus-AUA_3	0,000	0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070
M.pygmaeus-AUA_4	0,028	0,028	0,028	0,027	0,116	0,116	0,116	0,027	0,028	0,030	0,028	0,028	0,051	0,057	0,060	0,087
M.pygmaeus-AUA_5	0,000	0,000	0,000	0,001	0,087	0,087	0,087	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,033	0,037	0,070

	M.pygmaeus-KRT_1	M.pygmaeus-KRT_2	M.pygmaeus-KRT_3	M.pygmaeus-KRT_4	M.pygmaeus-KYP_1	M.pygmaeus-XAL_1	M.pygmaeus-XAL_2	M.pygmaeus-XAL_3	M.pygmaeus-XAL_4	M.pygmaeus-XAL_5	M.pygmaeus-XAL_6	M.pygmaeus-AUA_1	M.pygmaeus-AUA_2	M.pygmaeus-AUA_3	M.pygmaeus-AUA_4	M.pygmaeus-AUA_5
M.melanotoma-PEN_4	0,085	0,087	0,085	0,084	0,091	0,087	0,084	0,101	0,087	0,090	0,087	0,085	0,087	0,085	0,114	0,085
M.melanotoma-KAL_1	0,087	0,088	0,087	0,085	0,093	0,088	0,085	0,103	0,088	0,092	0,088	0,087	0,088	0,087	0,116	0,087
M.melanotoma-KAL_2	0,087	0,088	0,087	0,085	0,093	0,088	0,085	0,103	0,088	0,092	0,088	0,087	0,088	0,087	0,116	0,087
M.melanotoma-KAL_3	0,088	0,090	0,088	0,087	0,094	0,090	0,087	0,104	0,090	0,093	0,090	0,088	0,090	0,088	0,118	0,088
M.melanotoma-KAL_4	0,087	0,088	0,087	0,085	0,093	0,088	0,085	0,103	0,088	0,092	0,088	0,087	0,088	0,087	0,116	0,087
M.melanotoma-AIR_1	0,085	0,087	0,085	0,084	0,091	0,087	0,084	0,101	0,087	0,090	0,087	0,085	0,087	0,085	0,114	0,085
M.melanotoma-AIR_2	0,085	0,087	0,085	0,084	0,091	0,087	0,084	0,101	0,087	0,090	0,087	0,085	0,087	0,085	0,114	0,085
M.melanotoma-AIR_3	0,087	0,088	0,087	0,085	0,093	0,088	0,085	0,103	0,088	0,092	0,088	0,087	0,088	0,087	0,116	0,087
M.melanotoma-AIR_4	0,085	0,087	0,085	0,084	0,091	0,087	0,084	0,101	0,087	0,090	0,087	0,085	0,087	0,085	0,114	0,085
M.melanotoma-AIR_5	0,085	0,087	0,085	0,084	0,091	0,087	0,084	0,101	0,087	0,090	0,087	0,085	0,087	0,085	0,114	0,085
M.melanotoma-AIR_6	0,087	0,088	0,087	0,085	0,093	0,088	0,085	0,103	0,088	0,092	0,088	0,087	0,088	0,087	0,116	0,087
M.melanotoma-KYP_2	0,074	0,076	0,074	0,073	0,079	0,076	0,073	0,088	0,076	0,079	0,077	0,074	0,076	0,074	0,098	0,074
M.melanotoma-KYP_3	0,074	0,076	0,074	0,073	0,079	0,076	0,073	0,088	0,076	0,079	0,077	0,074	0,076	0,074	0,095	0,074
M.melanotoma-KYP_4	0,074	0,076	0,074	0,073	0,079	0,076	0,073	0,088	0,076	0,079	0,077	0,074	0,076	0,074	0,095	0,074
M.melanotoma-KYP_5	0,073	0,074	0,073	0,071	0,077	0,074	0,071	0,086	0,074	0,077	0,076	0,073	0,074	0,073	0,096	0,073
M.melanotoma-KRT_1	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	0,000
M.melanotoma-KRT_2	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	0,000
M.melanotoma-KRT_3	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	0,000
M.melanotoma-KRT_4	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	0,000
M.melanotoma-KRT_5	0,001	0,002	0,001	0,002	0,006	0,000	0,002	0,016	0,002	0,006	0,004	0,001	0,005	0,001	0,027	0,001
M.melanotoma-PEN_1	0,087	0,088	0,087	0,085	0,093	0,088	0,085	0,103	0,088	0,092	0,088	0,087	0,088	0,087	0,116	0,087
M.melanotoma-PEN_2	0,087	0,088	0,087	0,085	0,093	0,088	0,085	0,103	0,088	0,092	0,088	0,087	0,088	0,087	0,116	0,087
M.melanotoma-PEN_3	0,087	0,088	0,087	0,085	0,093	0,088	0,085	0,103	0,088	0,092	0,088	0,087	0,088	0,087	0,116	0,087
M.pygmaeus-KYP_2	0,001	0,002	0,001	0,002	0,006	0,002	0,002	0,019	0,002	0,006	0,004	0,001	0,005	0,001	0,027	0,001
M.pygmaeus-KYP_3	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	0,000
M.pygmaeus-KYP_4	0,001	0,002	0,001	0,002	0,006	0,002	0,002	0,019	0,002	0,006	0,004	0,001	0,005	0,001	0,030	0,001
M.pygmaeus-KYP_5	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	0,000
M.pygmaeus-KYP_6	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	0,000
M.pygmaeus-SPN_1	0,030	0,032	0,030	0,029	0,032	0,032	0,029	0,045	0,032	0,034	0,033	0,030	0,034	0,030	0,051	0,030
M.pygmaeus-SPN_2	0,033	0,033	0,033	0,032	0,036	0,034	0,032	0,048	0,034	0,037	0,036	0,033	0,037	0,033	0,057	0,033
M.pygmaeus-SPN_3	0,037	0,039	0,037	0,036	0,037	0,039	0,036	0,054	0,039	0,041	0,040	0,037	0,041	0,037	0,060	0,037
M.pygmaeus-SPN_4	0,070	0,072	0,070	0,069	0,070	0,072	0,069	0,082	0,072	0,073	0,072	0,070	0,075	0,070	0,087	0,070
M.pygmaeus-KRT_1		0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	0,000
M.pygmaeus-KRT_2	0,001		0,001	0,002	0,006	0,002	0,002	0,016	0,002	0,006	0,004	0,001	0,005	0,001	0,027	0,001
M.pygmaeus-KRT_3	0,000	0,001		0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	0,000
M.pygmaeus-KRT_4	0,001	0,002	0,001		0,006	0,002	0,000	0,019	0,002	0,006	0,004	0,001	0,005	0,001	0,030	0,001
M.pygmaeus-KYP_1	0,005	0,006	0,005	0,006		0,006	0,006	0,022	0,006	0,009	0,006	0,005	0,009	0,005	0,030	0,005
M.pygmaeus-XAL_1	0,001	0,002	0,001	0,002	0,006		0,002	0,016	0,002	0,006	0,004	0,001	0,005	0,001	0,027	0,001
M.pygmaeus-XAL_2	0,001	0,002	0,001	0,000	0,006	0,002		0,019	0,002	0,006	0,004	0,001	0,005	0,001	0,030	0,001
M.pygmaeus-XAL_3	0,018	0,016	0,018	0,019	0,022	0,016	0,019		0,016	0,015	0,015	0,018	0,019	0,018	0,014	0,018
M.pygmaeus-XAL_4	0,001	0,002	0,001	0,002	0,006	0,002	0,002	0,016		0,006	0,004	0,001	0,005	0,001	0,027	0,001
M.pygmaeus-XAL_5	0,005	0,006	0,005	0,006	0,009	0,006	0,006	0,015	0,006		0,002	0,005	0,009	0,005	0,026	0,005
M.pygmaeus-XAL_6	0,002	0,004	0,002	0,004	0,006	0,004	0,004	0,015	0,004	0,002		0,002	0,006	0,002	0,026	0,002
M.pygmaeus-AUA_1	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002		0,004	0,000	0,028	0,000
M.pygmaeus-AUA_2	0,004	0,005	0,004	0,005	0,009	0,005	0,005	0,019	0,005	0,009	0,006	0,004		0,004	0,027	0,004
M.pygmaeus-AUA_3	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004		0,028	0,000
M.pygmaeus-AUA_4	0,028	0,027	0,028	0,030	0,030	0,027	0,030	0,014	0,027	0,026	0,026	0,028	0,027	0,028		0,028
M.pygmaeus-AUA_5	0,000	0,001	0,000	0,001	0,005	0,001	0,001	0,018	0,001	0,005	0,002	0,000	0,004	0,000	0,028	

Πίνακας 3-6: Γενετικές αποστάσεις των πληθυσμών των δύο ειδών με ανάλυση pairwise για το γονίδιο COI (Dessimoz *et al*, 2008)

(Με κόκκινο εμφανίζεται η μέγιστη τιμή, με μπλε η ελάχιστη και με πράσινο η διάμεσος).

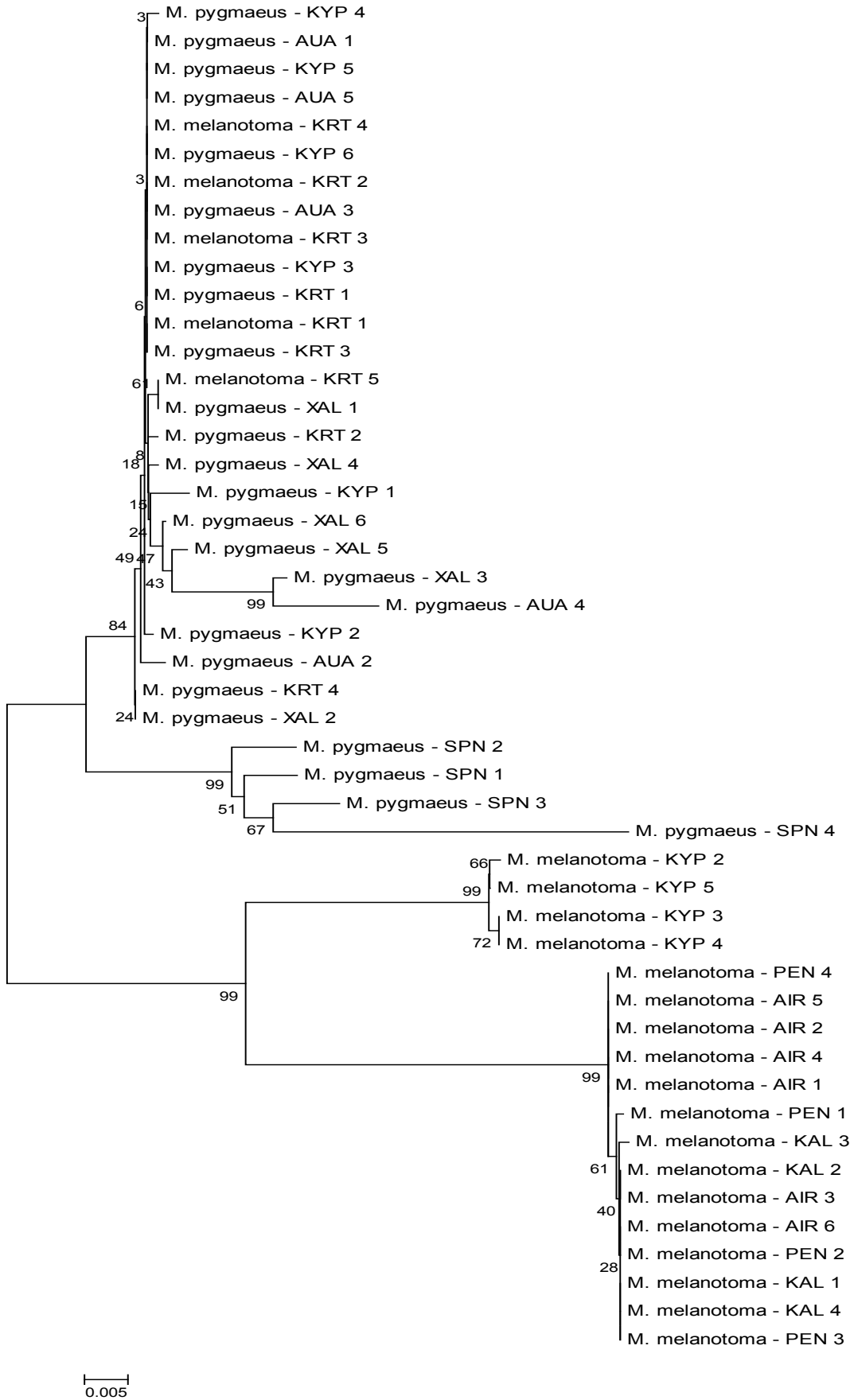
	M.melanotoma-KAL_2	M.melanotoma-KYP_4	M.melanotoma-KYP_5	M.melanotoma-KYP_6	M.melanotoma-KYP_7	M.melanotoma-AIR_1	M.melanotoma-KYP_2	M.melanotoma-KYP_3	M.melanotoma-KAL_3	M.melanotoma-KAL_4	M.melanotoma-PEN_1	M.melanotoma-PEN_2	M.melanotoma-PEN_3	M.melanotoma-PEN_4	M.melanotoma-PEN_5	M.melanotoma-AIR_4
M.melanotoma-KAL_2		0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
M.melanotoma-KYP_4	0,284		0,003	0,003	0,000	0,284	0,323	0,354	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,298
M.melanotoma-KYP_5	0,284	0,003		0,000	0,003	0,284	0,323	0,354	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,298
M.melanotoma-KYP_6	0,284	0,003	0,000		0,003	0,284	0,323	0,354	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,298
M.melanotoma-KYP_7	0,284	0,000	0,003	0,003		0,284	0,323	0,354	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,284	0,298
M.melanotoma-AIR_1	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284		0,039	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
M.melanotoma-KYP_2	0,039	0,323	0,323	0,323	0,323	0,039		0,077	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,039	0,042
M.melanotoma-KYP_3	0,059	0,354	0,354	0,354	0,354	0,059	0,077		0,059	0,059	0,059	0,059	0,059	0,059	0,059	0,059
M.melanotoma-KAL_3	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
M.melanotoma-KAL_4	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
M.melanotoma-PEN_1	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
M.melanotoma-PEN_2	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,000	0,009
M.melanotoma-PEN_3	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,000	0,009
M.melanotoma-PEN_4	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,000	0,009
M.melanotoma-PEN_5	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000		0,009
M.melanotoma-AIR_4	0,009	0,298	0,298	0,298	0,298	0,009	0,042	0,059	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	
M.melanotoma-AIR_5	0,006	0,285	0,285	0,285	0,285	0,006	0,032	0,062	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,009
M.melanotoma-AIR_6	0,003	0,289	0,289	0,289	0,289	0,003	0,042	0,063	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006
M.melanotoma-AIR_2	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
M.melanotoma-KRT_2	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.melanotoma-KRT_3	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.melanotoma-AIR_3	0,000	0,284	0,284	0,284	0,284	0,000	0,039	0,059	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
M.melanotoma-KRT_1	0,098	0,296	0,296	0,296	0,296	0,098	0,133	0,151	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,098	0,109
M.pygmaeus-AUA_1	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-KYP_1	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-AUA_2	0,239	0,440	0,440	0,440	0,440	0,239	0,229	0,282	0,239	0,239	0,239	0,239	0,239	0,239	0,239	0,234
M.pygmaeus-XAL_6	0,077	0,295	0,295	0,295	0,295	0,077	0,118	0,144	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,077	0,087
M.pygmaeus-SPN_2	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-SPN_3	0,073	0,290	0,290	0,290	0,290	0,073	0,106	0,140	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,083
M.pygmaeus-AUA_4	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-AUA_5	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-KYP_3	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-KYP_4	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-KRT_4	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-KRT_5	0,069	0,284	0,284	0,284	0,284	0,069	0,102	0,131	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,073
M.pygmaeus-KRT_6	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-SPN_1	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-AUA_3	0,094	0,322	0,322	0,322	0,322	0,094	0,128	0,139	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,094	0,097
M.pygmaeus-KYP_2	0,066	0,279	0,279	0,279	0,279	0,066	0,106	0,132	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,066	0,076
M.pygmaeus-KRT_1	0,116	0,341	0,341	0,341	0,341	0,116	0,132	0,153	0,116	0,116	0,116	0,116	0,116	0,116	0,116	0,116
M.pygmaeus-KRT_2	0,080	0,294	0,294	0,294	0,294	0,080	0,102	0,143	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,080	0,083
M.pygmaeus-KRT_3	0,309	0,490	0,483	0,483	0,490	0,309	0,350	0,318	0,309	0,309	0,309	0,309	0,309	0,309	0,309	0,315
M.pygmaeus-XAL_1	0,108	0,310	0,310	0,310	0,310	0,108	0,141	0,151	0,108	0,108	0,108	0,108	0,108	0,108	0,108	0,119
M.pygmaeus-XAL_2	0,069	0,278	0,278	0,278	0,278	0,069	0,110	0,128	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,069	0,080
M.pygmaeus-XAL_3	0,090	0,302	0,302	0,302	0,302	0,090	0,132	0,136	0,090	0,090	0,090	0,090	0,090	0,090	0,090	0,094
M.pygmaeus-XAL_4	0,073	0,278	0,278	0,278	0,278	0,073	0,114	0,132	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,073	0,083
M.pygmaeus-XAL_5	0,076	0,287	0,287	0,287	0,287	0,076	0,117	0,128	0,076	0,076	0,076	0,076	0,076	0,076	0,076	0,087

	M.melanotoma-AIR_5	M.melanotoma-AIR_6	M.melanotoma-AIR_2	M.melanotoma-KRT_2	M.melanotoma-KRT_3	M.melanotoma-AIR_3	M.melanotoma-KRT_1	M.pygmaeus-AUA_1	M.pygmaeus-KYP_1	M.pygmaeus-AUA_2	M.pygmaeus-XAL_6	M.pygmaeus-SPN_2	M.pygmaeus-SPN_3	M.pygmaeus-AUA_4	M.pygmaeus-AUA_5	M.pygmaeus-KYP_3
M.melanotoma-KAL_2	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-KYP_4	0,285	0,289	0,284	0,279	0,279	0,284	0,296	0,279	0,279	0,440	0,295	0,279	0,290	0,279	0,279	0,279
M.melanotoma-KYP_5	0,285	0,289	0,284	0,279	0,279	0,284	0,296	0,279	0,279	0,440	0,295	0,279	0,290	0,279	0,279	0,279
M.melanotoma-KYP_6	0,285	0,289	0,284	0,279	0,279	0,284	0,296	0,279	0,279	0,440	0,295	0,279	0,290	0,279	0,279	0,279
M.melanotoma-KYP_7	0,285	0,289	0,284	0,279	0,279	0,284	0,296	0,279	0,279	0,440	0,295	0,279	0,290	0,279	0,279	0,279
M.melanotoma-AIR_1	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-KYP_2	0,032	0,042	0,039	0,106	0,106	0,039	0,133	0,106	0,106	0,229	0,118	0,106	0,106	0,106	0,106	0,106
M.melanotoma-KYP_3	0,062	0,063	0,059	0,132	0,132	0,059	0,151	0,132	0,132	0,282	0,144	0,132	0,140	0,132	0,132	0,132
M.melanotoma-KAL_3	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-KAL_4	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-PEN_1	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-PEN_2	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-PEN_3	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-PEN_4	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-PEN_5	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-AIR_4	0,009	0,006	0,009	0,076	0,076	0,009	0,109	0,076	0,076	0,234	0,087	0,076	0,083	0,076	0,076	0,076
M.melanotoma-AIR_5		0,009	0,006	0,073	0,073	0,006	0,106	0,073	0,073	0,238	0,084	0,073	0,080	0,073	0,073	0,073
M.melanotoma-AIR_6	0,009		0,003	0,069	0,069	0,003	0,102	0,069	0,069	0,243	0,080	0,069	0,076	0,069	0,069	0,069
M.melanotoma-AIR_2	0,006	0,003		0,066	0,066	0,000	0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-KRT_2	0,073	0,069	0,066		0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
M.melanotoma-KRT_3	0,073	0,069	0,066	0,000		0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
M.melanotoma-AIR_3	0,006	0,003	0,000	0,066	0,066		0,098	0,066	0,066	0,239	0,077	0,066	0,073	0,066	0,066	0,066
M.melanotoma-KRT_1	0,106	0,102	0,098	0,032	0,032	0,098		0,032	0,032	0,197	0,036	0,032	0,032	0,032	0,032	0,032
M.pygmaeus-AUA_1	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032		0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
M.pygmaeus-KYP_1	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000		0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
M.pygmaeus-AUA_2	0,238	0,243	0,239	0,167	0,167	0,239	0,197	0,167	0,167		0,180	0,167	0,175	0,167	0,167	0,167
M.pygmaeus-XAL_6	0,084	0,080	0,077	0,010	0,010	0,077	0,036	0,010	0,010	0,180		0,010	0,010	0,010	0,010	0,010
M.pygmaeus-SPN_2	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010		0,006	0,000	0,000	0,000
M.pygmaeus-SPN_3	0,080	0,076	0,073	0,006	0,006	0,073	0,032	0,006	0,006	0,175	0,010	0,006		0,006	0,006	0,006
M.pygmaeus-AUA_4	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006		0,000	0,000
M.pygmaeus-AUA_5	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000		0,000
M.pygmaeus-KYP_3	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	
M.pygmaeus-KYP_4	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
M.pygmaeus-KRT_4	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
M.pygmaeus-KRT_5	0,069	0,073	0,069	0,003	0,003	0,069	0,036	0,003	0,003	0,162	0,013	0,003	0,010	0,003	0,003	0,003
M.pygmaeus-KRT_6	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
M.pygmaeus-SPN_1	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
M.pygmaeus-AUA_3	0,101	0,097	0,094	0,035	0,035	0,094	0,062	0,035	0,035	0,183	0,045	0,035	0,042	0,035	0,035	0,035
M.pygmaeus-KYP_2	0,073	0,069	0,066	0,000	0,000	0,066	0,032	0,000	0,000	0,167	0,010	0,000	0,006	0,000	0,000	0,000
M.pygmaeus-KRT_1	0,120	0,120	0,116	0,052	0,052	0,116	0,081	0,052	0,052	0,168	0,063	0,052	0,059	0,052	0,052	0,052
M.pygmaeus-KRT_2	0,080	0,083	0,080	0,013	0,013	0,080	0,046	0,013	0,013	0,162	0,022	0,013	0,019	0,013	0,013	0,013
M.pygmaeus-KRT_3	0,310	0,314	0,309	0,225	0,225	0,309	0,248	0,225	0,225	0,350	0,235	0,225	0,234	0,225	0,225	0,225
M.pygmaeus-XAL_1	0,109	0,112	0,108	0,039	0,039	0,108	0,073	0,039	0,039	0,205	0,049	0,039	0,045	0,039	0,039	0,039
M.pygmaeus-XAL_2	0,076	0,073	0,069	0,003	0,003	0,069	0,036	0,003	0,003	0,171	0,013	0,003	0,010	0,003	0,003	0,003
M.pygmaeus-XAL_3	0,097	0,094	0,090	0,022	0,022	0,090	0,056	0,022	0,022	0,184	0,032	0,022	0,029	0,022	0,022	0,022
M.pygmaeus-XAL_4	0,080	0,076	0,073	0,006	0,006	0,073	0,039	0,006	0,006	0,175	0,016	0,006	0,013	0,006	0,006	0,006
M.pygmaeus-XAL_5	0,083	0,080	0,076	0,009	0,009	0,076	0,042	0,009	0,009	0,175	0,019	0,009	0,016	0,009	0,009	0,009

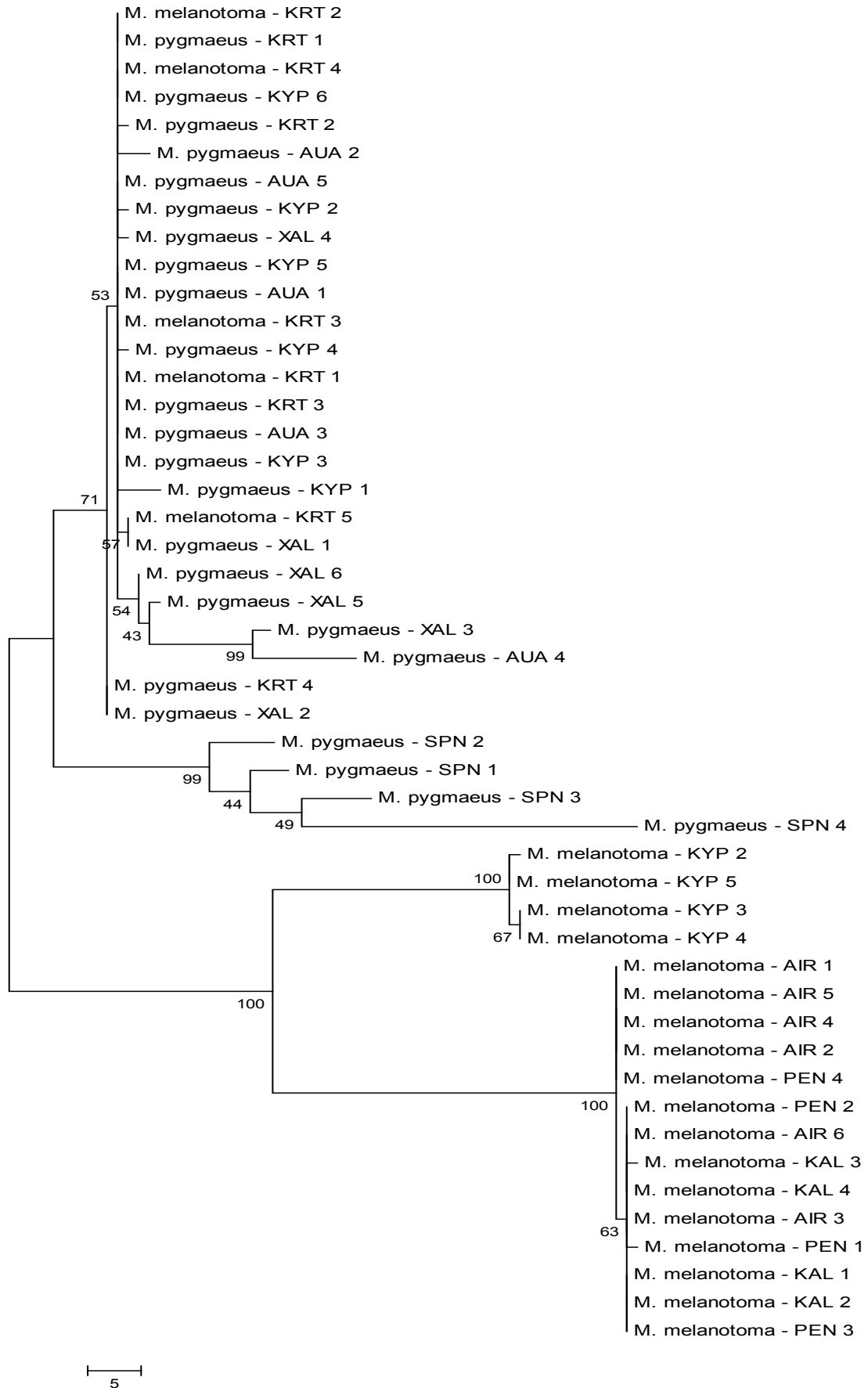
	M.pygmaeus-KYP_4	M.pygmaeus-KRT_4	M.pygmaeus-KRT_5	M.pygmaeus-KRT_6	M.pygmaeus-SPN_1	M.pygmaeus-AUA_3	M.pygmaeus-KYP_2	M.pygmaeus-KRT_1	M.pygmaeus-KRT_2	M.pygmaeus-KRT_3	M.pygmaeus-XAL_1	M.pygmaeus-XAL_2	M.pygmaeus-XAL_3	M.pygmaeus-XAL_4	M.pygmaeus-XAL_5
M.melanotoma-KAL_2	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-KYP_4	0,279	0,279	0,284	0,279	0,279	0,322	0,279	0,341	0,294	0,490	0,310	0,278	0,302	0,278	0,287
M.melanotoma-KYP_5	0,279	0,279	0,284	0,279	0,279	0,322	0,279	0,341	0,294	0,483	0,310	0,278	0,302	0,278	0,287
M.melanotoma-KYP_6	0,279	0,279	0,284	0,279	0,279	0,322	0,279	0,341	0,294	0,483	0,310	0,278	0,302	0,278	0,287
M.melanotoma-KYP_7	0,279	0,279	0,284	0,279	0,279	0,322	0,279	0,341	0,294	0,490	0,310	0,278	0,302	0,278	0,287
M.melanotoma-AIR_1	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-KYP_2	0,106	0,106	0,102	0,106	0,106	0,128	0,106	0,132	0,102	0,350	0,141	0,110	0,132	0,114	0,117
M.melanotoma-KYP_3	0,132	0,132	0,131	0,132	0,132	0,139	0,132	0,153	0,143	0,318	0,151	0,128	0,136	0,132	0,128
M.melanotoma-KAL_3	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-KAL_4	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-PEN_1	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-PEN_2	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-PEN_3	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-PEN_4	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-PEN_5	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-AIR_4	0,076	0,076	0,073	0,076	0,076	0,097	0,076	0,116	0,083	0,315	0,119	0,080	0,094	0,083	0,087
M.melanotoma-AIR_5	0,073	0,073	0,069	0,073	0,073	0,101	0,073	0,120	0,080	0,310	0,109	0,076	0,097	0,080	0,083
M.melanotoma-AIR_6	0,069	0,069	0,073	0,069	0,069	0,097	0,069	0,120	0,083	0,314	0,112	0,073	0,094	0,076	0,080
M.melanotoma-AIR_2	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-KRT_2	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.melanotoma-KRT_3	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.melanotoma-AIR_3	0,066	0,066	0,069	0,066	0,066	0,094	0,066	0,116	0,080	0,309	0,108	0,069	0,090	0,073	0,076
M.melanotoma-KRT_1	0,032	0,032	0,036	0,032	0,032	0,062	0,032	0,081	0,046	0,248	0,073	0,036	0,056	0,039	0,042
M.pygmaeus-AUA_1	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-KYP_1	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-AUA_2	0,167	0,167	0,162	0,167	0,167	0,183	0,167	0,168	0,162	0,350	0,205	0,171	0,184	0,175	0,175
M.pygmaeus-XAL_6	0,010	0,010	0,013	0,010	0,010	0,045	0,010	0,063	0,022	0,235	0,049	0,013	0,032	0,016	0,019
M.pygmaeus-SPN_2	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-SPN_3	0,006	0,006	0,010	0,006	0,006	0,042	0,006	0,059	0,019	0,234	0,045	0,010	0,029	0,013	0,016
M.pygmaeus-AUA_4	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-AUA_5	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-KYP_3	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-KYP_4		0,000	0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-KRT_4	0,000		0,003	0,000	0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-KRT_5	0,003	0,003		0,003	0,003	0,038	0,003	0,052	0,009	0,229	0,042	0,006	0,026	0,010	0,013
M.pygmaeus-KRT_6	0,000	0,000	0,003		0,000	0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-SPN_1	0,000	0,000	0,003	0,000		0,035	0,000	0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-AUA_3	0,035	0,035	0,038	0,035	0,035		0,035	0,083	0,048	0,237	0,062	0,038	0,045	0,042	0,032
M.pygmaeus-KYP_2	0,000	0,000	0,003	0,000	0,000	0,035		0,052	0,013	0,225	0,039	0,003	0,022	0,006	0,009
M.pygmaeus-KRT_1	0,052	0,052	0,052	0,052	0,052	0,083	0,052		0,049	0,255	0,076	0,056	0,062	0,059	0,062
M.pygmaeus-KRT_2	0,013	0,013	0,009	0,013	0,013	0,048	0,013	0,049		0,243	0,052	0,016	0,035	0,019	0,022
M.pygmaeus-KRT_3	0,225	0,225	0,229	0,225	0,225	0,237	0,225	0,255	0,243		0,214	0,220	0,217	0,225	0,212
M.pygmaeus-XAL_1	0,039	0,039	0,042	0,039	0,039	0,062	0,039	0,076	0,052	0,214		0,035	0,042	0,032	0,029
M.pygmaeus-XAL_2	0,003	0,003	0,006	0,003	0,003	0,038	0,003	0,056	0,016	0,220	0,035		0,019	0,003	0,006
M.pygmaeus-XAL_3	0,022	0,022	0,026	0,022	0,022	0,045	0,022	0,062	0,035	0,217	0,042	0,019		0,022	0,019
M.pygmaeus-XAL_4	0,006	0,006	0,010	0,006	0,006	0,042	0,006	0,059	0,019	0,225	0,032	0,003	0,022		0,009
M.pygmaeus-XAL_5	0,009	0,009	0,013	0,009	0,009	0,032	0,009	0,062	0,022	0,212	0,029	0,006	0,019	0,009	

Πίνακας 3-7: Γενετικές αποστάσεις των πληθυσμών των δύο ειδών με ανάλυση pairwise για το γονίδιο 12sr (Dessimoz *et al*, 2008)

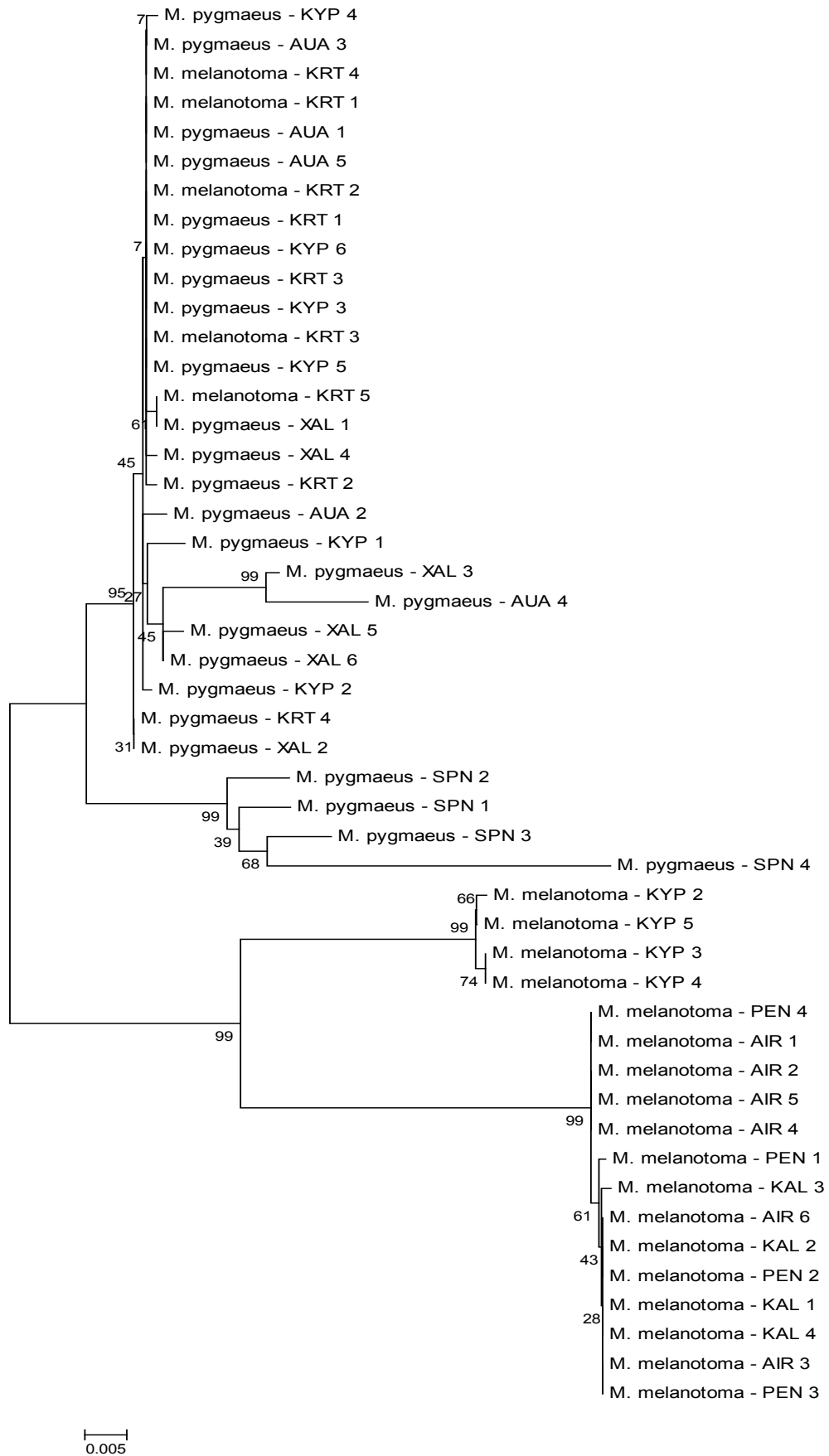
(Με κόκκινο εμφανίζεται η μέγιστη τιμή, με μπλε η ελάχιστη και με πράσινο η διάμεσος).



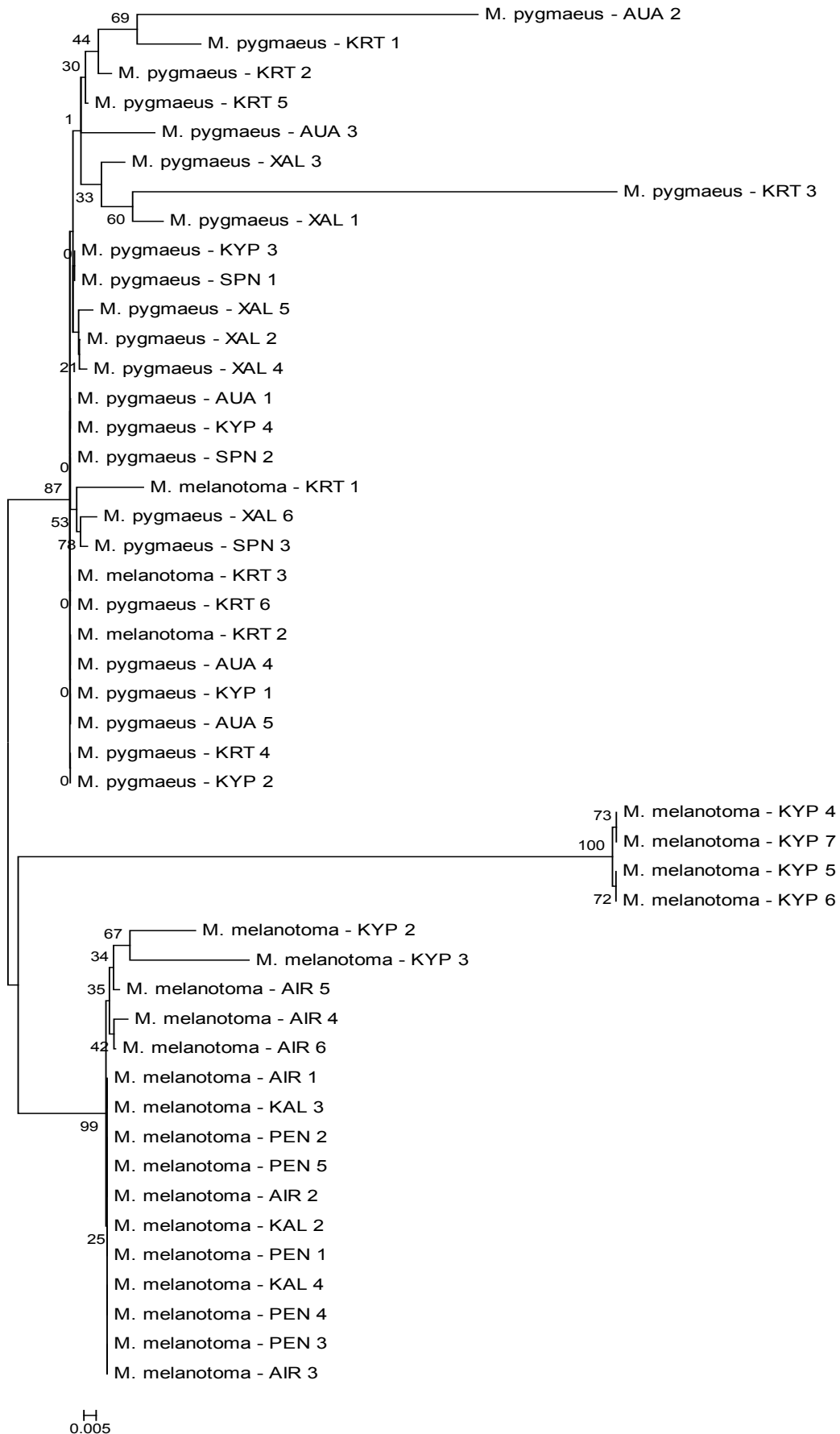
Εικόνα 3-5: Φυλογενετικό δένδρο για το γονίδιο COI κατασκευασμένο με τη μέθοδο Ελάχιστης Εξέλιξης (Minimum Evolution) (Rzhetsky and Nei, 1993) - Bootstrap.



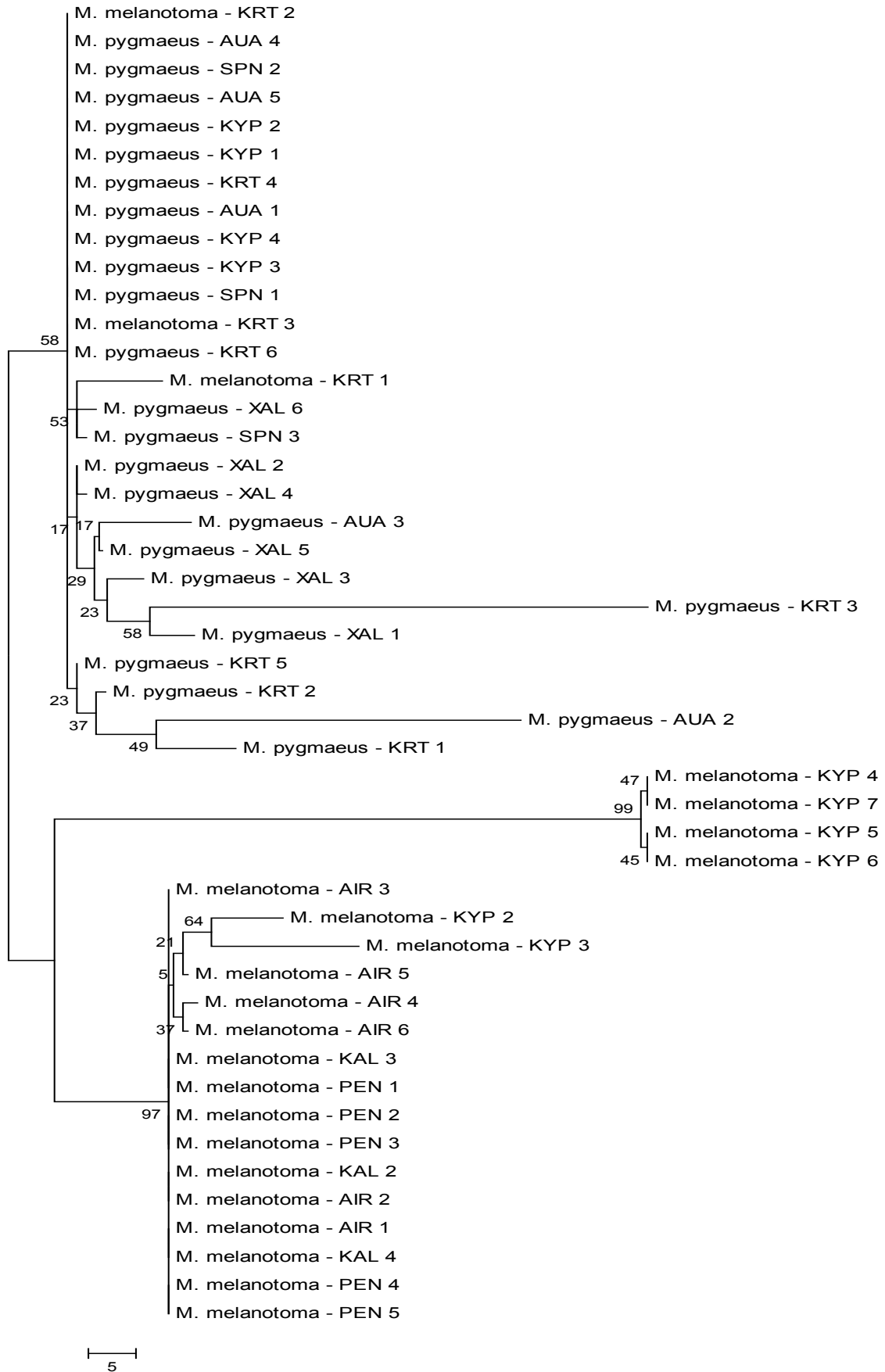
Εικόνα 3-6: Φυλογενετικό δένδρο για το γονίδιο COI κατασκευασμένο με τη μέθοδο Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony) (Saitou and Imanishi, 1989) - Bootstrap.



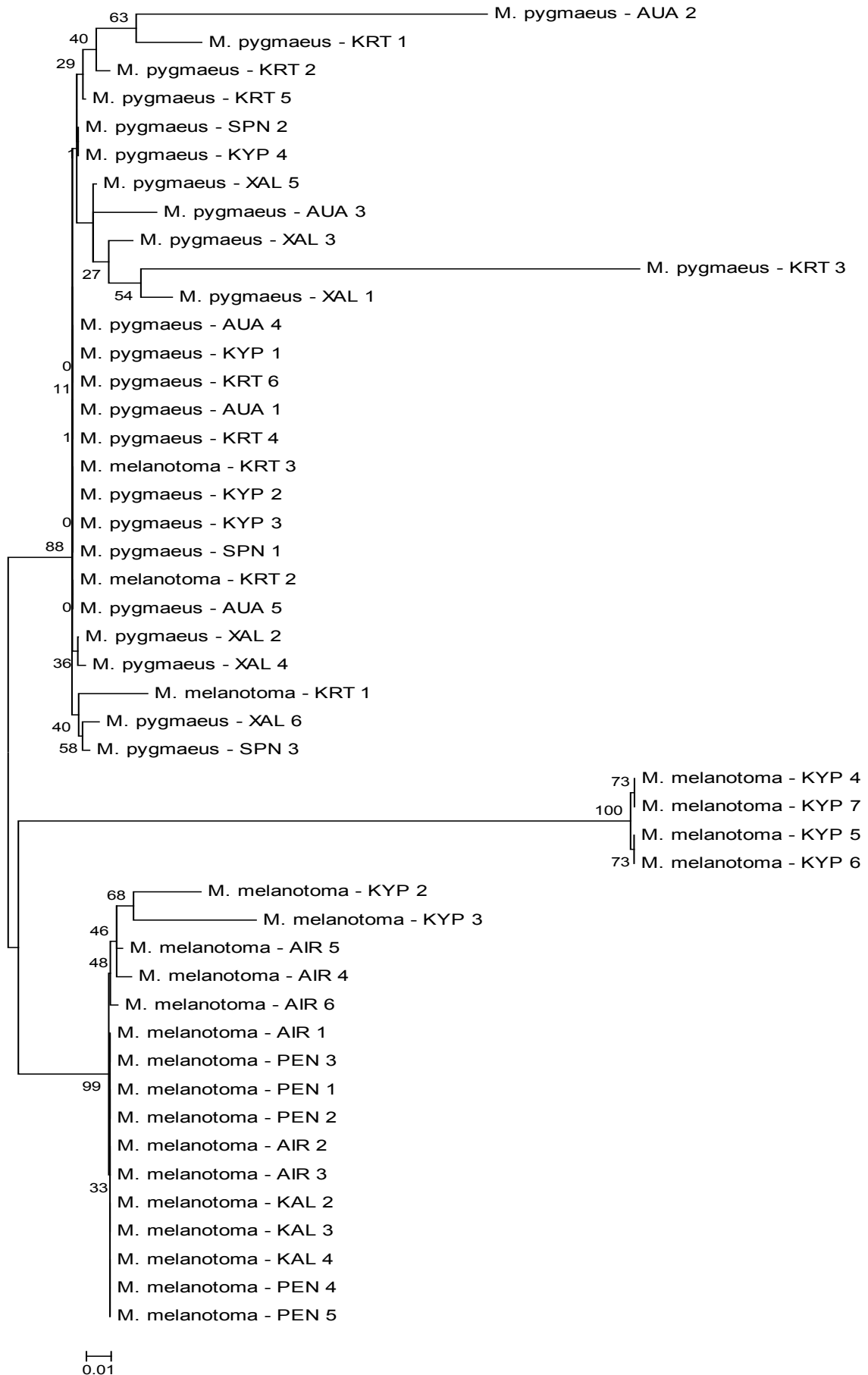
Εικόνα 3-7: Φυλογενετικό δένδρο για το γονίδιο COI κατασκευασμένο με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) - Bootstrap.



Εικόνα 3-8: Φυλογενετικό δένδρο για το γονίδιο 12Sr κατασκευασμένο με τη μέθοδο Ελάχιστης Εξέλιξης (Minimum Evolution) (Rzhetsky and Nei, 1993) - Bootstrap.



Εικόνα 3-9: Φυλογενετικό δένδρο για το γονίδιο 12sr κατασκευασμένο με τη μέθοδο Μέγιστης Φειδωλότητας (Maximum Parsimony) (Saitou and Imanishi, 1989) - Bootstrap.



Εικόνα 3-10: Φυλογενετικό δένδρο για το γονίδιο 12sr κατασκευασμένο με τη μέθοδο Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) - Bootstrap.

4

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Τα δύο έντομα που εξετάστηκαν στη μελέτη αυτή έχουν προκαλέσει το ενδιαφέρον ως προς τη συστηματική τους κατάταξη λόγω της ιδιαίτερης σημασίας τους στην ολοκληρωμένη αντιμετώπιση, ως αρπακτικά. Στόχος ήταν η διερεύνηση μίας αποτελεσματικής μεθόδου ώστε να διακρίνονται τα δύο είδη, τα οποία μοιάζουν τόσο πολύ ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Επιπλέον, να ξεκαθαριστεί ότι όντως αναφερόμαστε σε δύο διαφορετικά είδη του γένους *Macrolophus*. Στο πλαίσιο αυτό εξετάστηκαν ως προς τις μορφολογικές τους διαφορές και πραγματοποιήθηκαν διασταυρώσεις μεταξύ τους, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκαν δύο νέοι μοριακοί δείκτες (COI-barcode, 12srDNA) για τον προσδιορισμό των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών.

Ως προς τα μορφολογικά χαρακτηριστικά που εξετάστηκαν (πρώτο άρθρο κεραίας), δεν φαίνεται να μπορούν να διακρίνουν αποτελεσματικά τα δύο είδη μεταξύ τους. Όπως μαρτυρούν οι πίνακες 3-1 και 3-2 το σύνολο των ατόμων που συλλέχθηκαν από φυτά της οικογένειας Solanaceae ανεξάρτητα από την περιοχή, είχαν μαύρο ολόκληρο το πρώτο άρθρο της κεραίας τους. Αντίθετα, σε εκείνα του ζιζανίου *Dittrichia viscosa* παρατηρήθηκαν και οι δύο τύποι. Η αναλογία στο σύνολο ήταν περίπου 1:1, όμως αυτό δεν είναι ούτε αντιπροσωπευτικό ούτε απόλυτο, καθώς απαιτείται η εξέταση περισσότερων ατόμων ανά πληθυσμό. Ο στόχος αυτής της παρατήρησης ήταν να διαπιστωθεί κατά πόσο το χρώμα του πρώτου άρθρου της κεραίας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαγνωστικό χαρακτηριστικό διάκρισης των δύο ειδών και όχι να γίνουν στατιστικές αναλύσεις.

Εντύπωση προκαλεί ο πληθυσμός της Κρήτης του *M. melanotoma*, όπου όλα τα άτομα φέρουν μαύρη περιοχή. Φαίνεται να βρίσκεται πιο κοντά από άποψη μορφολογικών χαρακτηριστικών στο *M. pygmaeus* παρά στο *M. melanotoma*. Ίσως, όμως, να είναι τυχαίο καθώς όπως ήδη ειπώθηκε ο πληθυσμός είναι μικρός ώστε να εξαχθούν τέτοιου είδους συμπεράσματα. Επιπλέον, διαπιστώνεται ότι δε υπάρχει αντιστοιχία του φύλου με το χρώμα. Θα μπορούσε, λοιπόν, να ειπωθεί ότι το είδος *M. pygmaeus* περιλαμβάνει άτομα με μαύρο πρώτο άρθρο, ενώ το *M. melanotoma* εξολοκλήρου μαύρο ή με μία λευκή γραμμή. Αυτή είναι άποψη με την οποία συμφωνούν και οι Perdikis *et al.* σε αντίστοιχη μελέτη που πραγματοποίησαν (Perdikis *et al.*, 2003). Έχοντας, λοιπόν, ένα άτομο με μαύρο άρθρο δεν μπορεί να ταξινομηθεί ως προς το ένα ή το άλλο είδος.

Ένα άλλο χαρακτηριστικό που οι Martinez-Cascales *et al.* (Martinez-Cascales *et al.*, 2006) εξέτασαν και υποστηρίζουν ότι θα μπορούσε να διακρίνει τα δύο είδη είναι μία μαύρη ζώνη που βρίσκεται στο πλάγιο μέρος της κεφαλής και πίσω από τους οφθαλμούς. Στο *M. pygmaeus* αυτή είναι αχνή και με όρια που δεν είναι καλά προσδιορισμένα, σε αντίθεση με το *M. melanotoma* όπου η περιοχή αυτή είναι πιο προσδιορισμένη και οξυκατάλυκτη. Όμως, στα δείγματα που συλλέχθηκαν και εξετάστηκαν κατά τη διάρκεια

της μεταπτυχιακής αυτής μελέτης δεν διαπιστώθηκε αυτή η διάκριση και γι' αυτό δεν συμπεριλήφθηκε το γνώρισμα αυτό.

Στη συνέχεια, οι διασταυρώσεις που πραγματοποιηθήκαν είχαν ως στόχο να μελετηθεί από μία άλλη οπτική γωνία το κατά πόσο αναφερόμαστε σε δύο διαφορετικά είδη. Και αυτό είναι σαφές καθώς δεν προέκυψαν γόνιμοι απόγονοι παρά μόνο στην περίπτωση των μαρτύρων. Τα αποτελέσματα ήταν ίδια ανεξαρτήτως του φυτού ξενιστή που χρησιμοποιήθηκε, ο οποίος απ' ό,τι φαίνεται δεν επηρεάζει την εγκατάσταση και ανάπτυξη των δύο ειδών. Πρέπει να σημειωθεί ότι το συμπέρασμα αυτό αναφέρεται μόνο για τα συγκεκριμένα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν στην πειραματική διαδικασία (*Dittrichia viscosa*, *Solanum nigrum*, *Phaseolus vulgaris*) και δεν μπορεί να γενικευτεί. Φαίνεται όμως, ότι τα δύο είδη προτιμούν διαφορετικούς ξενιστούς, με το *M. pygmaeus* να προτιμά φυτά της οικογένειας Solanaceae και το *M. melanotoma* το αυτοφυές *Dittrichia viscosa*. Εντοπίζοντας, δηλαδή, το φυτό μπορούμε να ξέρουμε ποιο είδος από τα δύο υπάρχει και ουσιαστικά επιβεβαιώνονται τα αποτελέσματα των Perdikis *et al*, για τα δύο αυτά είδη (Perdikis *et al*, 2003).

Το επόμενο πειραματικό κομμάτι που πραγματοποιήθηκε αφορούσε την ανάλυση και τον προσδιορισμό αλληλουχίας γονιδιακών τμημάτων μιτοχονδρικού DNA. Τα δύο γονιδιακά τμήματα που επιλέχθηκαν δεν έχουν εφαρμοστεί ξανά σε ερευνητικό επίπεδο για τα συγκεκριμένα είδη και οι πληροφορίες που παρέχουν είναι σημαντικές. Επιπλέον, νέα είναι και η προσπάθεια που γίνεται για εύρεση ομοιοτήτων και διαφορών σε επίπεδο πληθυσμών εντός του κάθε είδους.

Αρχικά, φαίνεται ότι αναφερόμαστε για δύο διαφορετικά είδη τόσο μελετώντας τις γενετικές αποστάσεις στους πίνακες 3-6 και 3-7 όσο και τα φυλογενετικά δένδρα που κατασκευάστηκαν (Εικόνες 3-5 – 3-10). Οι γενετικές αποστάσεις από το ένα είδος στο άλλο είναι μεγαλύτερες απ' ό,τι στους πληθυσμούς του ενός. Ακόμα, στα φυλογενετικά δένδρα οι δύο κύριοι κλάδοι που δημιουργούνται αντιπροσωπεύουν τα δύο είδη και πάλι διαχωρίζοντάς τα ευκρινώς. Η μόνη εξαίρεση είναι ο πληθυσμός της Κρήτης για το *M. melanotoma*, ο οποίος ομαδοποιείται με τους πληθυσμούς του είδους *M. pygmaeus*.

Ο πληθυσμός αυτός στάλθηκε στο Εργαστήριο από παραγωγό της Κρήτης, από τον οποίο διευκρινίστηκε αργότερα ότι δεν είχε συλλέξει τον πληθυσμό από το αυτοφυές φυτό *Dittrichia viscosa*, αλλά το δείγμα προήλθε από σκεύασμα εταιρείας. Με βάση τα αποτελέσματα καταλήγουμε στο ότι ενδεχομένως η εταιρεία αυτή χρησιμοποιεί και εμπορεύεται το είδος *M. pygmaeus* και όχι το *M. melanotoma* (= *M. caliginosus*), όπως ισχυρίζεται.

Στη διάκριση των ειδών με βάση τους μοριακούς δείκτες σε μιτοχονδριακό DNA αναφέρονται δύο άλλες ερευνητικές εργασίες (Perdikis *et al*, 2003; Martinez-Cascales *et al*, 2006). Οι Perdikis *et al* (2003) εφάρμοσαν τις μεθόδους RFLP's, RAPD-PCR με εκκινητές που σχετίζονται με το γονιδιακό τμήμα 16srRNA. Φαίνεται να πραγματοποιείται και σε αυτή την περίπτωση διάκριση των δύο ειδών, αν και στην

κατεύθυνση της εξέλιξης και της διάκρισης ειδών θεωρούνται καλύτερες οι μέθοδοι που εφαρμόζονται άμεσα στο γενετικό υλικό, από εκείνες που το αφορούν έμμεσα με τα προϊόντα του (ένζυμα). Ωστόσο και εκείνοι καταλήγουν σε δύο διαφορετικά είδη που μπορούν να διακριθούν με βάση τον ξενιστή τους. Η δεύτερη εργασία των Martinez-Cascales *et al* (2006) περιγράφει τον προσδιορισμό μιτοχονδριακού DNA για γονιδιακό τμήμα του κυτοχρώματος b (cyt b). Επιτεύχθηκε και πάλι διάκριση των δύο ειδών, αλλά το τμήμα που εξετάστηκε δεν συνηθίζεται να επιλέγεται για τέτοιου είδους διακρίσεις.

Σε επίπεδο πληθυσμών ανά είδος δεν έχει πραγματοποιηθεί προηγούμενη μελέτη και δεδομένων των αποτελεσμάτων που προέκυψαν στην παρούσα, θα πρέπει να εξεταστεί πιο διεξοδικά στο μέλλον. Συγκεκριμένα, για το είδος *M. pygmaeus* δεν υπάρχει κάποια ξεκάθαρη ομαδοποίηση εκτός από τον πληθυσμό της Ισπανίας που είναι και λογικό αν σκεφτεί κανείς και την απόσταση του σημείου συλλογής του από τους υπόλοιπους. Για το είδος *M. melanotoma* μία ανάλογη ομαδοποίηση υπάρχει στους πληθυσμούς του Αερολιμένα Αθηνών και της Κυπαρισσίας. Φαίνεται, δηλαδή, οι πληθυσμοί να είναι πιο εντοπισμένοι πιθανώς λόγω των γεωγραφικών χαρακτηριστικών των περιοχών αυτών. Ο ορεινός όγκος του Ταυγέτου από την Ανατολή και το Ιόνιο Πέλαγος από τη Δύση φαίνεται να περιορίζουν τη διάδοση του πληθυσμού και μειώνουν την παραλλακτικότητά του. Ανάλογα, για το Αεροδρόμιο με τα φυσικά σύνορα (ανατολικά το Αιγαίο Πέλαγος, Βορειοδυτικά το όρος Πεντέλη και νοτιοδυτικά το όρος Υμηττός).

Εξετάζοντας μία άλλη πλευρά του θέματος, ιδιαίτερη εντύπωση προκαλεί ο μεγάλος αριθμός των απλότυπων που παρατηρήθηκαν ανά γονίδιο. Η ερμηνεία που μπορεί να δοθεί είναι ότι αφενός υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα και εντός των πληθυσμών σε κάθε είδος και αφετέρου οι γονείς σε κάθε πληθυσμό-αποικία είναι πολλοί και κυρίως τα θηλυκά από τα οποία θα προκύψουν οι απόγονοι. Εκτός των άλλων δεν αποκλείεται και η περίπτωση κάποια από τα άτομα να έχουν υποστεί μεταλλαγές οι οποίες διαφοροποιούν το γενετικό τους υλικό.

Συμπερασματικά, είναι ξεκάθαρο ότι το φυτό ξενιστής και οι μοριακοί δείκτες που επιλέχθηκαν στην παρούσα μελέτη είναι ικανοί να διακρίνουν τα είδη *M. pygmaeus* και *M. melanotoma* μεταξύ τους. Σχετικά με τους δύο δείκτες, το COI είναι αποτελεσματικότερο του 12sr, κάτι που αναφέρεται και σε βιβλιογραφικά δεδομένα (Ferre *et al*, 2009). Κατά το στάδιο της ηλεκτροφόρησης οι ζώνες που δημιουργούνται στο πήγμα είναι πιο συγκροτημένες, ενώ έχει μεγαλύτερο ποσοστό συστοίχισης με τις κατατεθειμένες αλληλουχίες στην Genbank. Επιπλέον, ο δείκτης βεβαιότητας (bootstrap) που εμφανίζεται στα φυλογενετικά δένδρα που κατασκευάστηκαν είναι μεγαλύτερος.

Η διάκριση είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη σωστή και άρτια εφαρμογή τους ως βιολογικούς παράγοντες στα πλαίσια της ολοκληρωμένης και βιολογικής αντιμετώπισης εχθρών καλλιεργειών. Έχοντας πληροφορίες από προηγούμενες μελέτες που αφορούν τις βιο-οικολογικές ιδιότητες και τη συμπεριφορά των δύο ειδών είναι δυνατό να επιλεγεί το

καταλληλότερο αρπακτικό από τα δύο ανάλογα με την καλλιέργεια όπου θα εξαπολυθεί, τον εχθρό που θα κληθεί να αντιμετωπίσει και τις κλιματικές συνθήκες που επικρατούν. Χρειάζεται περαιτέρω μελέτη για τη διερεύνηση της ενδοειδικής ποικιλότητας των ειδών και ενδεχομένως τον συσχετισμό της με την αρπακτικότητα και άλλες ιδιότητες που επηρεάζουν την ικανότητά τους ως βιολογικούς παράγοντες. Με την εξέταση περισσότερων πληθυσμών σε κάθε είδος και τις συγκρίσεις μεταξύ τους θα μπορούσε στο μέλλον να δοθεί κάποια σχετική απάντηση.

5

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adams, J.** (2005) Nuclear and mitochondrial DNA in the courtroom. *J. Law Policy* 13: 69-97.
- Albajes, R., and Alomar, O.** (1999) Current and potential used of polyphagous predators: Integrated pest and disease management in greenhouse crops, *Kluwer Academic Publisher, Dordrecht* 265-275.
- Alomar, O., Goula, M., Albajes, R.** (1994) Mirid bugs for biological control: identification, survey in non-cultivated winter plants, and colonization of tomato fields. *IOBC/WPRS Bul.* 17: 217-223.
- Alomar, O., Goula, M., Albajes, R.** (2002) Colonization of tomato fields by predatory mirid bugs (Hemiptera: Heteroptera) in northern Spain. *Agr. Ecosyst. Environ.* 89: 105-115.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Anderson, A.** (1997) A short item on a couple of soil reclamation plants, *Atropa belladonna* and *Solanum nigrum*. *New Sc. IPC Mag.* Ltd, London.
- Ausubel, J.H.** (2009) A botanical macroscope. *PNAS* 106 (31): 12569-12570.
- Avise, J.C.** (2000) Phylogeography: The history and formation of species. *Cambridge, Massachusetts, Harvard University Press.* 447 pp.
- Baum, D.A., and Offner, S.** (2008) Phylogenies and tree thinking. *American Biology Teacher* 70: 222-229.
- Bonato, O., Couton, L., Fargues, J.** (2006) Feeding preference of *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) on *Bemisia tabaci* and *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae) *J. Econ. Entomol.* 99 (4):1143-1151.
- Britten, R.J. and Kohne, D.E.** (1968) Repeated sequences in DNA. *Science* 161: 529-540.
- Carapezza, A.** (1995) The specific identities of *Macrolophus melanotoma* (Costa, A. 1853) and *Stenodema curticolle* (Costa, A. 1853) (Insecta Heteroptera, Miridae). *Natural. Silic.* 19: 295-298.
- Castane, C., Alomar, O., Goula, M., Gabarra, R.** (2004) Colonization of tomato greenhouses by the predatory mirid bugs *Macrolophus caliginosus* and *Dicyphus tamaninii*. *Biol. Control.* 30: 591-597.
- Cavalli-Sforza, L.L. and Edwards, A.W. F.** (1964) Phylogenetic sites and the mechanism of evolution of evolution in human mitochondrial DNA. *Genetics* 106: 479-499.

- CRC Australian Weed Management.** (2003), False yellowhead- *Dittrichia viscosa*. Alert List for Environmental Weeds.
- Dean, D.E., and Schuster, D.J.** (1995) *Bemisia argentifolii* (Homoptera:Aleyrodidae) and *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera: Aphididae) as prey for two species of Chrysopidae. *Environ. Entomol.* 24: 1562-1568.
- DeBach, P.** (1964) Biological control of insect pests and weeds. *Chapman and Hall Ltd.* London.
- Dessimoz, C., Margadant, D., Gonnet, G.H.** (2008) DLIGHT – Lateral gene transfer detection using pairwise evolutionary distances in a statistical framework. [RECOMB 08: Research in computational molecular biology.] *SpringerLink* 4955: 315-330.
- Doutt, R.L.** (1958) Vice, Virtue, and the Vedula. *Entomol Society Am* 4: 119-123.
- Enkegaard, A., Brødsgaard, H.F., Hansen, D.L.** (2001) *Macrolophus caliginosus*: Functional response to whiteflies and preference and switching capacity between whiteflies and spider mites. *Entomol. Exp. Applic.* 101: 81-88.
- Fantinou, A.A., Perdikis, D.Ch., Lambropoulos, P.D., Maselou, D.A.** (2009) Preference and consumption of *Macrolophus pygmaeus* preying on mixed instar assemblages of *Myzus persicae*. *Biol. Control* 51 (1): 76-80.
- Fantinou, A.A., Perdikis, D.Ch., Maselou, D.A., Lambropoulos, P.D.** (2008) Prey killing without consumption: Does *Macrolophus pygmaeus* show adaptive foraging behaviour? *Biol. Control* 47: 187-193.
- Farris, J.S.** (1977) Phylogenetic analysis under Dollo's law. *Syst. Zool.* 26: 77-88.
- Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., Guerrero, R., Ferté, H., Bandi, C., Martin, C., Casiraghi, M.** (2009) Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Front Zool.* 6: 1.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R.** (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3: 294-299.
- Hebert, P.D., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R.** (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B* 270: 313-322.
- Hoy, A.M.** (1994) Insect molecular genetics: An introduction to principles and applications. Eds. *Academic Press* 545 pp.

- Josifov, M.** (1992) Zur taxonomie der paläarktischen *Macrolophus*. *Arten. Reichenbachia* 29: 1-4.
- Kavallieratos, N.G., Strathas, G.J., Athanassiou, C.G., Papdoulis, G.T.** (2002) *Dittrichia viscosa* and *Rubus ulmifolius* as reservoirs of aphid parasitoids (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae) and the role of certain coccinellid species. *Phytoparasitica* 30 (3): 231-242.
- Kleppe, K., Ohtsuka, E., Kleppe, R., Molineux, I., Khorana, H.G.** (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56: 341-361.
- Kluge, A.G., and Farris, J.S.** (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Zool.* 18: 1-32.
- Kondo, R., Matsuura, E.T., Chigusa, S.I.** (1992) Further observation of paternal transmission of *Drosophila* mitochondrial DNA by PCR selective amplification method. *Genet. Res.* 59 (2): 81-84.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M.** (2004) Mega3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinf.* 5: 150-163.
- Librado, P., and Rozas, J.** (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Lozier, J.D., Roderick, G.K., Mills, N.J.** (2007) Genetic evidence from mitochondrial, nuclear, and endosymbiont markers for the evolution of host plant associated species in the aphid genus *Hyalopterus* (Hemiptera: Aphididae). *Evolution* 61: 1353-1367.
- Lucas, E., and Alomar, O.** (2001) *Macrolophus caliginosus* (Wagner) as an intraguild prey for the zoophytophagous *Dicyphus tamaninii* Wagner (Heteroptera: Miridae). *Biol. Control* 20: 147-152.
- Lykouressis, D.P., Perdikis, D.Ch., Chalkia, Ch.A.** (1999-2000) The effects of natural enemies on aphid populations on processing tomato. *Entomologia Hellenica* 13: 35-42.
- Lykouressis, D., Perdikis, D., Tsagarakis, A.** (2000) Polyphagous mirids in Greece: Host plants and abundance in traps placed in some crops. *Bol Lab Entomol Agraria Filippo Silvestri* 56: 57-68.
- Malais, M.H. and Ravensberg, W.J.** (2003) Knowing and recognizing: the biology of glasshouse pests and their natural enemies. *The Neatherlands - Koppert B.V. and Reed Business Information* 76-78.

- Malausá**, J.C., Drescher, J., Franco, E. (1987) Perspectives for the use of a predaceous bug *Macrolophus caliginosus* Wagner (Heteroptera: Miridae) on glasshouses crops. *Bull. OILB/SROP*, 10 (2): 106-107.
- Maleki**, F., Ashouri, A., Mohaghegh, J., Bandani, A.R. (2006) Effect of some diets on *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae) fitness under laboratory conditions. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* 71(2 Pt B): 393-397.
- Margaritopoulos**, J.T., Gotosopoulos, B., Mamuris Z., Skouras, P.J., Voudouris, K.C., Bacandritsos, N., Fantinou, A.A. and Tsitsipis, J.A. (2007) Genetic variation among mediterranean populations of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) as revealed by RFLP mtDNA analysis. *Bul Entomol Res* 97: 299-308.
- Martinez-Cascales**, J.I., Cenis, J.L., Cassis, G., Sanchez, J.A. (2006) Species identity of *Macrolophus melanotoma* (Costa 1853) and *Macrolophus pygmaeus* (Rambur 1839) (Insecta: Heteroptera: Miridae) based on morphological and molecular data and bionomic implications. *Insect Syst. Evol.* 37: 385-404.
- Martinez-Cascales**, J.I., Cenis, J.L., Sanchez, J.A. (2006) Differentiation of *Macrolophus pygmaeus* (Rambur 1839) and *Macrolophus melanotoma* (Costa 1853) (Heteroptera: Miridae) based on molecular data. *IOBC/ WPRS Bul.* 29: 223-228.
- Martinez-Cascales**, J.I., Sanchez, J.A. Geographical and host plant distribution of *Macrolophus* key species. *NCBI* [Unpublished (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)].
- Meikle**, R.D. (1977-1985) Flora of Cyprus. [= *Inula viscosa* (L.) Aiton].
- Meusel**, M.S., Moritz, R.F. (1993). Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs. *Curr. Genet.* 24 (6): 539-543.
- Mohd**, R.Z., Fauziah, I., Wan Mohamad, W.A.K., Syed, A., Salmah, M.R., Kamaruzaman, J. (2009) Biology of *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) Predator of *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *J. Biol.* 1: 63-70.
- Montserrat**, M., Albajes, R., Castañé, C. (2000) Functional response of four heteropteran predators preying on greenhouse whitefly (Homoptera: Aleurodidae) and western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). *Environ. Entomol.* 29: 1075–1082.
- Mosco**, M.C., Arduino, P., Bullini, L., Barbagallo, S. (1997) Genetic heterogeneity, reproductive isolation and host preferences in mealy aphids of the *Hyalopterus pruni* complex (Homoptera, Aphidoidea). *Mol Ecol* 6: 667-670.
- Mullis**, K.B. and Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalysed chain-reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.

- Oshaghi, M.A.** (2005) mtDNA inheritance in the mosquitoes of *Anopheles stephensi*. *Mitochondrion* 5: 266-271.
- Palumbi, S., Martin, A., Romano, S., McMillan, W.O., Stice, L., Grabowski, G.** (1991) The Simple Fool's Guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Version 2.0.
- Penny, D., Hendy, M.D., and Steel, M.A.** (1992) Progress with methods for constructing evolutionary trees. *Trends Ecol. Evol.* 7: 73-79.
- Perdikis, D. and Lykouressis, D.** (2000) Effects of various items, host plants and temperatures on the development and survival of *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae). *Biol. Control* 17: 55-60.
- Perdikis, D. and Lykouressis, D.** (2001-2002) Description of the egg and nymphal Instars of *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae). *Entomologia Hellenica* 14: 32-40.
- Perdikis, D.Ch.** (2002) A method for laboratory studies on the polyphagous predator *Macrolophus pygmaeus* Rambur (Hemiptera: Miridae). *J. Econ. Entomol.* 95: 44-49.
- Perdikis, D.Ch., Margaritopoulos, J.T., Stamatis, C., Mamuris, Z., Lykouressis, D.P., Tsitsipis, J.A., Pekas, A.** (2003) Discrimination of the closely related biocontrol agents *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae) and *M. pygmaeus* using mitochondrial DNA analysis. *Bull. Entomol. Res.* 93: 507-514.
- Perdikis, D., Favas, Ch., Lykouressis, D., Fantinou, A.** (2007) Ecological relationships between non-cultivated plants and insect predators in agroecosystems: the case of *Dittrichia viscosa* (Asteraceae) and *Macrolophus melanotoma* (Hemiptera: Miridae). *Acta Oecologica* 31: 299-306.
- Poulios, K.D., Margaritopoulos, J.T., and Tsitsipis, J.A.** (2007) Morphological separation of host adapted taxa within the *Hyalopterus pruni* complex (Hemiptera: Aphididae). *Eur. J. Entomol.* 104: 235-242.
- Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., Macelis, D.** (2007) REBASE--enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Res* 35 (Database issue): D269-270.
- Roche Company.** PCR Manual PCR: an outstanding method. *Roche* 65-81.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.

- Saitou, N., and Nei, M. (1987)** The Neighbor-Joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Saitou, N., Imanishi, T. (1989)** Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Mol. Biol. Evol.* 6: 514-525.
- Sambrook, J., Fritsch, A.F., Maniatis, T. (1989)** Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, second edition.
- Sanchez, J.A., Gillespie, D.R., McGregor, R.R. (2003)** The effects of mullein plants (*Verbascum thapsus*) on the population dynamics of *Dicyphus hesperus* (Heteroptera: Miridae) in tomato greenhouses. *Biol. Control* 28: 313-319.
- Sanchez, J.A., Martinez-Cascales, J.I., Cassis, G. (2006)** Description of a new species of *Dicyphus* Fieber (Insecta: Heteroptera: Miridae) from Portugal based on morphological and molecular data. *Ins. Syst. Evol.* 37 (3): 281-300.
- Sanger, F., and Coulson, A.R. (1975)** A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 441-448.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467.
- Schaefer, C.W., and Panizzi, A.R. (2000)** Heteroptera of economic importance. *CRC Press* 828 pp.
- Schmidt, J.E.U., Almeida, J.R.M., Rosati, C., and Arpaia, S. (2009)** Identification of trophic interactions between *Macrolophus caliginosus* (Heteroptera: Miridae) and *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) using real time PCR. *J. Biol. Control* 54: 383-391.
- Schuh, R.T., Weirauch, C., Wheeler, W.C. (2009)** Phylogenetic relationships within the Cimicomorpha (Hemiptera: Heteroptera): a total-evidence analysis *Syst. Entomol.* 34 (1): 15-48.
- Schwartz, M. and Vissing, J. (2002)** Paternal inheritance of mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* 347: 576-580.
- Sezonlin, M., Dupas, S., Le Rü, B., Le Gall, P., Moyal, P., Calatayud, P.A., Giffard, I., Faure, N., Silvain, J.F. (2006)** Phylogeography and population genetics of the maize stalk borer *Busseola fusca* (Lepidoptera, Noctuidae) in sub-Saharan Africa. *Mol. Ecol.* 15: 407-420.
- Simonsen, M., Mailund, T., and Pedersen C.N.S. (2008)** Algorithms in Bioinformatics: Rapid Neighbour-Joining. *Springer Berlin / Heidelberg* 5251: 113-122.

- Sneath**, P.H.A., and Sokal, R.R. (1973) Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. *San Francisco: Freeman* 573.
- Sperling**, F.A., Hickey, D.A. (1994) Mitochondrial DNA sequence variation in the spruce budworm species complex (Choristoneura: Lepidoptera). *Mol. Biol. Evol.* 11: 656-665.
- Sunnucks**, P. (2000) Efficient genetic markers for population biology. *Trends Ecol. Evol.* 15: 199-203.
- Takahashi**, K., and Nei, M. (2000) Efficiencies of fast algorithms of phylogenetic inference under the criteria of maximum parsimony, minimum evolution, and maximum likelihood when a large number of sequences are used. *Mol. Biol. Evol.* 17: 1251-1258.
- Thomson**, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Τσαπικούνης**, Φ.Α. (2002) Ζιζάνια: Χρήσιμα στοιχεία για την βιολογία και καταπολέμησή τους. *Εκδόσεις Σταμούλης*.
- Vandewoestijne**, S., Baguette, M., Brakefield, P.M., Saccheri, I.J. (2004) Phylogeography of *Aglais urticae* (Lepidoptera) based on DNA sequences of the mitochondrial COI gene and control region. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31(2): 630-646.
- Vences**, M., Thomas, M., van der Meijden, A., Chiari, Y., Vieites, D.R. (2005) Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Front. Zool.* 2: 5.
- Vos**, P., Hohers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 23: 4407-4414.
- Wheeler**, W.C., Schuh, R.T. Molecular systematics of heteroptera *NCBI* [Unpublished (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>)].
- Williams**, J.G., Kubelik, A.R., Livak, J., Rafalski, J.A., Tingery, S.V. (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* 18: 6531-6535.

Ηλεκτρονικές διευθύνσεις

<http://en.wikipedia.org>

<http://floraattica.blogspot.com>

<http://www.barcodinglife.com>

<http://www.botanical.com>

<http://www.dnabarcodes2009.org>

<http://www.kathimerini.gr>

<http://www.molecularstation.com>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>

<http://www.plantprotection.hu>