

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας

Τομέας Γενετικής

Εργαστήριο Γενετικής

Διατριβή Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης

Γενετική Δομή και Διαφοροποίηση Φυσικών

Πληθυσμών του Δάκου της Ελιάς,

Bactrocera oleae



Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών

«Βιοτεχνολογία και Εφαρμογές στη Γεωπονία»

Βασιλική Ανδρουτσοπούλου

Αθήνα, Νοέμβριος 2011

Μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής

Ηλίας Ηλιόπουλος, Καθηγητής, Τομέας Γενετικής,
Εργαστήριο Γενετικής Γ.Π.Α

Νικόλαος Κοσμίδης, Επίκουρος Καθηγητής, Τομέας
Γενετικής, Εργαστήριο Γενετικής Γ.Π.Α

Παρασκευή Σκαμνιώτη, Λέκτορας, Τομέας Γενετικής,
Εργαστήριο Γενετικής Γ.Π.Α

Επιβλέπων Επίκουρος Καθηγητής: Νικόλαος
Κοσμίδης



Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Γενετικής, στο τμήμα Γεωπονικής Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, κατόπιν προσωπικής μου επιθυμίας.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή κύριο Μιχαήλ Λουκά, που διετέλεσε Πρύτανης του Γ.Π.Α. και Διευθυντής του Εργαστηρίου Γενετικής επί σειρά ετών, για την τιμή που μου έκανε να με δεχτεί στο Εργαστήριο Γενετικής να εκπονήσω τόσο την πτυχιακή όσο και τη μεταπτυχιακή μου μελέτη. Το αναγνωρισμένο επιστημονικό του κύρος και η προσωπικότητά του ως άνθρωπος είναι μοναδικά και τον ευχαριστώ που συνέδραμε στην πορεία μου μέχρι σήμερα.

Εν συνεχεία, πολλά ευχαριστώ στον Καθηγητή και Διευθυντή του Εργαστηρίου Γενετικής, κύριο Ηλία Ηλιόπουλο που όντας σπάνιος και αξιόλογος ως άνθρωπος και ως επιστήμονας, μου προσέφερε πραγματικά συγκινητική βοήθεια σε ό,τι κι αν χρειάστηκα τα τελευταία τέσσερα χρόνια, από επιστημονικές συμβουλές έως και ψυχολογική στήριξη για να φέρω σε πέρας την εν λόγω διατριβή.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ οφείλω στον Επιβλέποντα Καθηγητή μου, Επίκουρο Καθηγητή κύριο Νικόλαο Κοσμίδη. Αποτέλεσε εξ αρχής πρότυπό μου ως προς την απaráμμιλη και εξαιρετική διδακτική του ικανότητα, που τον καθιστά μοναδικό στον τομέα αυτό, και εν συνεχεία εξελίχθηκε σε δάσκαλό μου, καθότι επέδειξε εξαιρετική υπομονή, καλή θέληση και στήριξη στο πρόσωπό μου τα τέσσερα χρόνια που είμαι υπό την επίβλεψή του ως προπτυχιακή αλλά και ως μεταπτυχιακή φοιτήτρια. Σας ευχαριστώ πολύ δάσκαλε που με μύησατε στα μυστικά της Επιστήμης της Γενετικής και για την εμπιστοσύνη που δείξατε στο πρόσωπό μου, σας ευχαριστώ για τις ώρες που αφιερώσατε στο έργο μου, γενικώς σας ευχαριστώ που μου κάνατε τη τιμή να είστε δάσκαλός μου!

Ευχαριστώ πάρα πολύ τη λέκτορα, κυρία Πάρης Σκαμνιώτη, για τη τιμή και χαρά που μου έκανε να συμμετέχει στην τριμελή μου επιτροπή.

Πάρα πολλά ευχαριστώ στις κυρίες Αίγλη Παπαθανασοπούλου, Αθηνά Ανδρέου και Δέσποινα Λουκά. Τις αγαπώ πολύ και τις ευχαριστώ για τις ατέλειωτες ώρες που περάσαμε μαζί στο εργαστήριο, για τις πολύτιμες συμβουλές και κυρίως για την ανεκτίμητη αγάπη, κατανόηση, φροντίδα και βοήθεια που μου προσέφεραν αφιλοκερδώς. Τις θεωρώ οικογένειά μου, πραγματικά, κι αυτό θεωρώ ότι τα λέει όλα..

Για την αμέριστη βοήθεια που μου προσέφεραν με τις συμβουλές

τους, την εμπιστοσύνη τους και την αγάπη τους ευχαριστώ ιδιαίτερα την Επίκουρη Καθηγήτρια κυρία Δήμητρα Μηλιώνη, τον Πρόεδρο του Τμήματός μας, Καθηγητή κύριο Δημήτρη Μπουράνη και τον Λέκτορα κύριο Ιορδάνη Χατζηπαυλίδη. Ελπίζω να μην διαψεύσω την πίστη τους σε μένα.

Πολλά ευχαριστώ στην αγαπημένη μου φίλη και Λέκτορα, Στέλλα Χωριανοπούλου. Η αγάπη και η βοήθειά της ήταν απλά ανεκτίμητες. Είναι τιμή μου να την έχω φίλη και να με θεωρεί κι εκείνη φίλη της.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τις προπτυχιακές φοιτήτριες Φερενίκη Περπεροπούλου, Φωτεινή Πούλιου και Μαρία Ηλιοπούλου που, αφενός, στα πλαίσια της πρακτικής τους εξάσκησης με βοήθησαν στην περάτωση της πειραματικής μου διαδικασίας, τόσο πρακτικά όσο και ψυχολογικά, και, αφετέρου, τις ευχαριστώ που επ'αφορμή της συνεργασίας μας μου στάθηκαν φίλες, στο πλευρό μου.

Την προτελευταία παράγραφο των ευχαριστιών την αφιερώνω στους πλέον αγαπημένους μου ανθρώπους, που δεν είναι άλλοι από τις φίλες και τους φίλους μου που χωρίς αυτούς δεν θα είχα φτάσει με κανένα τρόπο ως εδώ. Θα ήθελα να ευχαριστήσω ειδικότερα τους εξής (αλφαβητικά): τον Τάκη Αθανασόπουλο, τη Δώρα Βέλλη, την Κατερίνα Βενετσάνου, τον Κώστα Γκερλέ, τη Γιώτα Μέγκουλα, την Έλενα Θεοδώση, τη Βαρβάρα Καραχάλιου, τη Λένα Κατσιβα, την Κατερίνα Κλουβιδάκη, την Αγγελική Κόγκα, τον Ηλία Κουλαρμάνη, τη Φωτεινή Παλαιολόγου, τη Μαρία Παναγιωτοπούλου, την Έλενα Παπαδοπούλου, τη Ριάννα Παρρά, τη Φωτεινή Παυλή, την Κατερίνα Πίππη και τη Βάσω Χριστοπούλου. Ευχαριστώ τον καθέναν τους ξεχωριστά, για την μοναδική αγάπη, εμπύχωση, αλληλεγγύη και κατανόηση που έδειξαν, για τις ώρες που έχουμε περάσει μαζί, για το ότι μου στάθηκαν στα δύσκολα, κάποιιο περισσότερο η αλήθεια είναι, σαν αδέρφια και για το λόγο αυτό τους ευχαριστώ ακόμη πιο πολύ.

Τέλος, δεν θα μπορούσα να παραλείψω την οικογένειά μου, τον πατέρα μου για τη βοήθεια που προσέφερε τόσα χρόνια, ιδίως την μητέρα μου που εξαρχής πίστευε σε εμένα και αφιέρωσε τη ζωή της στο να με κάνει αυτή που είμαι σήμερα και στον αδελφούλη μου, Δημήτρη, ο οποίος είναι ο βασικός λόγος για τον οποίο θα ζω και δεν θα παύω να αγωνίζομαι. Να είστε όλοι καλά! Σας αγαπώ πολύ!
Βίλλυ



Περίληψη	σελ.7
Abstract	σελ.8
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	σελ.9
1.1 Συστηματική κατάταξη	σελ.10
1.2 Μορφολογία του εντόμου	σελ.11
1.3 Γεωγραφική κατανομή	σελ.13
1.4 Βιολογικός κύκλος	σελ.14
1.5 Ο δάκος ως έντομο οικονομικής σημασίας	σελ.17
1.6 Μικροοργανισμοί που σχετίζονται με τον δάκο της ελιάς ...	σελ.19
1.6.1 Συμβιωτικά βακτήρια	σελ.19
1.6.2 Παράσιτα του δάκου	σελ.22
1.6.3 Αρπακτικά του δάκου	σελ.23
1.7 Μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου	σελ.25
1.7.1 Μέθοδοι παρακολούθησης του πληθυσμού του δάκου ...	σελ.25
1.7.2 Βιοτεχνολογική καταπολέμηση	σελ.26
1.7.2.1 Μαζική παγίδευση	σελ.27
1.7.2.2 Παρεμπόδιση σύζευξης	σελ.28
1.7.2.3 Αποτρεπτικά και απωθητικά ωοτοκίας	σελ.28
1.7.2.4 Τεχνική του στείρου εντόμου	σελ.28

1.7.3 Βιολογική καταπολέμηση	σελ.30
1.7.4 Χημική καταπολέμηση	σελ.32
1.8 Γενετική του δάκου	σελ.37
1.9 Πληθυσμιακή ανάλυση	σελ.37
1.10 Ποικιλότητα φυσικών πληθυσμών	σελ.38
1.11 Έλεγχος ισορροπίας ενός πληθυσμού (Νόμος H-W).....	σελ.38
1.12 Γενετικές μελέτες φυσικών πληθυσμών του δάκου.....	σελ.39
1.13 Ρόλος των μελετηθέντων ενζύμων στη φυσιολογία του δάκου	σελ.43
1.14 Σκοπός της παρούσας εργασίας	σελ.44
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	σελ.46
2.1 Πειραματικό υλικό	σελ.46
2.2 Τεχνική ανιχνεύσεως των ενζύμων	σελ.47
2.2.1 Γενικές πληροφορίες	σελ.47
2.2.2 Παρασκευή του πηγματος	σελ.50
2.2.3 Λήψη και τοποθέτηση του δείγματος	σελ.50
2.2.4 Ηλεκτροφόρηση	σελ.50
2.2.4.1 Ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευση των ADH και 6-PGD..	σελ.51
2.2.4.2 Ηλεκτροφόρηση για την ανίχνευση των α-GPDH και PGM	σελ.53
2.3 Δείκτες που χρησιμοποιούνται στην πληθυσμιακή ανάλυση ...	σελ.55
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	σελ.59
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	σελ.102
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	σελ.110
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	σελ.113
7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	σελ.129

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης επί πηκτώματος αμύλου φυσικοί πληθυσμοί του εντόμου δάκος της ελιάς, *Bactrocera oleae*, με σκοπό την ανίχνευση του πολυμορφισμού σε τέσσερα ένζυμα, που κωδικοποιούνται από τέσσερα αντίστοιχα γονίδια, με ιδιαίτερη σημασία και ενδιαφέρον για τη γενετική, μορφολογία και φυσιολογία του δάκου. Τα αποτελέσματα της μελέτης θα μπορούσαν να αποβούν χρήσιμα: α) στην κατανόηση των παραγόντων που διαμορφώνουν τη γενετική δομή και διαφοροποίηση των φυσικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς, στις περιοχές μελέτης, β) στη βελτίωση των μεθόδων καταπολέμησης του δάκου και γ) στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την διασπορά από τον τόπο καταγωγής του στην Ευρώπη.

Οι φυσικοί πληθυσμοί του δάκου της ελιάς συλλέχθηκαν από περιοχές εντός του Ελλαδικού χώρου καθώς και από χώρες που βρίσκονται στη λεκάνη της Μεσογείου, την κατεξοχήν περιοχή εξάπλωσης του δάκου, και μελετήθηκαν τα ένζυμα αφυδρογονάση της αλκοόλης (ADH), αφυδρογονάση του 6-φωσφορογλυκονικού (6-PGD), φωσφορογλυκομουτάση (PGM) και α-γλυκεροφωσφορικό (α-GPDH).

Σε όλους τους πληθυσμούς και για τα τέσσερα ένζυμα οι αλληλόμορφοι κάθε γονιδίου σε κάθε πληθυσμό εμφανίζουν παραπλήσιες συχνότητες και την ίδια σειρά κατάταξης με βάση τις συχνότητές τους. Αυτά τα στοιχεία υποδηλώνουν την επίδραση επιλεκτικών πιέσεων στους φυσικούς πληθυσμούς, επειδή το φαινόμενο της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης, που αναμένεται να δρα σε μικρούς πληθυσμούς, δεν μπορεί να εξηγήσει από μόνο του τα αποτελέσματα, ούτε η γονιδιακή ροή (μέσω μετανάστευσης), δεδομένης της γεωγραφικής απόστασης μεταξύ των πληθυσμών προς μελέτη.

Επίσης, η εύρεση σπάνιων αλληλομόρφων καθώς και η διαφοροποίηση στη γενετική δομή των φυσικών πληθυσμών της Ισπανίας και της Κύπρου, ειδικά για τα γονίδια των ενζύμων PGM και α-GPDH (που στο καθένα υπάρχει ένας αλληλόμορφος που τείνει προς τη μονιμοποίηση) συνιστούν σημαντικό εργαλείο για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με τους διαδρόμους εξάπλωσης του εντόμου από τον τόπο καταγωγής του στην Ευρώπη.

Abstract

At the present study natural populations of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, were analyzed using starch gel electrophoresis method, in order to detect polymorphism in enzymes encoded by four respectively genes, of particular interest for the genetics, morphology and physiology of olive fruit fly. The results of this study could be useful : a) to the understanding of the factors that determine the genetic structure and differentiation of the olive fruit fly natural populations, at the studied areas, b) to the improving of the olive fruit fly control methods and c) to the extraction of conclusions, regarding the dispersion from its place of origin to Europe.

The wild populations of olive fruit fly were collected from different regions of the Greek land as well as from countries across the Mediterranean basin, the principal region where the olive fruit fly is widespread. The aforementioned samples were analyzed for the genes encoding the enzymes of alcohol dehydrogenase (ADH), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD), phosphoglycerate mutase (PGM) and α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPDH). For all the four enzymes, the alleles of each gene in every population appear to have similar frequencies and the same pattern of succession, as much as it concerns allele frequencies. These elements suggest the possible impact of natural selection forces upon the natural populations. Neither the genetic drift (acting upon small populations) nor the genetic flow (through migration) given the geographic distances between the regions of study, can explain the results appropriately.

Also, the detection of rare alleles as well as the differentiation in the genetic pool of the natural populations of Spain and Cyprus, especially for the genes of the enzymes of PGM and α -GPDH (where in each gene there is one allele tending to be permanent) consist important tools for the extraction of conclusions about the path of the olive fruit fly expansion from its place of origin to Europe.

Εισαγωγή



1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο δάκος της ελιάς αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα έντομα της ελληνικής γεωργίας, με ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως προς τη μελέτη της μορφολογίας, φυσιολογίας και συμπεριφοράς των φυσικών πληθυσμών του. Ανήκει στην οικογένεια Tephritidae, στην οποία υπάγονται και άλλα έντομα μεγάλης οικονομικής σημασίας, όπως η μύγα της Μεσογείου (*Ceratitis capitata*) και η μύγα των κερασιών (*Rhagoletis cerasi*).

1.1 Συστηματική κατάταξη

ΦΥΛΟ	Arthropoda
ΥΠΟΦΥΛΟ	Atelocerata
ΚΛΑΣΗ	Insecta
ΥΠΟΚΛΑΣΗ	Neoptera
ΔΙΑΙΡΕΣΗ	Holometabola
ΤΑΞΗ	Diptera
ΥΠΟΤΑΞΗ	Brachycera
ΔΙΑΙΡΕΣΗ	Schizophora
ΤΜΗΜΑ	Acalyptratae
ΥΠΕΡΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritoidea
ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Tephritidae
ΥΠΟΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ	Dacinae
ΦΥΛΗ	Dacini
ΓΕΝΟΣ	<i>Bactrocera</i>
ΥΠΟΓΕΝΟΣ	<i>Daculus</i>
ΕΙΔΟΣ	<i>Oleae</i>

1.2 Μορφολογία του εντόμου



Εικόνα 1: ένα αυγό δάκου

Αυγό: Έχει μικρές διαστάσεις (περίπου 0,2X0,8 mm). Είναι επίμηκες, κυλινδρικό, με γαλακτώδη χρωματισμό και λεία επιφάνεια. Στη μικροπύλη είναι λοβοειδές σε σχέση με την οπίσθια πλευρά.



Εικόνα 2: Προνύμφες δάκου σε ελαιόκαρπο

Προνύμφη: Διακρίνονται τρία προνυμφικά στάδια. Το τελικό μήκος της προνύμφης είναι 7-8 mm. Το πρόσθιο μέρος του σώματος είναι στενότερο από το οπίσθιο. Το χρώμα της προνύμφης είναι υπόλευκο έως ανοιχτό κίτρινο και καθώς αυξάνει η ηλικία της αυξάνεται και η ένταση της κίτρινης χροιάς. Ωστόσο, στο πρόσθιο τμήμα του σώματος τα στοματικά άγκιστρα και ο υπόλοιπος κεφαλοφαρυγγικός σκελετός είναι μαύρου χρώματος. Η προνύμφη δε φέρει κεφαλική κάψα, χαρακτηριστικό και των λοιπών προνυμφών της οικογένειας Tephritidae/Trypetidae.



Εικόνα 3:Μια νύμφη δάκου σε ελαιόκαρπο

Νύμφη: Είναι ανοιχτού καστανού χρωματισμού, ελλειψοειδούς σχήματος και έχει διαστάσεις περίπου 4X2 mm. Βρίσκεται εντός του **puparium** (νυμφικό περίβλημα), το οποίο σχηματίζεται από το τελευταίο προνυμφικό έκδυμα.



Εικόνα 4: Ακμαίο δάκου

Ακμαίο: Όπως φαίνεται και από την εικόνα 4, η κεφαλή του είναι σφαιρική και πλατύτερη του θώρακα. Έχει οφθαλμούς σύνθετους με μεταλλικές ανταύγειες πράσινου-πορφυρού χρωματισμού. Ο θώρακας είναι κίτρινος-φαιός, με τρεις επιμήκεις σκοτεινότερες ραβδώσεις. Σε κάθε γωνία του θώρακα διακρίνεται από μια υποκίτρινη τριγωνική πλάκα. Οι πτέρυγες είναι διαφανείς, ιριδίζουσες και φέρουν ένα σκοτεινό στίγμα στην άκρη. Η κοιλιά είναι καστανού-κίτρινου χρωματισμού και, στην περίπτωση των θηλυκών, καταλήγει σε έναν ισχυρό ωθήτη μαύρου χρωματισμού. Το συνολικό μήκος του ακμαίου κυμαίνεται από 4 έως 5 mm (Τζανακάκης, 1980).



Εικόνα 5: Ένα αρσενικό και ένα θηλυκό ακμαίο δάκου.

Στην εικόνα 5 παρουσιάζονται ένα αρσενικό και ένα θηλυκό ακμαίο του δάκου της ελιάς. Στο θηλυκό είναι ευδιάκριτος ο ωοθέτης (στα δεξιά της εικόνας 5).



Εικόνα 6α και 6β: Προσβεβλημένες ελιές από δάκο.

1.3 Γεωγραφική κατανομή

Ο δάκος προσβάλλει αποκλειστικά τον ελαιόκαρπο και αναπτύσσεται μόνο στους καρπούς των ποικιλιών της ευρωπαϊκής ελιάς *Olea europaea* και της άγριας *Olea sylvestris*. Είναι ευρέως διαδεδομένος στις χώρες της λεκάνης της Μεσογείου. Παράλληλα, καταγράφονται προσβολές ελαιοκάρπων από το δάκο της ελιάς σε πολλές περιοχές ανά την υφήλιο, συμπεριλαμβανομένων της Νότιας και Κεντρικής Αφρικής, της Καλιφόρνιας των Η.Π.Α. καθώς και της Κεντρικής Αμερικής (Μεξικό) (Rice 1999, Augoustinos et al., 2002, Rice et al. 2003). Στην Αφρική προσβάλλει τον καρπό των *Olea chrysophilla* και *Olea verrucosa* και στην Ασία μέχρι την βορειοδυτική Ινδία τον καρπό της *Olea caspidata*. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πληθυσμός του δάκου στο Πακιστάν αντιπροσωπεύει έναν ξεχωριστό απομονωμένο πληθυσμό (Nardi et al.,

2005), που αρχικά περιγράφεται ως *B.oleae var. Asiatica* (Silvestri, 1916).

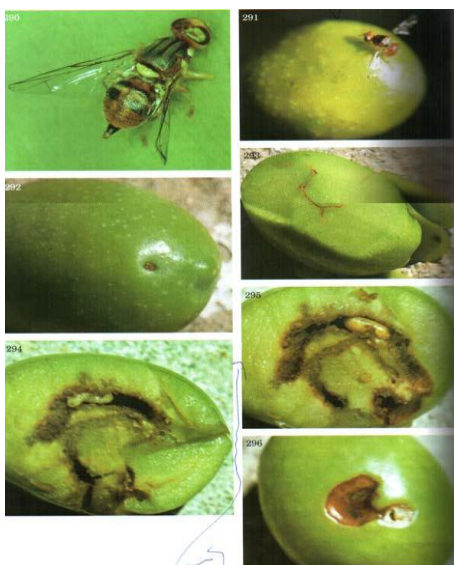
1.4 Βιολογικός κύκλος

Ο δάκος είναι έντομο ημερόβιο, αποκλειστικά μονοφάγο και καρποφάγο είδος. Διαχειμάζει συνήθως ως νύμφη στο έδαφος σε βάθος 1-6 cm. Είναι δυνατόν σε ορισμένες περιοχές με ήπιο χειμώνα, εάν και εφόσον παραμένει στα δέντρα ο ελαιόκαρπος, να συνυπάρχουν όλες οι μορφές του εντόμου. Την άνοιξη, με την άνοδο της θερμοκρασίας, από τις νύμφες του εδάφους βγαίνουν τα πρώτα τέλεια άτομα του δάκου, (δραστηριοποιείται η 1η γενεά του εντόμου), τα οποία πετούν σε μεγάλες αποστάσεις. Χρησιμοποιούν ως πηγή τροφής μελιτώδεις εκκρίσεις κοκκοειδών της ελιάς (Tzanakakis, 2006).

Τα θηλυκά αρχίζουν να ωοτοκούν μετά την πάροδο κάποιων ημερών-περίοδος προωτοκίας- που είναι αναγκαία για την ωρίμαση των ωοθηκών. Καθοριστικοί παράγοντες της περιόδου προωτοκίας θεωρούνται οι επικρατούσες κλιματολογικές και τροφικές συνθήκες, γι' αυτό παρουσιάζονται διαφοροποιήσεις μεταξύ των εποχών. Συγκεκριμένα, για το χειμώνα υπολογίζεται στους 2 έως 3 μήνες ενώ για τους φθινοπωρινούς μήνες στις 6-10 ημέρες. Όταν τα θηλυκά γίνουν σεξουαλικά ώριμα και γονιμοποιηθούν, αρχίζουν τον Ιούνιο να ωοτοκούν σε καρπούς της ελιάς μικρού μεγέθους και πράσινου χρώματος. Οι καρποί είναι επιδεκτικοί για εναπόθεση αυγών κατόπιν της απόκτησης ορισμένου μεγέθους και σύστασης σάρκας. Εμπειρικά, εκτιμάται ότι ανταποκρίνονται στις απαιτήσεις του δάκου όταν έχουν αποκτήσει μέγεθος ρεβιθιού και εφόσον έχει πήξει ο πυρήνας τους. Πριν την ωοτοκία, το θηλυκό ανιχνεύει την επιφάνεια του καρπού, επιλέγει το κατάλληλο σημείο, διατρυπά τον καρπό με τον ωοθέτη του και δημιουργεί το χαρακτηριστικό τριγωνικό άνοιγμα, όπου εναποθέτει συνήθως ένα αυγό. Κάθε θηλυκό έχει την ικανότητα να τοποθετήσει έως 12 αυγά την ημέρα. Ως επί το πλείστον, η ωοτοκία περιορίζεται σε καρπούς ανέπαφους αλλά κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου και σε περιόδους περιορισμένης ελαιοπαραγωγής παρατηρούνται συχνά περισσότερα από ένα νύγματα στον ίδιο καρπό (Haniotakis and Voyadjoglou, 1978).

Εικόνα 7: Θηλυκό που φωτοκεί πάνω στον ελαιοκάρπο.

Κατόπιν επώασης 2-4 ημερών εκκολάπτονται οι νεαρές προνύμφες, οι οποίες τρέφονται από τη σάρκα του ελαιοκάρπου. Σε αυτή την γενιά η διάρκεια του σταδίου της προνύμφης υπολογίζεται σε 12-14 ημέρες. Αφού η προνύμφη ολοκληρώσει την ανάπτυξή της μεταμορφώνεται σε νύμφη. Προτού νυμφωθεί, δημιουργεί μια στρογγυλή τρύπα στον καρπό, γνωστή ως οπή εξόδου του ακμαίου, η οποία καλύπτεται εξωτερικά από την εφυμενίδα του καρπού, την λεγόμενη «ψαρολεπίδα», έως ότου ολοκληρωθεί η ανάπτυξη του εντόμου εντός του καρπού. Η προσβολή από τον δάκο επιταχύνει την ωρίμαση του ελαιοκάρπου. Επιπρόσθετα, στο νύγμα αναπτύσσονται παθογόνοι μικροοργανισμοί, που προκαλούν σήψη και πτώση του καρπού (Τζανακάκης και Κατσόγιαννος, 2003).



Εικόνα 8: διαδοχικά στιγμιότυπα προσβολής του ελαιοκάρπου από το δάκο της ελιάς

[Εικ.290: ενήλικο θηλυκό. Εικ.291: θηλυκό που φωτοκεί. Εικ.292: παλαιά οπή φωτοκίας. Εικ.293: στοά νεαρής προνύμφης. Εικ. 294: αναπτυγμένη προνύμφη τρίτου σταδίου στη στοά της. Εικ.295: νύμφη στην προνυμφική στοά. Εικ.296: οπή εξόδου ενηλίκου δεξιά και αριστερά της καστανής ξεροβούλας (κηλίδα του μύκητα *Camarosporium dalmaticum*).]

Το τέλειο έντομο εμφανίζεται μετά από την παρέλευση 9-12 ημερών και εξέρχεται από το κυκλικό άνοιγμα που σχηματίζει η νύμφη. Πραγματοποιεί σκίσιμο στο κάλυμμα της οπής εξόδου, με τη βοήθεια του μετωπικού σάκου, και εγκαταλείπει την ελιά.

Ο δάκος μπορεί να συμπληρώσει 2-4 γενεές κάθε χρόνο. Ο αριθμός των γενεών καθορίζεται, κατά κύριο λόγο, από τις κλιματικές και οικολογικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής. Εν γένει, οι κλιματικές συνθήκες που επικρατούν σε κάθε περιοχή επηρεάζουν κυρίως την εξέλιξη του δάκου και, συνακόλουθα, τις διακυμάνσεις στην ένταση της προσβολής του ελαιοκάρπου. Ειδικότερα, θερμοκρασίες άνω των 32° C και κάτω των 8 °C συνιστούν περιοριστικό παράγοντα για την ομαλή ανάπτυξη του εντόμου, καθότι ο πληθυσμός ενδέχεται να οδηγηθεί σε κατάρρευση. Επιπρόσθετα, έχει αποδειχθεί ότι η εξέλιξη του δάκου ευνοείται ιδιαίτερα σε περιόδους με εύρος θερμοκρασιών από 23° C έως και 29 °C και με σχετική υγρασία από 60 έως 80% (Μανίκας, 1974). Η δραστηριότητα του τέλειου εντόμου του δάκου συνεχίζεται κανονικά στο εύρος των 20-28 ° C. Ωστόσο, σε υψηλότερες θερμοκρασίες, άνω των 30 °C, αναστέλλεται η ωοτοκία και κάθε δραστηριότητα ανακόπτεται άνω των 35 °C (Tzanakakis and Koneos, 1986). Πέραν αυτού, σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C και σε περιβάλλον με χαμηλή σχετική υγρασία (20-25%) παρατηρείται υψηλή θνησιμότητα στις νεαρές προνύμφες και στα αυγά εντός του καρπού (Fletcher and Karatos, 1981). Εξαιτίας των παραπάνω δεδομένων, παρατηρείται χαμηλό ποσοστό προσβολής, της τάξεως του 1-3% κατά την διάρκεια των θερινών μηνών, στην πλειονότητα των ελαιώνων. Μεγαλύτερη πυκνότητα του δάκου καταγράφεται το φθινόπωρο, τους μήνες Σεπτέμβριο και Οκτώβριο, ενώ ελλοχεύει υψηλός κίνδυνος προσβολής όσο διάστημα ο καιρός είναι υγρός και ζεστός.

1.5 Οικονομική σημασία του εντόμου

Ο δάκος της ελιάς (*Bactrocera oleae*) θεωρείται το καταστρεπτικότερο έντομο της ελαιοκομίας. Προξενεί μεγάλες οικονομικές ζημιές που, σε περιόδους έξαρσης, μπορούν να φτάσουν έως 50% της συνολικής παραγωγής στις ελαιοπαραγωγικές περιοχές της Μεσογείου (Mazomenos et al., 2002). Στην Αίγυπτο υπολογίστηκε ότι η ετήσια απώλεια από το δάκο φθάνει το 30% της παραγωγής, αν δεν ληφθούν μέτρα καταπολέμησής του (Awadallah, 1986). Στη Σαρδηνία, στην Ιταλία, η μέση απώλεια έφθασε στο 38% της παραγωγής κατά την περίοδο 1953-55 και 19% περίπου την περίοδο 1974-76 (Prota, 1979). Στην χώρα μας η ζημιά που εκτιμάται ότι μπορεί να προκαλέσει το έντομο στην ετήσια παραγωγή, στην περίπτωση που δε γίνει προσπάθεια ελέγχου του πληθυσμού, είναι κατά μέσο όρο 35% (Economidou, 1977). Συνήθως, όμως, τα ποσοστά των ζημιών περιορίζονται γύρω στο 5% με τις μεθόδους αντιμετώπισης που εφαρμόζονται σήμερα (Nardi et al., 2005).

Συνοπτικά, ο δάκος προκαλεί σοβαρές ζημιές γιατί κατατρώνει το μεσοκάρπιο της ελιάς που στη συνέχεια πέφτει. Οι στοές τις οποίες ανοίγουν οι προνύμφες στους άγουρους καρπούς εμφανίζονται εξωτερικά σαν σκούρες ελαιώδεις κηλίδες. Στα σημεία αυτά ο καρπός συρρικνώνεται και ξεραίνεται σε συνθήκες ξηρασίας ή σαπίζει όταν ο καρπός είναι υγρός. Η οπή ωτοκίας του δάκου βοηθά την εγκατάσταση μυκήτων που προξενούν δευτερογενείς προσβολές π.χ. η προσβολή του ελαιοκάρπου μπορεί να συνοδεύεται από το δίπτερο *Prolasioptera berlesiana*, μια μικρή κηκιδόμυγα που μεταφέρει το μύκητα *Macrophoma dalmatica*. Η προσβολή από το μύκητα είναι εξαιρετικά ζημιογόνος, τόσο στις ποικιλίες που προορίζονται για παραγωγή βρώσιμων ελιών, όσο και στις ελαιοποιήσιμες, προκαλώντας τη γνωστή «ξεροβούλα» (Πελεκάσης, 1980).



Εικόνα 9: Ελιά προσβεβλημένη από το μύκητα *Macrophoma dalmatica*, που προκαλεί τη γνωστή «ξεροβούλα».

Μια προνύμφη καταναλώνει το 1/5 – 1/4 ενός καρπού μέσου μεγέθους. Εκτός από την ποσοτική επέρχεται και ποιοτική καταστροφή με την υποβάθμιση της ποιότητας του λαδιού, το οποίο είναι υψηλής περιεκτικότητας σε οξέα (7-8 βαθμοί μέχρι 15-20 σε σοβαρές περιπτώσεις), ως εκ τούτου καθίσταται ακατάλληλο για βρώση και εμπορία. Οι οπές εξόδου διευκολύνουν την εγκατάσταση μυκήτων με συνέπεια την υδρόλυση και αύξηση της οξύτητας του λαδιού. Επίσης, η έκθεση του λαδιού στον ατμοσφαιρικό αέρα συνεπάγεται την οξείδωσή του. Σε έντονη προσβολή αλλοιώνονται οι οργανοληπτικοί χαρακτήρες (γεύση και χρώμα) του προϊόντος που παράγεται, λόγω της παρουσίας των προνυμφών μέσα στους καρπούς (Ζιώγας, 1996).

Ο δάκος της ελιάς ανέκαθεν αποτελούσε μάστιγα της ελαιοκομίας των παραμεσόγειων περιοχών. Κάθε χρόνο προκαλεί σημαντική ποσοτική και ποιοτική ζημιά στην ελαιοπαραγωγή της χώρας μας, ενώ επιβαρύνει σημαντικά το κόστος παραγωγής λόγω των απαραίτητων επεμβάσεων για την καταπολέμησή του. Εξαιτίας, ακριβώς, της ιδιαίτερης δυσκολίας ως προς την αντιμετώπισή του και του μεγάλου μεγέθους των ζημιών που προκαλούνται από αυτό, καταβάλλονται πολυετείς και επίπονες προσπάθειες για την ανακάλυψη νέων, βελτιωμένων μεθόδων για τη καταπολέμησή του (Tsolakis et al., 2011).



Εικόνα 10 : Προσβολή δάκου σε ελαιόκαρπο

1.6 Μικροοργανισμοί σχετιζόμενοι με το δάκο της ελιάς

1.6.1 Συμβιωτικά βακτήρια

Ο Petri (1909) περιέγραψε την παρουσία συμβιωτικών βακτηρίων στο δάκο της ελιάς. Τα βακτήρια εντοπίζονται στην κεφαλική κύστη του δίπτερου, στις αναδιπλώσεις της βάσης του ωσθέτη του θηλυκού και στους τέσσερεις γαστρικούς σάκους στην πρόσθια άκρη του μεσεντέρου της προνύμφης. Εξαιτίας της ύπαρξης των βακτηρίων που βρίσκονται στον ωσθέτη του θηλυκού προκαλείται μόλυνση των αυγών. Κατ' αυτόν τον τρόπο εξασφαλίζεται συνεχώς η παρουσία τους από γενεά σε γενεά. Ο Petri (1910) υποστήριξε ότι τα βακτήρια αυτά ανήκαν στο είδος *Pseudomonas savastanoi*, το παθογόνο αίτιο της φυματίωσης της ελιάς.



Εικόνα 11: Ελιά προσβεβλημένη από το βακτήριο *Pseudomonas savastanoi*.

Η σπουδαιότητα των συμβιωτικών μικροοργανισμών στην ανάπτυξη του δάκου επιβεβαιώθηκε και από τις ερευνητικές δραστηριότητες των Tzanakakis et al.(1975) και Fytizas and Tzanakakis (1966) ως εξής: κατόπιν της χρήσης του αντιβιοτικού στρεπτομυκίνη στην τεχνητή τροφή του ακμαίου, με απώτερο σκοπό την αποφυγή επιμολύνσεων της τροφής από μικροοργανισμούς, παρατηρήθηκε ότι τα θηλυκά που ωοτοκούσαν σε ελαιοκάρπο δεν έδιναν απογόνους. Οι νεαρές προνύμφες δεν μπορούσαν να αναπτυχθούν και κατέληγαν στο θάνατο λόγω της έλλειψης της δυνατότητας χρήσης του ελαιοκάρπου ως τροφή. Όταν, όμως, στη θέση του ελαιοκάρπου χορηγήθηκε θρεπτικό υλικό που περιλάμβανε υδρολυμένη πρωτεΐνη, η ανάπτυξη των προνυμφών ήταν φυσιολογική. Δηλαδή, η στρεπτομυκίνη σκότωσε τα συμβιωτικά βακτήρια με αποτέλεσμα να μην μπορούν να επιβιώσουν οι προνύμφες. Το παραπάνω φαινόμενο επαληθεύτηκε και από τον Hagen (1966).

Οι Fytizas και Tzanakakis (1966) παρατήρησαν ότι στην περίπτωση που οι προσφερόμενοι καρποί είχαν περάσει το στάδιο της ωρίμασης ή είχαν συλλεχθεί ανώριμοι και , έπειτα, τοποθετήθηκαν στο ψυγείο για μεγάλο χρονικό διάστημα προ της χρήσης τους ως τροφή στις προνύμφες, η ύπαρξη συμβιωτικών βακτηρίων δεν ήταν απαραίτητη για την επιβίωση των προνυμφών.

Τα βακτήρια που εντοπίζονται στον οισοφαγικό θύλακα (Ratner and Stoffolano 1982, 1984) καθώς και στον πεπτικό σωλήνα σε είδη της οικογένειας Tephritidae έχουν χαρακτηριστεί ως απαραίτητα για την ανάπτυξη των προνυμφών στους καρπούς της ελιάς. Ο ρόλος τους έγκειται είτε στο γεγονός ότι διαθέτουν πρωτεολυτικά ένζυμα, που διασπούν τις πρωτεΐνες του ελαιοκάρπου, είτε στην ικανότητα να βιοσυνθέτουν χημικές ουσίες, αναγκαίες για την βιολογία του εντόμου (Boller and Prokopy 1976, Howard et al. 1985, Fletcher 1987). Κατ' αυτόν τον τρόπο, οι προνύμφες προμηθεύονται τα απαραίτητα αμινοξέα που δεν υπάρχουν στον καρπό της ελιάς. Οι Yamvrias et al. (1970) διαπίστωσαν την παρουσία διαφόρων αρνητικών κατά Gram βακτηρίων στην κεφαλική κύστη και στα αυγά του δάκου, από τα οποία μερικά ανήκουν στο γένος *Pseudomonas*. Κανένα, όμως, από τα απομονωθέντα βακτήρια δεν ανήκε στο είδος *Pseudomonas savastanoi*.



Εικόνα 12: Φωτογραφία του *Pseudomonas savastanoi*.

Στις μέρες μας έχουν τεθεί υπό αμφισβήτηση τα παραπάνω δεδομένα, κατόπιν μίας σειράς πρόσφατων ερευνών στο πεδίο των μικροοργανισμών που συμβιώνουν στο εσωτερικό του δάκου της ελιάς.

Αρχικά, οι Caruzzo et al. (2005), έχοντας ως σκοπό την μελέτη των συμβιωτικών οργανισμών του δάκου της ελιάς, συνέλεξαν δείγματα από πολλές περιοχές ανά τον κόσμο και σε διαφορετικές χρονικές περιόδους. Πραγματοποίησαν απομόνωση των βακτηρίων που βρίσκονται στο πεπτικό σύστημα του εντόμου, τμήμα που βρίθεται μικροοργανισμών, αφού πάρθηκαν οι απαραίτητες προφυλάξεις (αποστείρωση, ασηπτικές συνθήκες) για την αποφυγή επιφανειακών μικροβιακών μολύνσεων. Οι προσπάθειες που καταβλήθηκαν με σκοπό τον πολλαπλασιασμό των εν λόγω μικροοργανισμών *ex situ* αποδείχθηκαν άκαρπες, υποδηλώνοντας την υποχρεωτική παρασιτική φύση των μικροοργανισμών που απομονώθηκαν. PCR ενίσχυση και αλληλούχιση του 16S rRNA γονιδίου έχει σαν αποτέλεσμα μια αλληλουχία που εμφανίζει ομοιότητα -έως και 97% ομολογία- με στελέχη *Erwinia*. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα, οι ερευνητές κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι πρόκειται για ένα νέο είδος, το οποίο ονόμασαν *Candidatus Erwinia dacicola*. Στα βακτηριακά στελέχη που εντοπίστηκαν δε συμπεριλαμβάνεται το *Pseudomonas savastanoi*, γεγονός που ανατρέπει τα μέχρι πρότινος δεδομένα σχετικά με το βαρύνοντα ρόλο του εν λόγω βακτηρίου στη φυσιολογία του δάκου της ελιάς.

Επιπρόσθετα, οι Kounatidis et al. (2009) πιστοποίησαν την ύπαρξη μικροοργανισμών που συνδέονται με το δάκο της ελιάς, μεταξύ των οποίων το *Acetobacter tropicalis*, το οποίο καταλαμβάνει κυρίαρχη θέση. Συγκεκριμένα, κατέληξαν στο παραπάνω συμπέρασμα εφαρμόζοντας PCR ενίσχυση του βακτηριακού 16S rRNA γονιδίου και διεξάγοντας

δομικές αναλύσεις. Ειδικότερα, τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν ταυτοποίησαν την ικανότητα του αναφερόμενου μικροοργανισμού να εγκαθίσταται επιτυχώς, ανεξαρτήτως σταδίου του εντόμου, στο πεπτικό του σύστημα. Το ενδιαφέρον εστιάζεται στο γεγονός ότι η συγκεκριμένη ερευνητική ομάδα αφενός δεν εντόπισε το *Pseudomonas savastanoi* και, αφετέρου, εντόπισε το *Candidatus Erwinia dacicola* σε όλους τους φυσικούς πληθυσμούς αλλά όχι στον εργαστηριακό, προσθέτοντας καινούριες πληροφορίες στην μελέτη των συμβιωτικών βακτηρίων του δάκου, που έρχονται σε αντίθεση με τις παλαιότερες έρευνες που τόνιζαν την σημασία του *Pseudomonas savastanoi*. Πρόσφατα, διεξήχθη έρευνα σε ιταλικούς φυσικούς πληθυσμούς του δάκου, όπου ανακαλύφθηκε η ύπαρξη δύο διαφορετικών στελεχών *Candidatus Erwinia dacicola* (Savio et al., 2011).

1.6.2 Παράσιτα του δάκου

Παράσιτα: Στα σπουδαιότερα ιθαγενή παράσιτα του δάκου στη χώρα μας και εν γένει στην ακτίνα εξάπλωσής του (Μεσόγειος) κατατάσσονται πέντε εκτοπαράσιτα, υμενόπτερα της υπεροικογένειας Chalcidoidea (Arambourg and Pralavorio 1970, Stavradi 1970):

Eupelmus urozonus

Pnigalio mediterraneus

Eurytoma martelli

Eurytoma rosae

Cyrtotypx dacicida(*latipes*)

Εκτός των προαναφερθέντων εκτοπαρασίτων, περιλαμβάνεται και το *Opius concolor*, της οικογένειας των Braconidae.



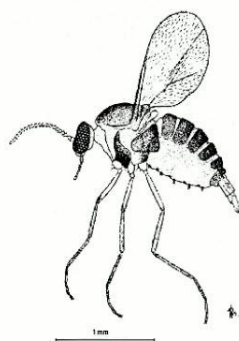
Εικόνα 13 : Το παράσιτο του δάκου, *Opius concolor*.

Αυτό το είδος αρχικά περιγράφηκε ως *Opius concolor* από τον Szepligeti το 1910 (Szepligeti 1911, Papp 2011). Η αρχική περιγραφή του βασίστηκε σε βιολογικό υλικό που συλλέχθηκε από ελαιόκαρπους προσβεβλημένους από το δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae*, στην Τυνησία. Εντοπίζεται στην διεθνή βιβλιογραφία και με την ονομασία *Psytallia concolor*. Πρόκειται για ένα ιθαγενές της Βορείου Αφρικής που παρασιτεί τις προνύμφες του δάκου (1^ο και 2^ο σταδίου) καθώς και τις προνύμφες 2^ο σταδίου της μύγας της Μεσογείου, *Ceratitis Capitata* (Canale 1998, Canale and Raspi 2000). Έχει εισαχθεί σε πολλές Μεσογειακές χώρες όπου έχει απελευθερωθεί χωρίς να δώσει ιδιαίτερα ενθαρρυντικά αποτελέσματα (Κορς, 2002). Επίσης, στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α. έχει γίνει εργαστηριακή εκτροφή του, αναπτυσσόμενο σε μύγα της Μεσογείου, και στην συνέχεια ακολούθησε απελευθέρωσή του με σκοπό να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός βιολογικός έλεγχος του δάκου (Yokoyama et al. 2008, 2011). Ωστόσο τα αποτελέσματα έδειξαν ότι απαιτούνται περισσότερες προσπάθειες για τη βελτίωση αυτής της μεθόδου. Στην Ελλάδα έχει εντοπιστεί σε ορισμένους ελαιώνες της Ανατολικής Κρήτης (Michelakis, 1989).

1.6.3 Αρπακτικά του δάκου

Τα αρπακτικά του δάκου που παρασιτούν τις νύμφες του εντόμου περιλαμβάνουν αρκετά είδη των Carabidae (*Carabus banoni*, *Licinus aegyptiacus*, *Pterostichus creticus*), Staphylinidae (*Ocypus oleus*, *Ocypus fulvipennis* κ.α.) και Dermaptera καθώς επίσης και είδη Scolopendra και Lithobius που καταστρέφουν τις νύμφες του εντόμου στο έδαφος (Askew, 1971).

Ακόμη, πολλά είδη μυρμηγκιών (Formicidae) καθώς επίσης και πτηνά προσβάλλουν τις προνύμφες και νύμφες του δάκου μέσα στο έδαφος και μερικές φορές ακόμη μέσα στον καρπό. Τέλος, ένας άλλος σημαντικός φυσικός εχθρός του δάκου είναι το δίπτερο *Prolasioptera berlesiana*, Cecidomyiidae, που θεωρείται σαν ένα αρπακτικό των ωών του δάκου (εναποθέτει τα ωά του σε καρπούς στους οποίους έχει προηγηθεί η απόθεση των ωών του δάκου). Το αρπακτικό αυτό μπορεί άμεσα ή έμμεσα να καταστρέψει ένα ποσοστό 30-50% των αυγών του δάκου. Όμως, παρά τη σημαντική δράση του *Prolasioptera berlesiana* αμφισβητείται τελικά η χρησιμότητά του διότι θεωρείται υπεύθυνο για τη μεταφορά του μύκητα *Macrophoma dalmatica* που προκαλεί σοβαρές ζημιές στον ελαιόκαρπο (Neuenschwander et al., 1983).



Εικόνα 14: *Prolasioptera berlesiana*.

1.7 Μέθοδοι καταπολέμησης

Η καταπολέμηση του πληθυσμού του εντόμου μπορεί να γίνει με χημικές ή βιολογικές μεθόδους. Τα στοιχεία για το πότε θα πραγματοποιηθεί η επέμβαση καταπολέμησης λαμβάνονται από την παρακολούθηση του μεγέθους των πληθυσμών του εντόμου.

1.7.1 Μέθοδοι παρακολούθησης του πληθυσμού του δάκου

Για την παρακολούθηση των πληθυσμών του δάκου στους ελαιώνες χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι παγίδων με μια ή περισσότερες ελκυστικές πηγές. Τέτοιες είναι ελκυστικές ουσίες οσμής ή τροφής ή φύλου ή το ελκυστικό χρώμα (Delrio et al. 1979, Prokopy et al. 1975). Ένας συνηθισμένος τύπος παγίδας που χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια είναι η γυάλινη παγίδα McPhail όπου ως ελκυστική ουσία χρησιμοποιείται φωσφορικό διαμμώνιο ή θειική αμμωνία σε διάλυση 2-3% με νερό. Με αυτό τον τρόπο τα μόρια της αμμωνίας που διαχέονται στο περιβάλλον έλκουν τα ακμαία του δάκου στην παγίδα, όπου και εισέρχονται και πνίγονται στο διάλυμα. Στην παγίδα αυτή θα πρέπει κάθε πέντε ημέρες να γίνεται αλλαγή του διαλύματος και να καταμετρώνται τα συλληφθέντα ακμαία του δάκου. Η απόφαση για να πραγματοποιηθεί επέμβαση καταπολέμησης του δάκου, λαμβάνεται από τον μέσο όρο των ακμαίων που συλλαμβάνονται από τις παγίδες (Arambourg, 1986). Συνήθως, οι παγίδες αυτές χρησιμοποιούνται μια κάθε 30 ελαιόδεντρα. Ένας άλλος τύπος παγίδας είναι η πλαστική παγίδα κίτρινου φθορίζοντος χρώματος με κόλλα, τύπου Rebell (οπτική παγίδα). Η απλούστερη μορφή της παγίδας αυτής με χαμηλό κόστος είναι η κίτρινη παγίδα που αποτελείται από ένα τεμάχιο ξύλου κοντραπλακέ ή σκληρού χαρτονιού. Αυτά βάφονται με κίτρινο χρώμα και αλείφονται με την ειδική κόλλα που δεν ξεραίνεται για πολλούς μήνες. Με τις παγίδες αυτές προσδιορίζεται ο χρόνος εμφάνισης του δάκου στον ελαιώνα και οι διακυμάνσεις του πληθυσμού του μέχρι τη συγκομιδή του καρπού. Ως ελκυστική ουσία για τα αρσενικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί η φερομόνη του δάκου σε συνδυασμό με τα ξύλινα ή από χαρτόνι πλαίσια με κόλλα και με ή χωρίς κίτρινο χρώμα. Όσον αφορά στις ελκυστικές ουσίες, με πολύ καλά αποτελέσματα έχει χρησιμοποιηθεί ο συνδυασμός δύο ή περισσότερων ελκυστικών ουσιών σε μια παγίδα (π.χ. αμμωνία και φερομόνη). Στις πλαστικές ή ξύλινες παγίδες η αμμωνία είναι σε στερεά μορφή (ανθρακική αμμωνία) μέσα σε πλαστικό σακουλάκι. Το

σακουλάκι αυτό προσαρμόζεται στο ξύλινο πλαίσιο και ανοίγεται μια οπή για να βγαίνουν τα μόρια της αμμωνίας έξω με αργό ρυθμό, ώστε να μην χρειάζεται αλλαγή μέχρι την συγκομιδή (Μπρούμας, 2002). Εκτός από την πλαστική παγίδα τύπου McPhail, οι υπόλοιπες χρησιμοποιούνται και για την καταπολέμηση του δάκου με μαζική συλλογή ακμαίων.

1.7.2 Βιοτεχνολογική καταπολέμηση

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη μαζική σύλληψη των ακμαίων του δάκου με τη μέθοδο της παγίδευσης με διάφορα συστήματα παραγωγής. Τα τελευταία χρόνια δε χρησιμοποιείται η παγίδα κίτρινου χρώματος για να μη συλλαμβάνονται και τα ωφέλιμα έντομα. Ως ελκυστικές παγίδες χρησιμοποιούνται η ανθρακική αμμωνία μόνη της ή σε συνδυασμό με φερομόνη φύλου σε παγίδα με κόλλα (η οποία μέθοδος έχει δώσει αρκετά καλά αποτελέσματα) (Μπρούμας, 2000). Τελευταία έχουν δημιουργηθεί διάφοροι τύποι παγίδων που μπορεί ο οποιοσδήποτε ελαιοπαραγωγός να προμηθευτεί από το εμπόριο και να τις χρησιμοποιήσει στην πράξη. Είναι εύκολες στη χρήση τους και χωρίς μεγάλο κόστος. Ένας τύπος παγίδας είναι αυτός που χρησιμοποιεί ως ελκυστική ουσία ανθρακική αμμωνία και κόλλα για τη θανάτωση του δάκου. Ένας άλλος τρόπος δακοπαγίδας είναι αυτός που έχει τη μορφή φακέλου αλλά το υλικό του είναι ύφασμα από φυσικές ίνες. Ο φάκελος αυτός περιέχει σε πλαστική θήκη στερεά ελκυστικά και όταν τοποθετείται προστίθεται και νερό. Η παγίδα αυτή είναι εμπλουτισμένη με εντομοκτόνο για τη θανάτωση των ακμαίων που προσελκύονται. Μια άλλη, σχετικά πολύ πρόσφατη δακοπαγίδα (1997) είναι αυτή που αποτελείται από δύο τεμάχια: ένα γυάλινο κίτρινο δοχείο όγκου 50 ml όπου βιδώνεται μια κίτρινη πλαστική φούσκα με οπή στο πλάι. Από εκεί εξέρχονται τα μόρια ελκυστικής ουσίας που έλκουν τον δάκο και όταν εισέλθει μέσα στην παγίδα από την οπή πνίγεται. Αν παρατηρηθεί μέσω των παγίδων McPhail ή μέσω της δειγματοληψίας καρπού αυξημένος πληθυσμός δάκου κατά την περίοδο αύξησης του καρπού, τότε θα πρέπει να γίνει επέμβαση με ψεκασμό από το έδαφος (Broumas and Haniotakis, 1994).

1.7.2.1 Μαζική παγίδευση (*mass trapping*)

Η μέθοδος της μαζικής παγίδευσης βασίζεται στη σύλληψη όσο το δυνατόν μεγαλύτερου αριθμού εντόμων, ώστε να μειωθεί ο πληθυσμός σε επίπεδα τέτοια που να μην επιφέρει οικονομικές ζημιές (Haniotakis, 1986). Η εφαρμογή της εν λόγω μεθόδου για την καταπολέμηση του δάκου πραγματοποιείται με διάφορους τύπους παγίδων – τροφικών, χρωματικών, φερομονικών ή με συνδυασμό αυτών – ιδιαίτερα σε αραιό πληθυσμό του δάκου. Στην περίπτωση, όμως, που ο πληθυσμός του δάκου είναι πυκνός, εκτός από τις παγίδες πρέπει να πραγματοποιηθούν και ένας ή δύο ψεκασμοί (Tsolakis et al., 2011). Οι ψεκασμοί αυτοί προηγούνται ή έπονται της τοποθέτησης των παγίδων. Η θανάτωση των εντόμων που ελκύονται από τις παγίδες επιτυγχάνεται ανάλογα με την παγίδα που χρησιμοποιείται.

Ενδεικτικά παρατίθενται τα παρακάτω είδη παγίδων:

- Παγίδες χρώματος με κόλλα ή εντομοκτόνο στην επιφάνειά τους (Economidou et al, 1986). Από τα χρώματα, το φθορίζον κίτρινο αποδείχθηκε ότι ελκύει περισσότερο από οποιοδήποτε άλλο χρώμα το δάκο. Στα μειονεκτήματα των παγίδων χρώματος υπάγεται η μικρή ακτίνα δράσης και η προσέλκυση ωφέλιμων εντόμων.



Εικόνα 15: Παγίδα κίτρινου χρώματος.

- Παγίδες με διαφόρων τύπων ελκυστικά τροφής (υδρολυμένες πρωτεΐνες, απελευθέρωση αμμωνίας).
- Παγίδες με ελκυστικά φύλου ή ελκυστικά φύλου σε συνδυασμό με απελευθέρωση αμμωνίας.

1.7.2.2 Παρεμπόδιση σύζευξης

Σκοπός της μεθόδου είναι ο κορεσμός του περιβάλλοντος του εντόμου με φερομόνη ώστε τα έντομα που αντιδρούν (συνήθως τα αρσενικά) να μην μπορούν να επισημάνουν την πηγή της φυσικής φερομόνης (δηλαδή άτομα του αντίθετου φύλου) και, συνεπώς, δεν γίνεται εφικτή η σύζευξη (Montiel Bueno, 1986).

1.7.2.3 Αποτρεπτικά και αποθητικά ωοτοκίας

Τα θηλυκά του δάκου εμφανίζουν προτίμηση ως προς την εναπόθεση των αυγών τους στους πράσινους καρπούς όπου κανένα άλλο θηλυκό δεν έχει προηγουμένως ωοτοκήσει. Μετά την εναπόθεση, επαλείφουν την επιφάνεια του καρπού με χυμό που εκκρίνεται από την οπή ωοτοκίας, ο οποίος φαίνεται να ενεργεί ως ουσία αποτρεπτική της ωοτοκίας. Πειράματα έδειξαν ότι ορισμένες χαλκούχες ενώσεις, πέραν της θανάτωσης των προνυμφών του δάκου της ελιάς στον ελαιόκαρπο, μπορούν να αποτρέψουν την ωοτοκία του εντόμου (Prophetou-Athanasiadou et al., 1991). Μειονεκτήματα της χρήσης των ουσιών αυτών είναι η υπολειμματική τους δράση και οι φυτοτοξικές επιδράσεις που προκαλούνται μετά τις επεμβάσεις.

1.7.2.4 Τεχνική του στείρου ατόμου

Αφορά στην εξαπόλυση στη φύση στερωμένων ατόμων εργαστηριακού πληθυσμού με σκοπό τη μείωση του αναπαραγωγικού δυναμικού του φυσικού πληθυσμού, δηλαδή την παρεμπόδιση δημιουργίας απογόνων. Απαραίτητη προϋπόθεση για την εξασφάλιση της επιτυχίας της μεθόδου αποτελεί η παραγωγή μεγάλου αριθμού στείρων εντόμων που θα μπορούν να συζευχθούν με τα έντομα του φυσικού πληθυσμού (Knipling, 1979).

Η εφαρμογή της μεθόδου συντελείται στις κάτωθι φάσεις:

1. Παραγωγή των εντόμων υπό ελεγχόμενες συνθήκες.

2. Ακτινοβόλησή τους σε πηγή ραδιενεργού κοβαλτίου ή άλλη πηγή ακτίνων γ.
3. Αποθήκευση σε κατάλληλες συνθήκες ως τη μεταφορά τους.
4. Μεταφορά στην περιοχή εξαπόλυσης.
5. Εξαπόλυση από το έδαφος.
6. Παρακολούθηση της αναλογίας των δύο πληθυσμών (φυσικού και εργαστηριακού) και αξιολόγηση του αποτελέσματος.

Η εν λόγω μέθοδος εφαρμόστηκε στην Κασσάνδρα της Χαλκιδικής, σε συνδυασμό με την χημική μέθοδο, με σκοπό την καταπολέμηση του δάκου (Economopoulos et al., 1977). Με βάση τα αποτελέσματα του πειράματος, πρωτεύοντα ρόλο για την επιτυχία της μεθόδου καταλαμβάνει η έγκαιρη εφαρμογή τόσο των εντομοκτόνων όσο και των εξαπολύσεων. Επίσης, η μέθοδος είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα μόνο υπό συνθήκες επαρκούς απομόνωσης των πειραματικών ελαιώνων και των χαμηλών πληθυσμών του εντόμου. Η χρήση εντομοκτόνων καθίσταται απαραίτητη, καθώς δημιουργείται ισχυρή αναπαραγωγική απομόνωση μεταξύ του εργαστηριακού και του φυσικού πληθυσμού.

Συγκεκριμένα, καταγράφονται μεταβολές στη συμπεριφορά, αναπαραγωγή και φυσιολογία των εντόμων εργαστηριακής εκτροφής που επεξηγούν την περιορισμένη αποτελεσματικότητα της μεθόδου αυτής. Η σημαντικότερη διαφορά μεταξύ εργαστηριακών και φυσικών πληθυσμών είναι οι διαφορετικές ώρες σύζευξης μεταξύ των δύο πληθυσμών (Economopoulos and Zervas 1982, Economopoulos et al. 1977). Σε κάθε περίπτωση, το περιβάλλον της εργαστηριακής εκτροφής επιφέρει αλλαγές στον φυσικό πληθυσμό, συμπεριλαμβανομένων και γενετικών αλλαγών που συμβαίνουν στις 3-4 γενεές της εργαστηριακής εκτροφής του εντόμου (Zouros et al. 1982, Loukas et al. 1985).

Η επιτυχία αυτής της μεθόδου εξαρτάται από:

- Το είδος του εντομολογικού εχθρού που πρόκειται να καταπολεμηθεί

- Τη μέθοδο στείρωσης
- Την αναλογία των στειρών εντόμων που απελευθερώνονται σε σχέση με τα άγρια έντομα που υπάρχουν στη φύση.
- Το αν η ελαιοκαλλιέργεια είναι σε απομονωμένη περιοχή σε σχέση με τις υπόλοιπες καλλιέργειες.
- Την ικανότητα των στειρών εντόμων να εκπληρώσουν το σκοπό για τον οποίο δημιουργήθηκαν.

Επειδή τα έντομα τεχνητής εκτροφής μεγαλώνουν σε διαφορετικό περιβάλλον από αυτό που τελικά απελευθερώνονται, διαταράσσονται οι φυσιολογικές και βιολογικές τους συνήθειες. Έτσι, προκύπτει μια διαφορετική συμπεριφορά των εντόμων αυτών και γι' αυτό η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρνητικά αποτελέσματα. Ωστόσο, η τεχνική του στειρού εντόμου εξακολουθεί να αποτελεί αντικείμενο μελέτης, ώστε με τη βελτίωση των παραμέτρων της στο μέλλον να επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα στην καταπολέμηση του φυσικού πληθυσμού του δάκου (Estes et al. 2011, Rempoulakis and Nestel 2011).

1.7.3 Βιολογική καταπολέμηση

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη χρήση παράσιτων εντόμων του δάκου. Αυτό επιτυγχάνεται μετά από την εκτροφή αυτών των παρασίτων σε τεχνητές συνθήκες (εντομοεκτροφεία). Ένα μειονέκτημα της μεθόδου αυτής είναι το υψηλό κόστος που έχει η παραγωγή μεγάλου αριθμού παρασίτων. Επίσης, ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι η εφαρμογή της μεθόδου αυτής δεν θα πρέπει να γίνεται σε ελαιώνες που γειτνιάζουν με άλλους ελαιώνες στους οποίους δεν εφαρμόζεται η βιολογική καταπολέμηση. Η μέθοδος αυτή είναι μια συμπληρωματική μέθοδος καταπολέμησης, με προοπτικές βελτίωσης (Hoelmer et al, 2011). Η βιολογική καταπολέμηση γενικότερα με τη χρήση εντομοπαθογόνων μικροοργανισμών βασίζεται στη χρησιμοποίηση παθογόνων μικροοργανισμών (βακτήρια, μύκητες, ιοί, πρωτόζωα) που προκαλούν ασθένειες στα έντομα (μικροβιακή καταπολέμηση). Στην περίπτωση του δάκου της ελιάς έχουν αναφερθεί το βακτήριο *Pseudomonas putida* (παθογόνο για τα ακμαία του δάκου σε εργαστηριακές δοκιμές, αλλά δεν είναι γνωστή ακόμη η δράση του επί του εντόμου σε φυσικές συνθήκες),

τα Microsporidia του πρωτοζώου *Octospora muscae* (Domestidae) (αν και προκαλεί θνησιμότητα στις προνύμφες γύρω στο 90%, πρακτικά υπάρχει η δυσκολία μόλυνσης των προνυμφών του εντόμου στη φύση με ένα παρασκεύασμα που θα περιέχει παράσιτο) και οι ιοί Picornavirus CrPV και ο Iridovirus CIV (Manousis and Moore, 1987). Επίσης τοξίνες του *Bacillus Thuringiensis* σε εργαστηριακές μελέτες μείωσαν σημαντικά τη βιωσιμότητα των ενηλίκων, ενώ επηρέασαν σημαντικά και άλλες παραμέτρους του βιολογικού κύκλου του εντόμου όπως περίοδο ωοτοκίας, ωοπαραγωγή, εκκολαπτικότητα αυγών και νύμφωση, ενώ με εφαρμογή στον αγρό, με ψεκάσμο σπορίων και κρυστάλλων, επετεύχθη σημαντική προστασία της ελαιοπαραγωγής (Navrozidis et al, 2000). Τελευταία, ενθαρρυντικά αποτελέσματα έδωσε κι η χρήση στελέχους *Wolbachia*, συμβιωτικού του *Rhagoletis cerasi*, στα πλαίσια της βιολογικής καταπολέμησης του δάκου της ελιάς (Apostolaki et al., 2011).

Συνοπτικά, τα σπουδαιότερα παράσιτα και αρπακτικά έντομα για τη βιολογική καταπολέμηση του δάκου της ελιάς είναι τα εξής:

Παράσιτα (προνύμφης δάκου):

<i>Eupelmus urozonus</i>	Eupelmidae	Hymenoptera
<i>Pnigalio mediterraneus</i>	Eulophidae	Hymenoptera
<i>Eurytoma martelli</i>	Eurytomidae	Hymenoptera
<i>Cyrtoptyx latipes</i>	Pteromalidae	Hymenoptera
<i>Opius concolor</i>	Braconidae	Hymenoptera

Αρπακτικά:

Carabus banozi
Licinus aegyptiacus
Pterostichus creticus
Ocypus oleus
Ocypus fulvipennis
Scolopendra ortica

1.7.4 Χημική καταπολέμηση

Οι μέθοδοι καταπολέμησης του δάκου με ψεκασμούς χημικών εντομοκτόνων είναι οι πιο συνηθισμένες και κατά κύριο λόγο οι πιο αποτελεσματικές. Τα καλύτερα αποτελέσματα αυτής της μεθόδου έχει δώσει η εφαρμογή δύο οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων: του fenthion (εμπορική ονομασία Leybacid) και του dimethoate (εμπορική ονομασία Rogor). Το πρώτο ως λιποδιαλυτό, χρησιμοποιείται για τους ψεκασμούς του καλοκαιριού και του φθινοπώρου, πριν αρχίσει η ωρίμαση του καρπού. Ωστόσο, στις μέρες μας έχει επικρατήσει η εφαρμογή του a-cypermethrin (Fastac). Για τους υπόλοιπους ψεκασμούς του φθινοπώρου χρησιμοποιείται το Rogor. Οι ψεκασμοί σταματούν ένα μήνα πριν τη συγκομιδή. Τα περισσότερα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται σε ψεκασμούς στον ελαιόκαρπο ώστε να σκοτώσουν τις προνύμφες του φθινοπώρου. Ορισμένα εντομοκτόνα είναι φυτοτοξικά αλλά αυτό εξαρτάται και από τον υγρό διαλύτη των γαλακτοματοποιήσιμων σκευασμάτων (Τζανακάκης, 1980).

Η χημική καταπολέμηση γίνεται με δύο μεθόδους:

A) Προληπτική μέθοδος

B) Θεραπευτική ή κατασταλτική μέθοδος

A) Προληπτική καταπολέμηση-μέθοδος δολωματικών ψεκασμών

Η μέθοδος αυτή βασίζεται στους ψεκασμούς με δολωματικά εντομοκτόνα (εντομοκτόνα μαζί με ελκυστικό) με σκοπό να προσελκύσει και να θανατώσει τα ενήλικα έντομα πριν προλάβουν να ωοτοκήσουν στον ελαιόκαρπο. Οι ψεκασμοί αυτοί συνήθως γίνονται με επινώτιους ψεκαστήρες από το έδαφος. Παλαιότερα πραγματοποιούνταν και δολωματικοί αεροψεκασμοί με ειδικά ψεκαστικά αεροπλάνα ή ελικόπτερα, κυρίως λόγω του ότι υπήρχε έλλειψη εργατικών χεριών ώστε να λάβουν χώρα ψεκασμοί από το έδαφος. Εξαιτίας, όμως, των μειονεκτημάτων που είχαν αυτοί οι αεροψεκασμοί, καταργηθήκαν. Ένα σημαντικό μειονέκτημα ήταν ότι όταν επικρατούσαν δυσμενείς κλιματολογικές συνθήκες οι αεροψεκασμοί αναβάλλονταν και έτσι δε γινόταν έγκαιρη παρέμβαση και η ζημιά μεγάλωνε. Επίσης, πολλές φορές το ψεκαστικό διάλυμα κατέληγε και σε εκτάσεις εκτός από τους

ελαιώνες. Επιπλέον, οι αεροψεκασμοί ζημίωναν την ωφέλιμη εντομοπανίδα.

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που λαμβάνονται υπόψη στην επιλογή της χρονικής περιόδου που θα διεξαχθεί ο δολωματικός ψεκασμός είναι η πυκνότητα του ενήλικου πληθυσμού του δάκου, η αναλογία φύλου, η παρουσία ή όχι ώριμων ωαρίων στα θηλυκά, η δεκτικότητα του καρπού για ωοτοκία και οι καιρικές συνθήκες. Έτσι, οι δολωματικοί ψεκασμοί από το έδαφος έχουν ελάχιστες αρνητικές επιπτώσεις στο οικοσύστημα.

Οι δολωματικοί ψεκασμοί από το έδαφος πραγματοποιούνται σε ένα μέρος μόνο της κόμης – ένας κλάδος ή ορισμένο φύλλωμα – κάθε πρώτου ή τρίτου ελαιόδεντρου με χοντρές σταγόνες. Ο πρώτος ψεκασμός πραγματοποιείται στα μέσα Ιουνίου μέχρι αρχές Ιουλίου, πρέπει να είναι γενικός σε όλη την περιοχή και να ολοκληρωθεί σε σύντομο χρονικό διάστημα (7 με 10 μέρες).

Έκτος από τον πρώτο ψεκασμό που είναι γενικός για όλη την περιφέρεια μπορεί να πραγματοποιηθούν και άλλοι τοπικοί ή γενικοί ψεκασμοί, οι οποίοι εξαρτώνται από το ποσοστό δακοπροσβολής του ελαιόκαρπου. Το ποσοστό αυτό προσδιορίζεται από τις δειγματοληψίες καρπών (Μπρούμας 1994, Ζιώγας 1996).



Εικόνα 16: Ψεκασμοί του δάκου της ελιάς σε ελαιοκαλλιέργειες στην Κυλλήνη Ηλείας.

B) Θεραπευτική καταπολέμηση-μέθοδοι ψεκασμών κάλυψης

Η μέθοδος αυτή μπορεί να εφαρμόζεται από κάθε ελαιοπαραγωγό μεμονωμένα, ειδικά όταν δεν εφαρμόζονται μέτρα καταπολέμησης του δάκου από το Υπουργείο Γεωργίας. Σύμφωνα με αυτή τη μέθοδο, η κόμη του ελαιόδεντρου καλύπτεται με ψεκαστικό υγρό από το έδαφος με σκοπό να σκοτωθούν τόσο τα ενήλικα όσο και οι προνύμφες μέσα στον καρπό. Οι ψεκασμοί πραγματοποιούνται συνήθως με ψεκαστήρες μεγάλου όγκου και πολύ λιγότερο με επινώτιους ψεκαστήρες μικρού όγκου. Κάποιες φορές χρειάζονται 2 με 4 θεραπευτικοί ψεκασμοί για την προστασία της ελαιοπαραγωγής. Πρέπει οπωσδήποτε να τηρούνται τα ελάχιστα χρονικά όρια ανάμεσα στον τελευταίο ψεκασμό και την αρχή της συγκομιδής, ώστε να μην υπάρχουν υπολείμματα εντομοκτόνων στο ελαιόλαδο.

Ωστόσο, η παραπάνω μέθοδος δεν τυγχάνει ευρείας εφαρμογής καθώς φέρει ως παράπλευρες απώλειες το θάνατο πληθώρας ωφέλιμων εντομοφάγων εντόμων σε μεγαλύτερο βαθμό συγκριτικά με την προληπτική μέθοδο, με συχνή συνέπεια την εμφάνιση εξάρσεων πληθυσμών κοκκοειδών και άλλων εχθρών της ελιάς.

Εν γένει, η χρήση εντομοκτόνων και συναφών χημικών παρασκευασμάτων αποτελεί πηγή πρόκλησης σημαντικών οικολογικών και οικονομικών προβλημάτων. Σε πολλές περιπτώσεις, ο ψεκασμός με εντομοκτόνα θανατώνει, εκτός από τον δάκο, και άλλα έντομα, διαταράσσοντας την οικολογική ισορροπία. Τέτοιες περιπτώσεις έχουν αναφερθεί στην ελαιοκαλλιέργεια για το λεκάνιο (*Saissetia oleae*) και άλλα κοκκοειδή στη χώρα μας (Alexandrakis and Neuenschwander 1980, Kapatos and Fletcher 1983) αλλά και σε άλλες μεσογειακές χώρες (Delrio, 1985). Εξίσου σημαντικό πρόβλημα αποτελεί η μόλυνση προϊόντων άλλων καλλιεργειών με άμεση γειννίαση με ελαιώνες, καθώς και η μόλυνση του εδάφους, των τροφών και των υδάτων. Επιπρόσθετα και κυριότερα, η τυχαία έκθεση σε αυτά τα υψηλής συγκέντρωσης εντομοκτόνα πιθανόν να θέτει σε άμεσο κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου. Σε οικονομικό επίπεδο ανακύπτουν προβλήματα στη διάθεση των προϊόντων, λόγω της παρουσίας τοξικών υπολειμμάτων.

Εντούτοις, βασική μέθοδος καταπολέμησης του δάκου παραμένει η χημική (Haniotakis 2003, Margaritopoulos et al. 2008) με τη χρήση, ως επί το πλείστον του οργανοφωσφορικού dimethoate. Στις μέρες μας

χρησιμοποιούνται επίσης ως σκευάσματα το πυρεθρινοειδές alpha cypermethrin καθώς και η μακροκυκλική λακτόνη φυσικής προέλευσης spinosad. Η εφαρμογή των εντομοκτόνων γίνεται με δολωματικούς ψεκασμούς, κυρίως, ενώ για τους τελευταίους ψεκασμούς πριν τη συγκομιδή επιλέγονται τα πλέον υδατοδιαλυτά σκευάσματα (dimethoate) για την ελαχιστοποίηση των υπολειμμάτων.

Το σημαντικότερο πρόβλημα που ανακύπτει είναι η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα, δηλαδή η ικανότητα ενός πληθυσμού εντόμου να επιβιώνει μετά από έκθεση σε δόσεις δραστικής ουσίας που κανονικά θα ήταν θανατηφόρες. Συγκεκριμένα, όταν δε γίνεται ενδεδειγμένη χρήση των φυτοπροστατευτικών ουσιών, η ένταση και η συχνότητα των ψεκασμών δημιουργούν μία ισχυρή πίεση επιλογής, με αποτέλεσμα να επιλέγονται ανθεκτικά γονίδια με αποτέλεσμα με την πάροδο των γενεών αρχικά ευπαθείς πληθυσμούς να μετατρέπονται σε ανθεκτικούς. Αναφορικά με το δάκο της ελιάς, έχουν διεξαχθεί μελέτες ως προς την ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα πυρεθρινοειδή, στα οργανοφωσφορικά και στο spinosad (Vontas et al., 2011).

Ως συνέπεια των εντατικών ψεκασμών με οργανοφωσφορικά επί δεκαετίες, ο δάκος παρουσίασε ανθεκτικότητα στο εντομοκτόνο dimethoate (Vontas et al. 2001, Vontas et al. 2002, Skouras et al. 2007). Συγκεκριμένα στα πλαίσια της μελέτης της ανθεκτικότητας του δάκου της ελιάς στα εντομοκτόνα, αναλύθηκε ο στόχος των οργανοφωσφορικών στο δάκο, το ένζυμο της ακετυλοχολινεστεράσης. Βρέθηκαν δύο μεταλλάξεις, σημειακές, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου των ανθεκτικών ατόμων, οι Ile214Val και Gly488Ser (Vontas et al., 2001) καθώς και μία έλλειψη Δ3Q (Kakani et al., 2008). Οι προαναφερθείσες μεταλλαγές καθιστούν την ακετυλοχολινεστεράση των ανθεκτικών εντόμων λιγότερο ευαίσθητη στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.

Οι Skouras et al. (2007) μελέτησαν την ανθεκτικότητα των πληθυσμών του δάκου στο dimethoate στην Κύπρο και στην Ελλάδα επί δύο έτη. Τριάντα ένα πληθυσμοί από διάφορες περιοχές της Ελλάδας και εννέα από την Κύπρο καθώς και ένας εργαστηριακός, που χρησίμευσε ως μάρτυρας, δοκιμάστηκαν με τοπική εφαρμογή dimethoate. Σημαντική διαφοροποίηση καταγράφηκε στα επίπεδα ανθεκτικότητας. Τα υψηλότερα επίπεδα ανθεκτικότητας βρέθηκαν σε πληθυσμούς από την Κρήτη και τα χαμηλότερα σε αυτούς από την Κύπρο. Αυτή η

διαφοροποίηση θα μπορούσε να αποδοθεί σε διαφορετικές επιλεκτικές πιέσεις, προκαλούμενες είτε από τις διαφορετικές επιμέρους εφαρμογές εντομοκτόνων σε κάθε περιοχή, είτε από την αυξημένη γονιδιακή ροή από περιοχή σε περιοχή.

Επίσης, μετά από έρευνα στο πυρεθρινοειδές alpha cypermethrin (Margaritoroulos et al., 2008), παρατηρήθηκαν μέτρια επίπεδα ανθεκτικότητας. Η εν λόγω ανθεκτικότητα φαίνεται να σχετίζεται με υψηλότερα επίπεδα οξειδασών στους ανθεκτικούς πληθυσμούς (Margaritoroulos et al. 2008). Παρόμοια συσχέτιση έχει βρεθεί και σε συγγενή είδη, όπως το *B.dorsalis* και το *Dacus ciliates* (Hsu et al, 2004).

Το spinosad, μία μακροκυκλική λακτόνη φυσικής προέλευσης, είναι αποτελεσματικό σε διάφορα έντομα, ωστόσο σε αρκετές περιπτώσεις έχει εμφανιστεί ανθεκτικότητα στην ουσία αυτή, που σχετίζεται με αυξημένη έκφραση οξειδασών. Η γρήγορη ανάπτυξη ανθεκτικότητας στο συγγενές είδος *Bactrocera dorsalis* (ανθεκτικότητα >400x, σε 8 γενεές επιλογής, Hsu et al, 2004) υποδεικνύει την ανάγκη παρακολούθησης του φαινομένου και στο δάκο. Πρόσφατη μελέτη με σκοπό την εκτίμηση της τοξικότητας των εντομοκτόνων spinosad και deltamethrin στα έντομα *Drosophila melanogaster* και *Bactrocera oleae* (Akmoutsou et al., 2011) υπέδειξε ότι τα εν λόγω εντομοκτόνα ήταν πιο αποτελεσματικά έναντι των ακμαίων του δάκου σε σχέση με τα ακμαία της δροσόφιλας, με το spinosad να είναι σημαντικά πιο τοξικό σε σχέση με το deltamethrin στη δροσόφιλα. Επίσης, και τα δύο εντομοκτόνα μπορούν να επιφέρουν μεγάλη τοξικότητα στα ακμαία του δάκου ακόμη και όταν εφαρμόζονται σε μικρές δόσεις επί μεγάλο χρονικό διάστημα. Η ανθεκτικότητα στο spinosad φυσικών πληθυσμών της Κύπρου, της Κρήτης και της Καλιφόρνια των Η.Π.Α. συγκριτικά με εργαστηριακούς πληθυσμούς μελετήθηκε από τους Kakani et. al.(2010). Δεν διαπιστώθηκε διαφορά στα επίπεδα ανθεκτικότητας στους πληθυσμούς της Κύπρου. Οι φυσικοί πληθυσμοί της Κρήτης εμφάνισαν τετραπλάσια αύξηση της ανθεκτικότητάς τους, ενώ της Καλιφόρνιας 9-13 φορές αύξηση. Η παρατηρούμενη ανθεκτικότητα συνδέεται με τις εφαρμογές του spinosad σε κάθε περιοχή και παρουσιάζεται αύξηση των επιπέδων ανθεκτικότητας σε περιοχές που εφαρμόζεται πιο εντατικά το εν λόγω εντομοκτόνο.

1.8 Γενετική του δάκου

Γονίωμα: Ο καρυότυπος του εντόμου αποτελείται από έξι ζεύγη χρωματοσωμάτων, ένα φυλετικό, με το αρσενικό να είναι το ετερογαμετικό φύλο (Mavragani-Tsipidou et al. 1992, Krimbas 1963) και πέντε αυτοσωματικά. Το Y είναι πολύ μικρό, ενώ το X είναι μικρότερο από όλα τα αυτοσωματικά χρωματοσώματα. Έχει βρεθεί ότι το Y και το μεγαλύτερο μέρος του X είναι υψηλά ετεροχρωματινικές περιοχές (Mavragani-Tsipidou et al., 1992). Τα χρωματοσώματά του είναι πολυταινικά, εκτός των φυλετικών (γεγονός που δείχνει την ετεροχρωματινική τους φύση) και έχουν απομονωθεί από τους σιελογόνους αδένες, το λιπαρό σώμα και τα μαλπιγγιανά σωληνάκια προνυμφών του είδους (Mavragani-Tsipidou et al. 1992, Zambetaki et al. 1995, Krimbas 1963). Σε μελέτες που έχουν γίνει σε άτομα εργαστηριακών και φυσικών πληθυσμών, δεν έχουν βρεθεί χρωματοσωματικές αναδιατάξεις (Mavragani-Tsipidou, 2002).

1.9 Πληθυσμιακή ανάλυση

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

Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ύπαρξη πολυμορφισμού στους πληθυσμούς που αναλύονται και η ανίχνευσή του με κατάλληλες μεθόδους.

1.10 Ποικιλότητα φυσικών πληθυσμών

Με τον όρο «πληθυσμός» προσδιορίζεται μια ομάδα ατόμων του ίδιου είδους που συνυπάρχουν στο χώρο και στο χρόνο και μπορούν να αναπαράγονται μεταξύ τους (το τελευταίο ισχύει για είδη με φυλετική αναπαραγωγή). Οι φυσικοί πληθυσμοί χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη πολυμορφισμού, η οποία τους δίνει την δυνατότητα να προσαρμόζονται στις περιβαλλοντικές αλλαγές. Η ύπαρξη πολυμορφισμού είναι απαραίτητη για την επιβίωση του πληθυσμού και κατ' επέκταση και του είδους, ακόμα και αν αυτές έχουν αρνητικό αντίκτυπο σε κάποια άτομα του πληθυσμού που τις φέρουν. Αυτό δεν σημαίνει ότι όλοι οι φυσικοί πληθυσμοί έχουν τον ίδιο βαθμό πολυμορφισμού. Η γενετική ποικιλότητα διαφέρει από πληθυσμό σε πληθυσμό (Ayala, 1982).

1.11 Έλεγχος ισορροπίας ενός πληθυσμού – Νόμος ή Αρχή Hardy-Weinberg

Όταν λέμε ότι οι διασταυρώσεις μεταξύ των ατόμων ενός πληθυσμού είναι τυχαίες ή ότι ο πληθυσμός είναι παμμεικτικός, εννοούμε ότι οι διασταυρώσεις είναι ανεξάρτητες από το γονότυπο και το φαινότυπο των ατόμων ή ότι η πιθανότητα που έχει ένα τυχαίο άτομο του πληθυσμού να διασταυρωθεί με ένα άτομο ορισμένου γονοτύπου, είναι ίση με τη συχνότητα του ορισμένου γονοτύπου στον πληθυσμό.

Ένας πληθυσμός μπορεί ταυτόχρονα να είναι παμμεικτικός για ορισμένα γονίδια και μη παμμεικτικός για άλλα. Π.χ. είναι λογικό να υποθέσουμε ότι οι διασταυρώσεις στους ανθρώπινους πληθυσμούς είναι τυχαίες για τις ομάδες αίματος ABO και μη τυχαίες για το χρώμα του δέρματος, το ύψος, την ευφυΐα κ.α.

Η Αρχή των Hardy-Weinberg χρησιμοποιείται για να περιγράψει γονιδιακές συχνότητες σε θεωρητικά στατικούς, από πλευράς εξέλιξης, πληθυσμούς. Τέτοιοι πληθυσμοί ονομάζονται «πληθυσμοί που βρίσκονται σε **ισορροπία Hardy-Weinberg**». Σύμφωνα με την Αρχή αυτή, οι συχνότητες των αλληλομόρφων σε έναν πληθυσμό παραμένουν σταθερές από γενεά σε γενεά, αν δεν επιδράσουν άλλοι παράγοντες/διαδικασίες εκτός από την ανακατανομή των γονιδίων κατά

τη διαδικασία της γαμετογένεσης και με δεδομένο το μεγάλο μέγεθος του πληθυσμού. Οι διαδικασίες που αλλάζουν τις συχνότητες των γονιδίων και στην προκειμένη περίπτωση πρέπει να εκλείπουν είναι η επιλογή, η μεταλλαγή, η τυχαία γενετική παρέκκλιση και η μετανάστευση. Για την περίπτωση χαρακτηριστικού που καθορίζεται από το γονίδιο A (A , a), ορίζει ότι:

Αν p και q οι συχνότητες των αλληλομόρφων A και a , τότε οι συχνότητες των γονοτύπων AA , Aa και aa είναι αντίστοιχα p^2 , $2pq$ και q^2 .

Η συγκεκριμένη Αρχή επιτρέπει τον υπολογισμό της συχνότητας των αλληλομόρφων σε έναν πληθυσμό, εφόσον είναι γνωστές οι συχνότητες των γονοτύπων και αντίστροφα. Οι προαναφερθείσες συχνότητες των γονοτύπων αφορούν σε μεγάλους τυχαία διασταυρούμενους πληθυσμούς (και επιτυγχάνονται μετά από μια γενεά τυχαίων διασταυρώσεων). Το μέγεθος, συνεπώς, του πληθυσμού πρέπει να είναι μεγάλο, θεωρητικά άπειρο καθότι σε πληθυσμούς με ορισμένο μέγεθος ενυπάρχει ένα συστηματικό σφάλμα, επειδή όλοι οι δυνατοί διαφορετικοί φαινότυποι δεν αντιπροσωπεύονται στον πληθυσμό, κυρίως όταν υπάρχει ένας σχετικά μεγάλος αριθμός αλληλομόρφων με πολύ χαμηλές συχνότητες (Λουκάς, 2003).

1.12 Γενετικές μελέτες φυσικών πληθυσμών του δάκου

Το εν λόγω έντομο αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης στο επιστημονικό πεδίο της Γενετικής Πληθυσμών από τα μέσα της δεκαετίας του '70. Οι Tsakas and Krimbas (1974) ανέλυσαν τρεις φυσικούς πληθυσμούς του δάκου της ελιάς για 6 ηλεκτροφορητικά ανιχνεύσιμους γενετικούς τόπους. Τα αποτελέσματά τους ωστόσο δεν οδήγησαν σε ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με την ύπαρξη ή μη επιλογής. Οι πληθυσμοί προέρχονταν από τις περιοχές της Κέρκυρας, της Θάσου και της Κρήτης και οι γενετικοί τόποι αντιστοιχούσαν στα εξής ένζυμα: Εστεράσες (Est-A, Est-B), APH (Adult alkaline phosphatase), ADH (Alcohol dehydrogenase), TO (Tetrazolium oxidase) και ODH

(Octanol dehydrogenase). Συγκριτικά με τα δικά μας αποτελέσματα, σχετικά με το γονίδιο της ADH, οι συχνότητες των αλληλομόρφων κυμαίνονται σε παραπλήσια επίπεδα με αυτά που παρατηρήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Ακολούθως, οι Bush and Kitto (1979) εξέτασαν δύο φυσικούς και έναν εργαστηριακό πληθυσμό του δάκου της ελιάς για 23 ένζυμα, μεταξύ των οποίων περιλαμβάνονταν η ADH, η 6-PGD και η PGM. Με βάση τα αποτελέσματά τους, οι δύο φυσικοί πληθυσμοί έχουν παραπλήσιες γενετικές συχνότητες για τα εξεταζόμενα γονίδια ενώ διαφέρουν σημαντικά από τον εργαστηριακό πληθυσμό, υποδηλώνοντας ότι οι εργαστηριακές συνθήκες είναι υπεύθυνες για τις παρατηρούμενες διαφορές. Στη μελέτη αυτή, οι αλληλόμορφοι ονομάζονται από 1 έως 5, ανάλογα με την ηλεκτροφορητική ταχύτητά τους στο πήκτωμα, αλλά με τον αλληλόμορφο 1 να αποτελεί τον πιο αργό αλληλόμορφο και τον 5 τον ταχύτερο (αντίθετα με τον δικό μας τρόπο ονοματολογίας των αλληλομόρφων). Ειδικότερα, σχετικά με το ένζυμο της 6-PGD καταγράφεται η ύπαρξη τεσσάρων αλληλομόρφων, όπου ο αλληλόμορφος 2 εμφάνιζε την μεγαλύτερη συχνότητα (0,650 και 0,700 για κάθε φυσικό πληθυσμό) ακολουθούμενος από τον αλληλόμορφο 3 (συχνοτήτων 0,180 και 0,178, αντίστοιχα), τον αλληλόμορφο 1 (συχνοτήτων 0,130 και 0,122) και τον εξαιρετικά σπάνιο αλληλόμορφο 4 (συχνοτήτων 0,40 και 0,00). Σχετικά με την ADH πιστοποιείται η ύπαρξη δύο μόνο αλληλομόρφων, με τον αλληλόμορφο 1 να εμφανίζει μεγαλύτερη συχνότητα (0,673 και 0,702 για κάθε πληθυσμό) σε σχέση με τον αλληλόμορφο 2. Τέλος, σχετικά με το γονίδιο της PGM καταγράφονται 3 αλληλόμορφοι, με τον 2 να εμφανίζει τη μεγαλύτερη συχνότητα (0,880 και 0,888), ακολουθούμενο από τον αλληλόμορφο 3 (0,100 και 0,082) και τον αλληλόμορφο 1 (0,20 και 0,31) για κάθε πληθυσμό αντίστοιχα. Εν συνεχεία, οι Tsakas and Zouros (1980) εξέτασαν 2 εργαστηριακούς και 12 φυσικούς πληθυσμούς για τους δύο γενετικούς τόπους των εστερασών. Σχετικά με τους φυσικούς πληθυσμούς παρατήρησαν ότι ανεξάρτητα από τις μεγάλες γεωγραφικές αποστάσεις μεταξύ τους, εμφανίζουν παραπλήσιες συχνότητες ως προς τους αλληλομόρφους των δύο αυτών γονιδίων.

Οι Loukas et al. (1985) μελέτησαν 10 γενετικούς τόπους με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πήκτωματος στις πρώτες έξι γενεές ενός εργαστηριακού πληθυσμού του δάκου της ελιάς. Παρατήρησαν μεγάλες

αλλαγές στα γονίδια των ενζύμων ADH και 6-PGD ενώ λιγότερο έντονες αλλά εξίσου σημαντικές αλλαγές παρατηρήθηκαν και για το γονίδιο της εξοκινάσης (HK). Αυτές οι μεταβολές υποστήριξαν ότι προκλήθηκαν από τη δράση του μηχανισμού της φυσικής επιλογής. Μικρότερες μεταβολές παρατηρήθηκαν στους υπόλοιπους γενετικούς τόπους και αυτές μπορούν να αποδοθούν στη δράση είτε της φυσικής επιλογής, είτε της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης. Επίσης, οι ερευνητές κατάληξαν ότι η τεχνητή εκτροφή του δάκου της ελιάς επάγει έντονη επιλεκτική πίεση σε μεγάλο μέρος του γενετικού πολυμορφισμού που υπάρχει στους φυσικούς πληθυσμούς του εντόμου αυτού. Αυτό το πρότυπο είναι συμβατό τόσο με την υπόθεση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης όσο και με την υπόθεση της κατευθυνόμενης επιλογής.

Ακολούθως, οι Augoustinos et. al. (2002) ανέπτυξαν στο δάκο τους μικροδορυφόρους, DNA δείκτες που λόγω της αφθονίας τους στο γονίωμα και του υψηλού τους πολυμορφισμού αποδείχθηκαν χρήσιμο εργαλείο για την ανάλυση φυσικών πληθυσμών του. Με τη χρήση αυτής της μεθόδου, οι Augoustinos et al. (2005) ανέλυσαν δείγματα από έξι διαφορετικές χώρες (Ελλάδα, Κύπρος, Τουρκία, Ιταλία, Ισπανία και Πορτογαλία). Η ανάλυση αποκάλυψε σχετικά μικρές γενετικές αποστάσεις, που έδειχναν όμως μια στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση σε τρεις υποπληθυσμούς. Ο πρώτος αποτελείται από τα δείγματα της Κύπρου, ο δεύτερος από τα δείγματα Ελλάδας, Τουρκίας και Ιταλίας και ο τρίτος από τα δείγματα της Ιβηρικής χερσονήσου. Οι στατιστικές αναλύσεις που έγιναν, έδειξαν τη σημαντική επίδραση της γεωγραφικής απόστασης στη δημιουργία αυτών των ομαδοποιήσεων. Οι τρεις αυτές ομάδες χαρακτηρίζονται από διαφορά και στο επίπεδο του πολυμορφισμού, εμφανίζοντας μια καθαρή μείωσή του από την Ανατολή προς τη Δύση. Η μείωση αυτή είναι στατιστικά σημαντική και με βάση την υπόθεση ότι η πορεία εποικισμού ενός είδους συνοδεύεται από μείωση του πολυμορφισμού, δίνει σημαντικές ενδείξεις για μια προς Δυσμάς πορεία εποίκησης του είδους στον Ευρωπαϊκό χώρο, με πρώτο κέντρο εξάπλωσης την Ανατολική λεκάνη της Μεσογείου.

Οι Nardi et al.(2005) με τη χρήση μικροδορυφορικών δεικτών και μιτοχονδριακών ακολουθιών δειγμάτων δάκου από όλες τις περιοχές εξάπλωσής του, κατέληξαν σε πολύ ενδιαφέροντα συμπεράσματα σχετικά με την ιστορία της διάδοσης και του αποικισμού του δάκου της ελιάς. Συγκεκριμένα, τα αποτελέσματά τους ισχυροποιούν την υπόθεση

ότι η Αφρική αποτελεί τον τόπο καταγωγής του δάκου της ελιάς και όχι η Μεσόγειος, εξαιτίας της μεγάλης γενετικής ποικιλομορφίας των πληθυσμών της Αφρικής σε σχέση με τους υπόλοιπους. Επίσης, κατέδειξαν ότι ο πληθυσμός του Πακιστάν είναι γενετικά διαφοροποιημένος σε μεγάλο βαθμό σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Τα αποτελέσματά τους, εν κατακλείδι, είναι σύμφωνα με τις προηγούμενες μελέτες που έχουν διεξαχθεί σε αυτό το πεδίο και καταδεικνύουν ως περιοχή προέλευσης του δάκου της ελιάς την ήπειρο της Αφρικής και διαχωρίζουν τους πληθυσμούς του σε τρεις ομάδες: τους πληθυσμούς της Αφρικής, τους πληθυσμούς του Πακιστάν και τους πληθυσμούς της Μεσογείου (στους οποίους συμπεριλαμβάνονται και οι πρόσφατα εισαχθέντες πληθυσμοί του δάκου στην Καλιφόρνια των Η.Π.Α. και στο Μεξικό).

Τέλος, οι Nardi et al.(2010) μελέτησαν την εξελικτική ιστορία του δάκου της ελιάς με την ανάλυση του μιτοχονδριακού DNA 21 δειγμάτων από όλες τις περιοχές διασποράς του. Σκοπός της έρευνάς τους ήταν να εξακριβώσουν τη χρονική περίοδο κατά την οποία ο δάκος διαφοροποιήθηκε στη Μεσόγειο και τη συσχέτισή του με την εξάπλωση της ελαιοκαλλιέργειας και την σταδιακή αντικατάσταση της αγριοελιάς (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *sylvestris*) με τις καλλιεργούμενες ελιές (*Olea europaea* subsp. *europaea* var. *europaea*). Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι ο δάκος της ελιάς συνεξελίχθηκε με την αγριοελιά, η οποία ήταν διαδεδομένη την περίοδο του Πλειστόκαινου. Καθώς, με την πάροδο των ετών, άρχισε η εκτεταμένη εξάπλωση του καλλιεργούμενου είδους της ελιάς, το έντομο αποίκισε το καλλιεργούμενο αυτό είδος, για να καλύψει τις τροφικές του ανάγκες.

Παρόμοια με την παρούσα διατριβή, οι Orchando and Reyes (2000) μελέτησαν τέσσερεις πληθυσμούς του δάκου της ελιάς με τη μέθοδο της ηλεκτροφόρησης πηκτώματος, με στόχο την εκτίμηση της γενετικής τους δομής και της γονιδιακής ροής. Ένα μεγάλο ποσό γενετικής ποικιλομορφίας παρατηρήθηκε. Η γενετική ροή που υπολογίστηκε με τη μέθοδο του Wright έδωσε μία τιμή $N_m=8.9$. Πάντως, οι τιμές για τον δείκτη F_{st} σε τρεις από τους γενετικούς τόπους κυμάνθηκαν από 0.0451 σε 0.0620, δείχνοντας έναν ουσιαστικό βαθμό διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών ($P<0.001$). Οι παρούσες παρατηρήσεις φαίνεται να υποστηρίζουν την υπόθεση ότι παρότι η γενετική ροή είναι υψηλή ($N_m=8.9$), η φυσική επιλογή, πιθανότατα

οφειλόμενη σε πρακτικές γεωργικές, μπορεί να είναι ο κύριος παράγοντας που είναι υπεύθυνος για το πρότυπο της γενετικής ποικιλομορφίας που παρατηρείται στο έντομο *Bactrocera oleae*.

1.13 Ο ρόλος των μελετηθέντων ενζύμων στη φυσιολογία του δάκου

Στην παρούσα εργασία επελέγησαν τέσσερα γονίδια που, με βάση τις προϋπάρχουσες ερευνητικές εργασίες, υπόκεινται σε επιλεκτικές πιέσεις σε εργαστηριακούς πληθυσμούς του δάκου της ελιάς, τουλάχιστον δύο από αυτά, ως εκ τούτου έχουν ιδιαίτερο πληθυσμιακό ενδιαφέρον και ενδέχεται να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα για τη βελτίωση της εφαρμογής του στείρου εντόμου. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι ενώ γνωρίζουμε πολύ λίγες πληροφορίες σχετικά με το ρόλο που διαδραματίζουν στη φυσιολογία του εντόμου τα ένζυμα που επιδέχονται ηλεκτροφορητική ανάλυση, το ένζυμο α-GPDH αποτελεί μία ενδιαφέρουσα εξαίρεση καθότι συνδέεται με την ικανότητα πτήσης στα έντομα (Kitto and Briggs 1962, O' Brien and MacIntire 1972, Miller et al. 1975). Όντως, οι Bush et al. (1976) ανέφεραν μία δραματική αλλαγή στη συχνότητα ενός αλληλομόρφου του γονιδίου του α-GPDH, σε εργαστηριακούς πληθυσμούς του είδους *Cochliomyia hominivorax*, που προφανώς σχετίζεται με απώλεια της ανταγωνιστικής ικανότητας που παρατηρείται στις συνθήκες στη φύση. Αυτό το γονίδιο είναι μονομορφικό σε φυσικούς και σε εργαστηριακούς πληθυσμούς για το δάκο της ελιάς με βάση τους Bush and Kitto (1979).

Επίσης, σε αυτή τη μελέτη καταγράφονται πληροφορίες σχετικά με το ρόλο που ενδεχομένως διαδραματίζουν τα ένζυμα ADH και 6-PGD και PGM στη φυσιολογία των εντόμων και, κατ' επέκταση, του δάκου της ελιάς. Αναλυτικότερα, έντομα που διέρχονται από διάπαυση, όπως ο δάκος της ελιάς, είναι ικανά να ανθίστανται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες για παρατεταμένες περιόδους. Αυτή η αντοχή στο ψύχος επιτυγχάνεται πρωτίστως μέσω της παραγωγής πολυολών, διαδικασία που εμπλέκει την αντίστοιχη αφυδρογονάση (polyol dehydrogenase), ένα ένζυμο που απαιτεί NADH. Η 6-PGD αναφέρεται ότι παίζει καταλυτικό ρόλο στο μονοπάτι των πεντοζών, παρέχοντας NADH για μια πληθώρα αναγωγικών αντιδράσεων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που

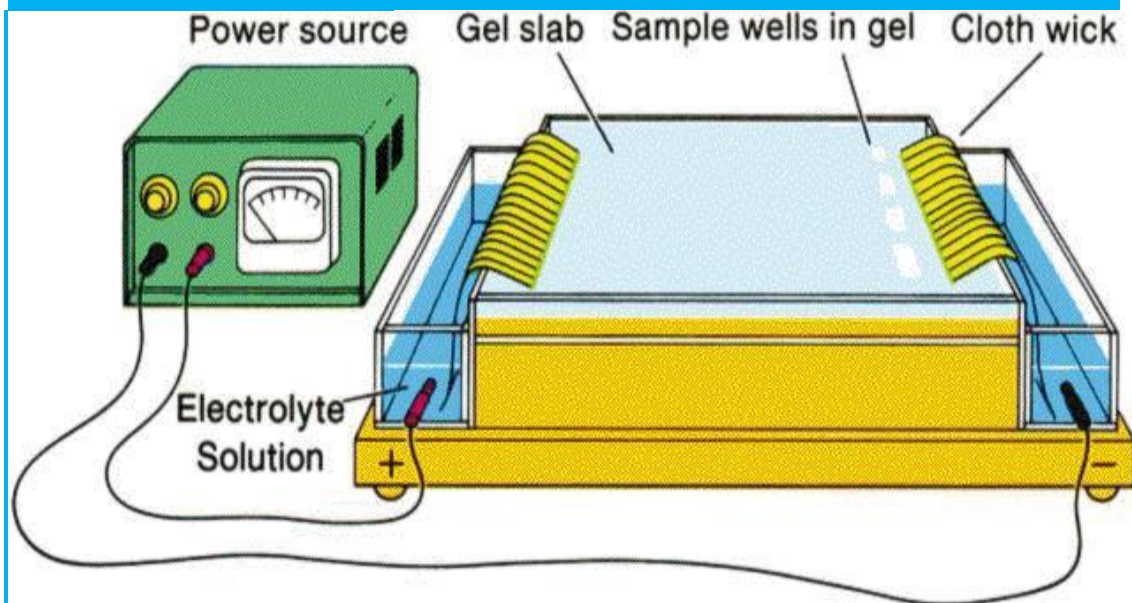
απαιτούνται για τη σύνθεση νουκλεϊκών οξέων. Συνεπώς, μια αλλαγή στα επίπεδα του NADH, που ενδεχομένως προκύπτει από διαφορές στις ιδιότητες των αλληλομόρφων της 6-PGD θα μπορούσε να έχει προσαρμοστική σημασία στη διάπαυση. Όσον αφορά στην ADH, αναφέρεται ότι εμπλέκεται στο μεταβολισμό μίας ποικιλίας αλκοολών και αυτό πιθανολογείται ότι έχει ιδιαίτερη σημασία κατά τη διάρκεια της αύξησης και ανάπτυξης της προνύμφης στον προσβεβλημένο καρπό. Τέλος, σχετικά με το ένζυμο PGM, το οποίο παίζει σημαντικό ρόλο στη διεργασία της γλυκόλυσης (Ray and Rocelli 1964, Hirose et al. 1970), οι Bush και Kitto (1979) κατέγραψαν την ύπαρξη πολυμορφισμού (παρουσία τεσσάρων αλληλομόρφων).

1.14 Σκοπός της παρούσας μελέτης

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η μελέτη της γενετικής δομής φυσικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς και η ανίχνευση και η επεξήγηση ενδεχόμενης γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των πληθυσμών αυτών, με βάση τα τέσσερα μελετηθέντα ένζυμα. Η παρούσα μελέτη, συνεπώς, θα μπορούσε περαιτέρω να συμβάλλει και στα εξής:

1. Στον καθορισμό των παραγόντων που επιδρούν στη διαφοροποίηση μεταξύ των φυσικών πληθυσμών του δάκου της ελιάς (κλιματικοί, οικολογικοί, εξωτερικοί- ανθρώπινη μεταφορά και επέμβαση-) με βάση την περιοχή ανάπτυξής του.
2. Στην καλύτερη και πιο ολοκληρωμένη αντιμετώπιση του δάκου, μέσω της βελτίωσης των προγραμμάτων που αποσκοπούν στον έλεγχο του πληθυσμού του (integral pest management – pest control).
3. Στην εξαγωγή ασφαλέστερων συμπερασμάτων σχετικά με την προέλευση του εντόμου και τις οδούς που ακολούθησε για να εξαπλωθεί από την περιοχή καταγωγής του, στις υπόλοιπες ηπείρους.

Υλικά και Μέθοδοι



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Πειραματικό υλικό

Αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής αποτέλεσαν φυσικοί πληθυσμοί του δάκου της ελιάς στο στάδιο του ακμαίου και της νύμφης. Οι πληθυσμοί αυτοί συλλέχθηκαν από προσβεβλημένες ελιές από περιοχές εντός αλλά και εκτός του Ελλαδικού χώρου, κατά την περίοδο από το Σεπτέμβριο του 2009 έως και το Φεβρουάριο του 2010. Οι περιοχές εντός της Ελλάδας ήταν οι εξής:

1. Χαλκιδική
2. Κέρκυρα
3. Μυτιλήνη
4. Πρέβεζα
5. Λευκάδα
6. Κριεζιά Εύβοιας
7. Βοτανικός (Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών)
8. Βέλος Κορινθίας
9. Πάτρα
10. Αμοργός
11. Κυπαρισσία
12. Κρήτη (Χανιά και Ρέθυμνο)

Και οι εκτός Ελλάδας πληθυσμοί από τις εξής χώρες:

1. Κύπρος (Λευκωσία)
2. Ισπανία (Βαλένθια και Λα Κορούνια)
3. Ιταλία (Πόρτιτσι)
4. Ισραήλ(Μοντίμ-Μακάμπιμ)
5. Τουρκία (Τσανάκαλε)

Η διατήρηση των δειγμάτων έγινε στους -70°C .



Εικόνα 17: Χάρτης με τις χώρες μελέτης των πληθυσμών του δάκου στην παρούσα διατριβή (1:Ισπανία, ΛαΚορούνια, 2: Ισπανία, Βαλένθια, 3: Ιταλία, 4: Τουρκία, Τσανάκαλε, 5: Ελλάδα , 6: Κύπρος, 7:Ισραήλ)

2.2 Τεχνική ανιχνεύσεως των ενζύμων

2.2.1. Γενικές πληροφορίες

Για την ανίχνευση των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε η ηλεκτροφόρηση σε πήγμα αμύλου. Η εν λόγω μέθοδος επελέγη λόγω της εφαρμογής της τα παρελθόντα έτη σε πληθυσμιακές μελέτες ενζύμων του δάκου, συνεπώς επιτρέπει τη συγκριτική τους ανάλυση. Εναλλακτικά, μελέτη της γονιδιακής δομής και διαφοροποίησης των φυσικών πληθυσμών του δάκου θα μπορούσε να επιτευχθεί με την εφαρμογή DNA sequencing και ακολούθως PCR, μελέτη του μιτοχονδριακού mRNA και RFLPS. Πληθυσμιακές μελέτες διεξάγονται και με τους μικροδορυφόρους, η χρήση των οποίων ωστόσο, λόγω του γεγονότος ότι είναι επιλεκτικά ουδέτεροι δείκτες, δεν εξυπηρετούσε τους δικούς μας στόχους γιατί η πληροφορία που μας δίνουν αφορά στην τυχαία γενετική παρέκκλιση και όχι στην επιλογή.

Στην παρούσα πειραματική πορεία μελετήθηκαν τα ένζυμα αφυδρογονάση της αλκοόλης (ADH), αφυδρογονάση του 6-φωσφορογλυκονικού (6-PGD), φωσφορογλυκομουτάση (PGM) και α-γλυκεροφωσφορικό (α-GPDH).

1. Αφυδρογονάση της αλκοόλης (ADH): Πρόκειται για ένα μεταλλοένζυμο, του οποίου ο ρόλος συνίσταται στην κατάλυση της οξειδωσης των αλκοολών για το σχηματισμό αλδευδών ή κετονών, χρησιμοποιώντας ως δέκτη ιόντων υδρογόνου το συνένζυμο NAD^+ . Το ένζυμο έχει θετικό φορτίο, γι' αυτό κατά την διάρκεια της ηλεκτροφόρησης κινείται προς την κάθοδο.

Το γονίδιο που κωδικοποιεί το ένζυμο της ADH υπέστη ενδεχομένως διπλασιασμό (Goulielmos et al., 2001), ο οποίος οδήγησε στην δημιουργία δύο γονιδίων, που ονομάστηκαν Adh1 και Adh2. Το μέγεθος των δύο αυτών γονιδίων είναι, αντίστοιχα, 1981 και 988 νουκλεοτιδικές βάσεις και κωδικοποιούν 2 πρωτεΐνες με 257 και 258 αμινοξέα, κατ' αντιστοιχία. Επιπρόσθετα, παρουσιάζουν 77% ομοιότητα μεταξύ τους και το κάθε γονίδιο αποτελείται από 3 εξόνια και 2 ιντρόνια. Από τα αποτελέσματα της ίδιας μελέτης αποκαλύπτεται ότι ο ενζυμικός πολυμορφισμός οφείλεται μόνο στο γονίδιο Adh2. Στο δάκο της ελιάς αναγνωρίζονται έξι διαφορετικοί γονότυποι για το εν λόγω ένζυμο. Το ζυμόγραμμα για την ADH είναι συμβατό με την παρουσία τριών αλληλομόρφων που διαχωρίζονται σε έναν γενετικό τόπο (locus). Υπάρχουν τρεις αλληλόμορφοι. Τα άτομα που εμφανίζουν 3 διακριτές ζώνες είναι ομοζυγωτά, ενώ με περισσότερες είναι ετεροζυγωτά. Με το γράμμα F συμβολίζεται ο αλληλόμορφος που μετακινείται με την μεγαλύτερη ταχύτητα κατά την ηλεκτροφόρηση (=Fast), με το S ο αλληλόμορφος που μετακινείται με την μικρότερη ταχύτητα (=Slow) και με το I ο αλληλόμορφος με την ενδιάμεση ταχύτητα (=Intermediate). Τα άτομα που εμφανίζουν τρεις διακριτές ζώνες αντιπροσωπεύουν τους τρεις τύπους των ομοζυγωτών (FF, SS, II), ενώ τα άτομα με τις περισσότερες ζώνες αντιπροσωπεύουν τους τρεις τύπους των ετεροζυγωτών (FI, SI, FS).

Τα τρία ισοένζυμα (ζώνες που παράγει κάθε αλληλόμορφος της ADH) έχουν την ίδια πρωτοταγή δομή και είναι διμερή ταυτόσημων ενζυμικών υπομονάδων. Η ταχύτητα μετακίνησης των ισοενζύμων προς την κάθοδο εξαρτάται από τον αριθμό των μονάδων του αρνητικά φορτισμένου συμπλόκου (NAD^+ -καρβονύλιο) με τις οποίες είναι συνδεδεμένο κάθε ισοένζυμο. Το ισοένζυμο που μετακινείται ταχύτερα προς την κάθοδο δεν είναι συνδεδεμένο με το σύμπλοκο, το ισοένζυμο με

την ενδιάμεση ταχύτητα είναι συνδεδεμένο με μία μονάδα του συμπλόκου και το ισοένζυμο με την μικρότερη ταχύτητα είναι συνδεδεμένο με δύο μονάδες (Cosmidis et al., 2002).

2. Αφυδρογονάση του 6-φωσφορογλυκονικού (6-PGD): Πρόκειται για ένα ένζυμο που συμμετέχει στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών, καταλύοντας την οξειδωτική αποκαρβοξυλίωση του 6-PGD σε 5-φωσφορική ριβουλόζη με την απελευθέρωση CO₂ και την αναγωγή του NADP. Όπως και στην περίπτωση της αφυδρογονάσης της αλκοόλης και εδώ υφίστανται 3 αλληλόμορφοι, και, ως εκ τούτου 6 διακριτοί γονότυποι. Με το γράμμα F συμβολίζεται ο αλληλόμορφος που μετακινείται με τη μεγαλύτερη ταχύτητα κατά την ηλεκτροφόρηση (=Fast), με το S ο αλληλόμορφος που μετακινείται με τη μικρότερη ταχύτητα (=Slow) και με το I ο αλληλόμορφος με την ενδιάμεση ταχύτητα (=Intermediate). Μεγαλύτερη συχνότητα στη φύση έχει ο αλληλόμορφος I ενώ στο εργαστήριο έχει παρατηρηθεί μείωση της συχνότητάς του και αύξηση της συχνότητας του F αλληλομόρφου (Goulielmos et al., 2004, Cosmidis et al., 2008).

3. Αφυδρογονάση του α-γλυκεροφωσφορικού (α-GPDH): Η πιο σημαντική λειτουργία του εν λόγω ενζύμου στο μεταβολισμό ενός ακμαίου είναι η λειτουργία του στους μυς της πτήσης, συμμετέχοντας στον επονομαζόμενο α-γλυκεροφωσφορικό κύκλο (Hansford and Sacktor, 1971). Αυτός ο κύκλος παράγει ενέργεια για τις πτήσεις μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια. Οι άλλες δύο λειτουργίες του ενζύμου αυτού αφορούν στη διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ οξειδωμένου και ανηγμένου NAD στο κυτταρόπλασμα για τη γλυκόλυση και την παροχή γλυκεροφωσφορικού για σύνθεση λιπιδίων ('O'Brien and Mac-Intyre, 1972).

4. Φωσφορογλυκομουτάση (PGM): Πρόκειται για ένα ένζυμο που καταλύει την εσωτερική μεταφορά μιας φωσφορικής ομάδας από τον C-3 στον C-2 άνθρακα, και η μεταφορά καταλήγει στην μετατροπή του 3-φωσφογλυκερινικού σε 2-φωσφογλυκερινικό μέσω ενός 2,3-διφωσφογλυκερινικού ενδιάμεσου στα πλαίσια της γλυκόλυσης (Ray and Rocelli 1964, Hirose et al. 1970).

2.2.2 Παρασκευή πήγματος

Για την παρασκευή πήγματος καλής υφής απαιτούνται 10 g αμύλου ανά 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος. Το εναιώρημα θερμαίνεται υπό συνεχή ανάδευση σε φλόγα Bunsen μέχρι αρχόμενου βρασμού. Ο βρασμός γίνεται υπό κενό και διαρκεί 30 sec. Ακολουθεί πλήρωση των πλαισίων εντός των οποίων γίνεται η ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου και η πήξη. Τα πλαίσια του πήγματος αποτελούνται από δύο γυάλινες πλάκες και από δύο πλαστικά ακρυλικά φύλλα (πλεξιγκλάς), με εσωτερικές διαστάσεις 20,5X 19,3 cm, εξωτερικές 22X 20,8 cm και πάχος 3mm. Το πάχος του πήγματος είναι 6 mm. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήγμα τέμνεται οριζόντια, με τη βοήθεια λεπτού σύρματος, σε δύο ισοπαχή τμήματα 3 mm το καθένα.

2.2.3 Λήψη και τοποθέτηση του δείγματος

Κάθε άτομο λειοτριβείται μέσα σε μια σταγόνα απεσταγμένου νερού πάνω σε πλάκα με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου. Το προϊόν της λειοτριβήσεως απορροφάται από χαρτί Whatman No 3, διαστάσεων 4-5 mm. Το πήγμα χαράσσεται καθέτως και κατά μήκος και στην τομή τοποθετείται το χαρτί σε κάθετη θέση, εμποτισμένο με το εκχύλισμα.

2.2.4 Ηλεκτροφόρηση

Το πλαίσιο με το πήγμα στο οποίο έχουν τοποθετηθεί τα δείγματα προσαρμόζεται σε ειδική συσκευή από πλαστικό με την οποία επιτυγχάνεται η συνεχής εκτόξευση ψυχρού νερού στην κάτω επιφάνεια του πήγματος. Έτσι, γίνεται δυνατή η εφαρμογή ρεύματος υψηλής τάσης και έντασης χωρίς να θερμαίνεται το πήκτωμα.

Στα δοχεία των ηλεκτροδίων προστίθεται το κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα. Ως γέφυρες μεταξύ του ηηκτώματος και του διαλύματος των ηλεκτροδίων χρησιμοποιούνται δύο κομμάτια Wettex.

2.2.4.1 Ηλεκτροφόρηση για ανίχνευση των ενζύμων ADH και 6-PGD

Η εφαρμοζόμενη τάση ρυθμίζεται στα 400 Volt ενώ η ένταση παραμένει σταθερή στα 400 mA. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι 4 ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήγμα τέμνεται οριζόντια με τη βοήθεια λεπτού σύρματος σε δύο ισοπαχή τμήματα. Η ανίχνευση του ενζύμου γίνεται επί της αποκαλυπτόμενης επιφάνειας. Η ADH μετακινείται προς την κάθοδο, σε αντίθεση με την 6-PGD, που μετακινείται προς την άνοδο.

Περιγραφή της μεθόδου ανιχνεύσεως

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο ρυθμιστικό διάλυμα:

TRIS	0,10M
Maleic acid	0,10M
EDTA 2Na	0,01M
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,01M

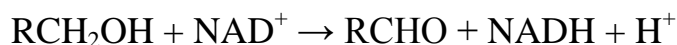
Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 7,4.

Για την παρασκευή του πηγματος το ανωτέρω διάλυμα αραιώθηκε 5 φορές, ενώ για την πλήρωση των δοχείων ηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκε ως έχει.

Διάλυμα Χρώσης

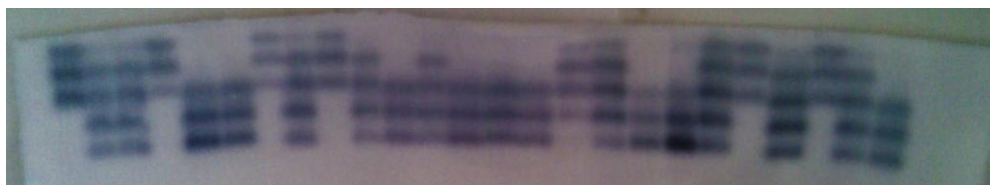
Για τη χρώση της ADH χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,1M Tris, pH =8,5. Σε 100ml του διαλύματος προστίθενται 3 ml ισοπροπανόλης, 20 mg NAD, 8 mg NBT και 4mg PMS. Η χρώση γίνεται στο σκοτάδι και η

διάρκεια επώασης είναι περίπου 2 ώρες. Η αντίδραση στην οποία βασίζεται η ανίχνευση του ενζύμου είναι η εξής:



Τα ένζυμα που ανάγουν τα πυριδινονουκλεοτίδια ανιχνεύονται με τη μέθοδο του τετραζολίου. Η μέθοδος περιλαμβάνει ένα φορέα ηλεκτρονίων, την PMS. Το ανηγμένο πυριδινονουκλεοτίδιο ανάγει την PMS, η οποία, εν συνεχεία, ανάγει το NBT. Το τελευταίο καθιζάνει ως φορμαζάνη στην περιοχή δράσεως του ενζύμου, προσδίδοντας έντονο κυανό χρωματισμό.

Για τη χρώση της 6-PGD χρησιμοποιείται διάλυμα 0,1M Tris, pH =8,5. Σε 100ml του διαλύματος προστίθενται 20mg υποστρώματος 6-φωσφογλυκονικού, 20 mg NADP, 8mg NBT και 4mg PMS. Η χρώση γίνεται στο σκοτάδι και η διάρκεια επώασης είναι περίπου 2 ώρες. Η αντίδραση στην οποία βασίζεται η ανίχνευση του ενζύμου είναι η εξής:



Εικόνα 18: gel αμύλου ADH μετά τη χρώση.

2.4.2.2 Ηλεκτροφόρηση για ανίχνευση των ενζύμων *α-GPDH* και *PGM*

Η εφαρμοζόμενη τάση ρυθμίζεται στα 400 Volt, ενώ η ένταση παραμένει σταθερή στα 300 mA. Η διάρκεια της ηλεκτροφόρησης είναι 4,5 ώρες. Μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήγμα τέμνεται οριζόντια με τη βοήθεια λεπτού σύρματος σε δύο ισοπαχή τμήματα. Η ανίχνευση του ενζύμου γίνεται επί της αποκαλυπτόμενης επιφάνειας. Τα ένζυμα *α-GPDH* και *PGM* μετακινούνται προς την άνοδο.

Περιγραφή της μεθόδου ανιχνεύσεως

Χρησιμοποιήθηκε το ακόλουθο ρυθμιστικό διάλυμα:

TRIS	0,10 M
Maleic acid	0,10 M
EDTA 2Na	0,01 M
MgCl ₂ *6H ₂ O	0,01 M

Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 7,4.

Για την παρασκευή του πήγματος το ανωτέρω διάλυμα αραιώθηκε 10 φορές, ενώ για την πλήρωση των δοχείων ηλεκτροδίων χρησιμοποιήθηκε ως έχει.

Διάλυμα Χρώσης

Για τη χρώση της *α-GPDH* χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,1M Tris, pH =8,5. Σε 100ml του διαλύματος προστίθενται 50 mg υποστρώματος *α-γλυκεροφωσφορικό*, 20 mg NAD, 8mg NBT και 4mg PMS. Η χρώση γίνεται στο σκοτάδι και η διάρκεια επώασεως είναι περίπου 2 ώρες. Η αντίδραση στην οποία βασίζεται η ανίχνευση του ενζύμου είναι η εξής:



Για τη χρώση της PGM χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 0,1M Tris, pH =8,0. Σε 100ml του διαλύματος προστίθενται 20mg υποστρώματος 1-φωσφογλυκόζη (Sigma, grade III), 30 mg $MgCl_2$, 40 μονάδες του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορογλυκόζης (G-6-PD), 20 mg NADP, 8mg NBT και 4mg PMS. Η χρώση γίνεται στο σκοτάδι και η διάρκεια επώασης είναι περίπου 2 ώρες. Οι αντιδράσεις στις οποίες βασίζεται η ανίχνευση του ενζύμου είναι οι εξής:

1-φωσφορογλυκόζη → 6-φωσφορογλυκόζη

6-φωσφορογλυκόζη + NADP → 6-φωσφορογλυκονικό οξύ + NADPH + H^+

Τα σύμβολα που χρησιμοποιήθηκαν είναι τα ακόλουθα:

NBT: Nitro Blue Tetrazolium

PMS: Phenazine Methosulfate

NAD: Νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

NADP: Φωσφορικό νικοτιναμινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο

2.3 Δείκτες που χρησιμοποιούνται στην πληθυσμιακή ανάλυση

Υπάρχουν διάφοροι δείκτες, που σκοπό έχουν να παρουσιάσουν το βαθμό ποικιλότητας, να δείξουν πόσο όμοιοι ή διαφορετικοί είναι οι πληθυσμοί μεταξύ τους, αν βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg και αν εμφανίζεται γονιδιακή ροή μεταξύ τους και σε ποιο βαθμό. Στη συνέχεια παρουσιάζονται μερικοί από αυτούς τους δείκτες, οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν και στην παρούσα μελέτη.

α. Μέτρηση γενετικής ποικιλότητας

Είναι φανερό ότι ο βαθμός της γενετικής ποικιλότητας (ή πολυμορφισμός) ενός πληθυσμού πρέπει να εξεταστεί σε μια πληθυσμιακή ανάλυση. Οι βασικοί δείκτες που μελετώνται συνήθως είναι ο πραγματικός αριθμός αλληλομόρφων (N_a), ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (N_e), η παρατηρούμενη και η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_o και H_e αντίστοιχα).

Ο πραγματικός αριθμός αλληλομόρφων (N_a): είναι ο αριθμός των αλληλομόρφων που εμφανίζονται σε ένα πληθυσμό, για κάθε γενετικό τόπο που αναλύεται. Δεν είναι ο πιο κατάλληλος δείκτης πολυμορφισμού γιατί επηρεάζεται από το μέγεθος του δείγματος και επίσης δεν εξετάζει τις σχετικές συχνότητες των διαφόρων αλληλομόρφων.

Ο δραστικός αριθμός αλληλομόρφων (N_e): υπολογίζεται χρησιμοποιώντας τον τύπο $1/\sum \chi_i^2$, όπου χ_i είναι η συχνότητα του κάθε αλληλομόρφου i στον γενετικό τόπο ή υπολογίζεται από τον τύπο $1/(1-H)$, όπου H είναι η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία.

Η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία (H_o): αντιστοιχεί στο κλάσμα των παρατηρούμενων ετεροζυγωτών προς το σύνολο των ατόμων, για ένα γενετικό τόπο.

Η αναμενόμενη ετεροζυγωτία (H_e): αντιστοιχεί στο κλάσμα των αναμενόμενων ετεροζυγωτών, όπως αυτοί προκύπτουν από τις παρατηρούμενες γονιδιακές συχνότητες και με την προϋπόθεση των τυχαίων διασταυρώσεων, προς το σύνολο των απογόνων, για ένα γενετικό τόπο.

β. Έλεγχος ισορροπίας πληθυσμού

Το κατά πόσο ένας πληθυσμός είναι **παμμεικτικός** ελέγχεται με το χ^2 και το G^2 κριτήριο. Και οι δύο αυτοί δείκτες υπολογίζουν τις αποκλίσεις, όπως αυτές προκύπτουν από τις διαφορές στις συχνότητες των παρατηρούμενων και των αναμενόμενων γονοτύπων, για κάθε γενετικό τόπο. Συνεπώς αυτό που υπολογίζουν σε αυτή την περίπτωση είναι η πιθανότητα, βάσει των γονοτύπων αυτών, που έχει ένας πληθυσμός να ακολουθεί τις συχνότητες Hardy-Weinberg. Στην παρούσα εργασία, η υπόθεση αυτή εξετάστηκε με την εφαρμογή του exact test (Markov chain Monte Carlo) μέσω της χρήσης του προγράμματος Arlequin, version 3.0. Το σύνηθες επίπεδο σημαντικότητας που χρησιμοποιείται είναι 5%.

γ. Άλλες παράμετροι

F statistics (fixation indices)-Πληθυσμιακοί δείκτες κατά Wright:

Πρόκειται για δείκτες που περιγράφουν την ιεραρχική δομή ενός πληθυσμού με βάση τα επίπεδα ετεροζυγωτίας. Αρχικά σχεδιάστηκαν τη δεκαετία του 1920 από τον Αμερικανό γενετιστή Sewall Wright με σκοπό να υπολογίσουν το ποσοστό των αλληλομόρφων που μονιμοποιήθηκαν, το οποίο οφείλεται στη δράση του φαινομένου της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης (random genetic drift) (Wright, 1984). Πρόκειται για τους εξής δείκτες:

Inbreeding coefficient-Συντελεστής ομομιξίας = $F_{IS} = (H_S - H_I) / H_S$

Υπολογίζει τη μέση μείωση της ετεροζυγωτίας H , λόγω μη τυχαίων διασταυρώσεων και αποτελεί μέτρο του βαθμού γενετικής ομομιξίας εντός υποπληθυσμών, όπου H_S είναι η αναμενόμενη ετεροζυγωτία εκάστοτε πληθυσμού και H_I η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία εκάστοτε πληθυσμού. Κυμαίνεται από -1 (όλα τα άτομα του πληθυσμού ετεροζυγωτά) έως +1 (δεν παρατηρούνται ετεροζυγωτά). Μερικές φορές αναφέρεται απλά ως F απ' ότι ως F_{IS} .

Fixation index-Δείκτης μονιμοποίησης = $F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$

Υπολογίζει τη μέση μείωση της ετεροζυγωτίας H ενός υποπληθυσμού (σε σχέση με τον ολικό πληθυσμό), λόγω τυχαίας γενετικής παρέκκλισης μεταξύ των υποπληθυσμών, όπου H_S είναι η αναμενόμενη ετεροζυγωτία εκάστοτε πληθυσμού και H_T η ετεροζυγωτία μεταξύ πληθυσμών. Συνιστά μέτρο του βαθμού γενετικής διαφοροποίησης μεταξύ των υποπληθυσμών και κυμαίνεται από 0 (καθόλου διαφοροποίηση) έως 1 (ολοκληρωτική διαφοροποίηση -υποπληθυσμοί μονιμοποιημένοι για διαφορετικούς αλληλομόρφους-).

• Overall fixation index - ολικός δείκτης μονιμοποίησης = $F_{IT} = (H_T - H_I)/H_T$

Υπολογίζει τη μέση μείωση της ετεροζυγωτίας H ενός πληθυσμού σε σχέση με τον συνολικό πληθυσμό, όπου H_T είναι η ετεροζυγωτία μεταξύ πληθυσμών και H_I η παρατηρούμενη ετεροζυγωτία εκάστοτε πληθυσμού.

Οι τρεις δείκτες συνδέονται με τη σχέση:

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS}) (1 - F_{ST})$$

Παρότι ο δείκτης F_{ST} θεωρητικά κυμαίνεται από 0 έως 1, η παρατηρούμενη μέγιστη τιμή του είναι συνήθως πολύ μικρότερη από 1. Ο Wright (1978) δίνει τις παρακάτω κατευθυντήριες οδηγίες για την ερμηνεία του δείκτη F_{ST} :

- Από 0 έως 0,05 μπορεί να θεωρηθεί ενδεικτικό μικρής γενετικής διαφοροποίησης
- Από 0,05 έως 0,15 δείχνει μέση έως μέτρια γενετική διαφοροποίηση
- Από 0,15 έως 0,25 δείχνει μεγάλη γενετική διαφοροποίηση
- Τιμές του δείκτη F_{ST} άνω του 0,25 δείχνουν πολύ μεγάλη γενετική διαφοροποίηση

Γονιδιακή ροή-Nm (gene flow): Προκύπτει από τη συνδυασμένη επίδραση του δραστικού μεγέθους των πληθυσμών προς μελέτη και του ρυθμού μετανάστευσης σε αυτούς (Larson et al. 1984). Υπολογίζεται από τον τύπο: $Nm = (1/F_{ST} - 1)/4$.

Το κατά πόσο ένας πληθυσμός είναι **ομοιογενής** (αν τα δείγματα

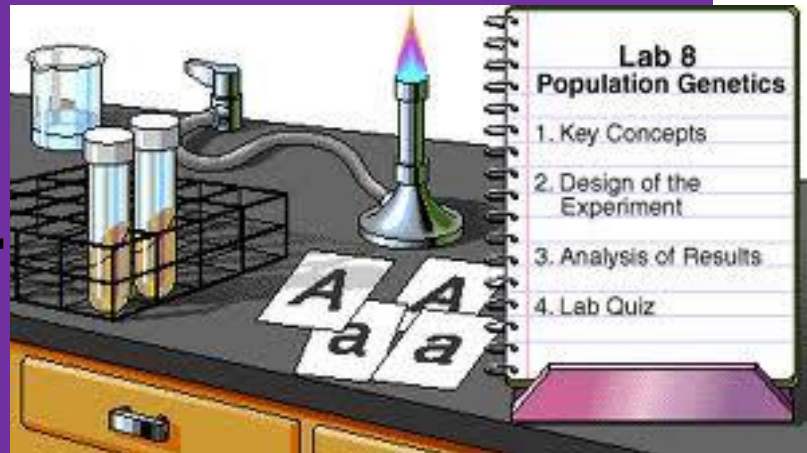
είναι δείγματα του ίδιου πληθυσμού) ελέγχεται από τις τιμές της γονιδιακής ροής και του δείκτη F_{st} ($0 < F_{st} < 1$) (Charlesworth, 1998).

Στην παρούσα μελέτη, οι στατιστικές αναλύσεις με σκοπό τον έλεγχο των πληθυσμών για την ισορροπία H-W, τη μελέτη της ομοιογένειας των πληθυσμών και τις συγκρίσεις μεταξύ τους (pairwise differences και exact test of differentiation) διεξήχθησαν με το πρόγραμμα πληθυσμιακής ανάλυσης **Arlequin, version 3.0**.

Στους πίνακες που παραβάλλονται στα αποτελέσματα, οι αλληλόμορφοι για κάθε γόνο συμβολίζονται αριθμητικά, στην κλίμακα του 1 έως 5 (ανάλογα με το υπό εξέταση γονίδιο), με βάση την ηλεκτροφορητική τους ταχύτητα. Ο αλληλόμορφος 1 είναι ο ταχύτερος ηλεκτροφορητικά αλληλόμορφος και ο αλληλόμορφος 5 ο βραδύτερος. Στην περίπτωση της **ADH** και της **6-PGD** οι αλληλόμορφοι 1, 2 και 3 αντιστοιχούν στους αλληλομόρφους F,I και S, με βάση τις μελέτες που έχουν διεξαχθεί για κάθε ένζυμο, για την ADH (Goulielmos et al. 2001, Cosmidis et al. 2002) και για την 6-PGD (Goulielmos et al. 2004, Cosmidis et al. 2008).

A

ποτελέσματα



3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Ελλαδικοί πληθυσμοί

ΠΙΝΑΚΑΣ 1		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,279	
2	0,008	
3	0,713	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	5	4,738
12	1	0,279
13	23	24,246
22	0	0,004
23	0	0,713
33	32	31,020
ΣΥΝΟΛΟ	61	61
H-W	P=0,356	

ΠΙΝΑΚΑΣ 2		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,107	
2	0,844	
3	0,049	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0,693
12	13	10,975
13	0	0,639
22	43	43,479
23	4	5,066
33	1	0,148
ΣΥΝΟΛΟ	61	61
H-W	P=0,191	

ΠΙΝΑΚΑΣ 3		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,062	
3	0,922	
4	0,016	
5	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	1	0,25
23	6	7,375
24	0	0,125
33	55	54,390
34	2	1,844
44	0	0,016
ΣΥΝΟΛΟ	64	64
H-W	P=0,327	

ΠΙΝΑΚΑΣ 4		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,008	
2	0,992	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0,004
12	1	0,992
22	61	61,004
ΣΥΝΟΛΟ	62	62
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 5		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΕΡΚΥΡΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,324	
2	0,000	
3	0,676	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	9	7,784
12	0	0,000
13	30	32,432
22	0	0,000
23	0	0,000
33	35	33,784
ΣΥΝΟΛΟ	74	74
H-W	P=0,608	

ΠΙΝΑΚΑΣ 6		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΕΡΚΥΡΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,143	
2	0,762	
3	0,095	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0,857
12	12	9,143
13	0	1,143
22	22	24,381
23	8	6,095
33	0	0,381
ΣΥΝΟΛΟ	42	42
H-W	P=0,497	

ΠΙΝΑΚΑΣ 7		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΕΡΚΥΡΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,109	
3	0,728	
4	0,163	
5	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	1	0,543
23	8	7,283
24	0	1,630
33	22	24,397
34	15	10,924
44	0	1,223
ΣΥΝΟΛΟ	46	46
H-W	P=0,162	

ΠΙΝΑΚΑΣ 8		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΕΡΚΥΡΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	1	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0
12	0	0
22	50	50
ΣΥΝΟΛΟ	50	50
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 9		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,324	
2	0,000	
3	0,676	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	11	11,010
12	0	0,000
13	46	45,981
22	0	0,000
23	0	0,000
33	48	48,009
ΣΥΝΟΛΟ	105	105
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 10		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,139	
2	0,841	
3	0,020	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	1,941
12	28	23,564
13	0	0,554
22	69	71,535
23	4	3,366
33	0	0,040
ΣΥΝΟΛΟ	101	101
H-W	P=0,294	

ΠΙΝΑΚΑΣ 11		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,085	
3	0,848	
4	0,049	
5	0,018	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	0	0,806
23	19	16,116
24	0	0,933
25	0	0,339
33	78	32,939
34	11	9,330
35	4	3,393
44	0	0,270
45	0	0,196
55	0	0,036
ΣΥΝΟΛΟ	112	112,
H-W	P=0,813	

ΠΙΝΑΚΑΣ 12		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	1	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0
12	0	0
22	115	115
ΣΥΝΟΛΟ	115	115
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 13		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΡΕΒΕΖΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,352	
2	0,000	
3	0,648	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	16	14,595
12	0	0
13	51	53,810
22	0	0
23	0	0
33	51	49,595
ΣΥΝΟΛΟ	118	118
H-W	P=0,553	

ΠΙΝΑΚΑΣ 14		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΡΕΒΕΖΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,227	
2	0,693	
3	0,080	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	5	6,126
12	43	37,437
13	1	4,311
22	53	57,195
23	16	13,172
33	1	0,758
ΣΥΝΟΛΟ	119	119
H-W	P=0,161	

ΠΙΝΑΚΑΣ 15		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΡΕΒΕΖΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,126	
3	0,845	
4	0,029	
5	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	0	1,891
23	30	25,336
24	0	0,882
33	82	84,876
34	7	5,912
44	0	0,103
ΣΥΝΟΛΟ	119	119
H-W	P=0,266	

ΠΙΝΑΚΑΣ 16		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΡΕΒΕΖΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	1	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0
12	0	0
22	134	134
ΣΥΝΟΛΟ	134	134
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 17		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΛΕΥΚΑΔΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,290	
2	0,000	
3	0,710	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	8	6,818
12	0	0
13	31	33,364
22	0	0
23	0	0
33	42	40,818
ΣΥΝΟΛΟ	81	81
H-W	P=0,598	

ΠΙΝΑΚΑΣ 18		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΛΕΥΚΑΔΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,327	
2	0,612	
3	0,061	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	5	5,224
12	22	19,592
13	0	1,959
22	16	18,367
23	6	3,673
33	0	0,184
ΣΥΝΟΛΟ	49	49
H-W	P=0,287	

ΠΙΝΑΚΑΣ 19		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΛΕΥΚΑΔΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,103	
3	0,833	
4	0,064	
5	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	0	0,671
23	13	10,833
24	0	0,825
33	42	43,75
34	8	6,667
44	0	0,254
ΣΥΝΟΛΟ	63	63
H-W	P=0,850	

ΠΙΝΑΚΑΣ 20		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΛΕΥΚΑΔΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,008	
2	0,992	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0,004
12	1	0,992
22	58	58,004
ΣΥΝΟΛΟ	59	59
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 21		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΕΥΒΟΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,399	
2	0,000	
3	0,601	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	15	15,760
12	0	0,000
13	49	47,480
22	0	0,000
23	0	0,000
33	35	35,76
ΣΥΝΟΛΟ	99	99
H-W	P=0,851	

ΠΙΝΑΚΑΣ 22		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΕΥΒΟΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,179	
2	0,738	
3	0,083	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	3	3,488
12	29	28,803
13	4	3,220
22	59	59,452
23	14	13,294
33	0	0,743
ΣΥΝΟΛΟ	109	109
H-W	P=0,971	

ΠΙΝΑΚΑΣ 23		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΕΥΒΟΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,089	
3	0,856	
4	0,055	
5	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	0	0,356
23	8	6,844
24	0	0,444
33	32	32,939
34	5	4,278
44	0	0,139
ΣΥΝΟΛΟ	45	45
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 24		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΕΥΒΟΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,019	
2	0,981	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0,029
12	3	2,942
22	75	75,029
ΣΥΝΟΛΟ	78	78
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 25		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΒΟΤΑΝΙΚΟΥ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,320	
2	0,000	
3	0,680	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	15	11,686
12	0	0,000
13	43	49,627
22	0	0,000
23	0	0,000
33	56	52,686
ΣΥΝΟΛΟ	114	114
H-W	P=0,204	

ΠΙΝΑΚΑΣ 26		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΒΟΤΑΝΙΚΟΥ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,045	
3	0,955	
4	0,000	
5	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	0	0,091
23	4	3,818
33	40	40,091
ΣΥΝΟΛΟ	44	44
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 27		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΒΟΤΑΝΙΚΟΥ		
ΠΙΝΑΚΑΣ 28		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	1	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0
12	0	0
22	85	85
ΣΥΝΟΛΟ	85	85
H-W	P=1,000	

ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΟΡΙΝΘΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,30	
2	0,00	
3	0,70	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	5	2,250
12	0	0,000
13	5	10,500
22	0	0,000
23	0	0,000
33	15	12,250
ΣΥΝΟΛΟ	25	25
H-W	P=0,007 *	

*Με βάση τις διορθώσεις Williams και Bonferroni ο πληθυσμός αυτός ακολουθεί την ισορροπία Hardy-Weinberg.

ΠΙΝΑΚΑΣ 29		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΟΡΙΝΘΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,313	
2	0,250	
3	0,437	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	2	2,344
12	6	6,562
13	5	3,750
22	4	4,594
23	7	5,250
33	0	1,500
ΣΥΝΟΛΟ	24	24
H-W	P=0,577	

ΠΙΝΑΚΑΣ 30		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΟΡΙΝΘΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,014	
2	0,986	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0,013
12	2	1,973
22	72	72,014
ΣΥΝΟΛΟ	74	74
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 31		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΑΤΡΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,223	
2	0,636	
3	0,141	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	2	5,136
12	42	29,252
13	0	6,476
22	37	41,653
23	15	18,441
33	7	2,041
ΣΥΝΟΛΟ	103	103
H-W	P=0,000*	

*Με βάση την συνένωση των κατηγοριών 13 και 33, και τη διόρθωση Bonferroni ο πληθυσμός αυτός ακολουθεί την ισορροπία Hardy-Weinberg.

ΠΙΝΑΚΑΣ 32		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΑΤΡΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,097	
3	0,879	
4	0,024	
5	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	3	1,161
23	18	21,097
24	0	0,581
33	97	95,814
34	6	5,274
44	0	0,073
ΣΥΝΟΛΟ	124	124
H-W	P=0,093	

ΠΙΝΑΚΑΣ 33		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΠΑΤΡΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GRDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	1	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0
12	0	0
22	100	100
ΣΥΝΟΛΟ	100	100
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 34		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΑΜΟΡΓΟΥ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,316	
2	0,000	
3	0,684	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	11	10,587
12	0	0,000
13	45	45,825
22	0	0,000
23	0	0,000
33	50	49,587
ΣΥΝΟΛΟ	106	106
H-W	P=0,814	

ΠΙΝΑΚΑΣ 35		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΑΜΟΡΓΟΥ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,333	
2	0,667	
3	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	15	8,333
12	20	33,333
13	0	0,000
22	40	33,333
23	0	0,000
33	0	0,000
ΣΥΝΟΛΟ	75	75
H-W	P=0,001	

ΠΙΝΑΚΑΣ 36		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΑΜΟΡΓΟΥ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	0	
3	1	
4	0	
5	0	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
33	90	90
ΣΥΝΟΛΟ	90	90
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 37		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΑΜΟΡΓΟΥ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	1	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0
12	0	0
22	83	83
ΣΥΝΟΛΟ	83	83
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 38		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,348	
2	0,000	
3	0,652	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	54	57,104
12	0	0,000
13	220	213,792
22	0	0,000
23	0	0,000
33	197	200,104
ΣΥΝΟΛΟ	471	471
H-W	P=0,627	

ΠΙΝΑΚΑΣ 39		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,303	
2	0,579	
3	0,118	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	12	8,191
12	30	31,247
13	0	6,371
22	31	29,801
23	11	12,151
33	5	1,239
ΣΥΝΟΛΟ	89	89
H-W	P=0,00025*	

*Με βάση την συνένωση των κατηγοριών 13 και 33, και τη διόρθωση Bonferroni ο πληθυσμός αυτός ακολουθεί την ισορροπία Hardy-Weinberg.

ΠΙΝΑΚΑΣ 40		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,005	
3	0,819	
4	0,154	
5	0,022	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	0	0,003
23	0	0,819
24	1	0,154
25	0	0,022
33	68	60,992
34	9	22,923
35	4	3,275
44	9	2,154
45	0	0,615
55	0	0,044
ΣΥΝΟΛΟ	91	91
H-W	P=0,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 41		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GRDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,009	
2	0,991	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0,009
12	2	1,981
22	106	106,010
ΣΥΝΟΛΟ	108	108
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 42		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΧΑΝΙΩΝ 1		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,364	
2	0,000	
3	0,636	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	30	21,488
12	0	0,000
13	58	75,024
22	0	0,000
23	0	0,000
33	74	65,488
ΣΥΝΟΛΟ	162	162
H-W	P=0,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 43		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΧΑΝΙΩΝ 2		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,337	
2	0,000	
3	0,663	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	5	4,556
12	0	0,000
13	17	17,888
22	0	0,000
23	0	0,000
33	18	17,556
ΣΥΝΟΛΟ	40	40
H-W	P=0,735	

ΠΙΝΑΚΑΣ 44		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΧΑΝΙΩΝ 1		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,441	
2	0,437	
3	0,122	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	40	31,064
12	60	61,688
13	1	17,184
22	32	30,625
23	16	17,362
33	11	2,377
ΣΥΝΟΛΟ	160	160
H-W	P=0,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 45		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΧΑΝΙΩΝ 1		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,003	
2	0,000	
3	0,990	
4	0,000	
5	0,007	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0,002
13	1	0,990
15	0	0,006
33	152	151,015
35	0	1,981
55	1	0,006
ΣΥΝΟΛΟ	154	154
H-W	P=0,002 *	

* Με βάση την συνένωση των κατηγοριών 11, 13 και 35 και 15 με 55 και τη διόρθωση Bonferroni ο πληθυσμός αυτός ακολουθεί την ισορροπία Hardy-Weinberg.

ΠΙΝΑΚΑΣ 46		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΧΑΝΙΩΝ 1		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,002	
2	0,998	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0,001
12	1	0,998
22	202	202,001
ΣΥΝΟΛΟ	203	203
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 47		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΡΕΘΥΜΝΟΥ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,363	
2	0,000	
3	0,637	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	9	8,165
12	0	0,000
13	27	28,670
22	0	0,000
23	0	0,000
33	26	25,165
ΣΥΝΟΛΟ	62	62
H-W	P=0,771	

Πληθυσμοί εκτός Ελλάδος

ΠΙΝΑΚΑΣ 48		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΤΑΛΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,413	
2	0,000	
3	0,587	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	7	8,889
12	0	0,000
13	29	25,221
22	0	0,000
23	0	0,000
33	16	17,889
ΣΥΝΟΛΟ	52	52
H-W	P=0,389	

ΠΙΝΑΚΑΣ 49		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΤΑΛΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,160	
2	0,770	
3	0,070	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	3	1,280
12	10	12,320
13	0	1,120
22	30	29,645
23	7	5,390
33	0	0,245
ΣΥΝΟΛΟ	50	50
H-W	P=0,236	

ΠΙΝΑΚΑΣ 50		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΤΑΛΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,077	
3	0,923	
4	0,000	
5	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	0	0,308
23	8	7,384
33	44	44,308
ΣΥΝΟΛΟ	52	52
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 51		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΤΑΛΙΑΣ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	1	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0
12	0	0
22	55	55
ΣΥΝΟΛΟ	55	55
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 52		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΣΠΑΝΙΑΣ (ΒΑΛΕΝΘΙΑ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,216	
2	0,004	
3	0,780	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	7	5,511
12	1	0,160
13	36	39,763
22	0	0,002
23	0	0,780
33	74	71,729
ΣΥΝΟΛΟ	118	118
H-W	P=0,163	

ΠΙΝΑΚΑΣ 53		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΣΠΑΝΙΑΣ (ΛΑ ΚΟΡΟΥΝΙΑ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,313	
2	0,000	
3	0,687	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	6	3,906
12	0	0,000
13	13	17,187
22	0	0,000
23	0	0,000
33	21	18,906
ΣΥΝΟΛΟ	40	40
H-W	P=0,141	

ΠΙΝΑΚΑΣ 54		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΣΠΑΝΙΑΣ (ΒΑΛΕΝΘΙΑ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,192	
2	0,632	
3	0,176	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	3	3,365
12	22	22,115
13	7	6,154
22	36	36,332
23	21	20,220
33	2	2,813
ΣΥΝΟΛΟ	91	91
H-W	P=0,985	

ΠΙΝΑΚΑΣ 55		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΣΠΑΝΙΑΣ (ΒΑΛΕΝΘΙΑ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,000	
2	0,014	
3	0,972	
4	0,014	
5	0,000	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	0	0,007
23	1	0,972
24	0	0,014
33	34	34,028
34	1	0,972
44	0	0,007
ΣΥΝΟΛΟ	36	36
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 56		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΣΠΑΝΙΑΣ (ΒΑΛΕΝΘΙΑ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GRDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,159	
2	0,841	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	1,587
12	20	16,826
22	43	44,587
ΣΥΝΟΛΟ	63	63
H-W	P=0,342	

ΠΙΝΑΚΑΣ 57		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΤΟΥΡΚΙΑΣ (ΤΣΑΝΑΚΑΛΕ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,411	
2	0	
3	0,589	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	8	9,446
12	0	0
13	30	27,107
22	0	0
23	0	0
33	18	19,446
ΣΥΝΟΛΟ	56	56
H-W	P=0,588	

ΠΙΝΑΚΑΣ 58		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΥΠΡΟΥ (ΛΕΥΚΩΣΙΑ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,494	
2	0,008	
3	0,502	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	62	59,010
12	1	1,975
13	114	119,994
22	0	0,016
23	1	0,988
33	64	61,001
ΣΥΝΟΛΟ	242	242
H-W	P=0,725	

ΠΙΝΑΚΑΣ 59		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΥΠΡΟΥ (ΛΕΥΚΩΣΙΑ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,178	
2	0,712	
3	0,110	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	5	6,945
12	59	55,562
13	9	8,548
22	110	111,123
23	33	34,192
33	3	2,630
ΣΥΝΟΛΟ	219	219
H-W	P=0,829	

ΠΙΝΑΚΑΣ 60		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΥΠΡΟΥ (ΛΕΥΚΩΣΙΑ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	0,009	
3	0,973	
4	0,009	
5	0,009	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
22	0	0,004
23	1	0,973
24	0	0,009
25	0	0,009
33	53	53,040
34	1	0,973
35	1	0,973
44	0	0,004
45	0	0,009
55	0	0,004
ΣΥΝΟΛΟ	56	56
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 61		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΚΥΠΡΟΥ (ΛΕΥΚΩΣΙΑ)		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	1	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0
12	0	0
22	96	96
ΣΥΝΟΛΟ	96	96
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 62		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΣΡΑΗΛ		
ΓΟΝΙΔΙΟ ADH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,336	
2	0,000	
3	0,664	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	10	8,556
12	0	0,000
13	31	33,888
22	0	0,000
23	0	0,000
33	35	33,556
ΣΥΝΟΛΟ	76	76
H-W	P=0,762	

ΠΙΝΑΚΑΣ 63		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΣΡΑΗΛ		
ΓΟΝΙΔΙΟ 6-PGD		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0,148	
2	0,796	
3	0,056	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	3	1,553
12	15	16,711
13	0	1,183
22	47	44,961
23	4	6,366
33	2	0,225
ΣΥΝΟΛΟ	71	71
H-W	P=0,010*	

* Με βάση τη διόρθωση Bonferroni ο πληθυσμός αυτός ακολουθεί την ισορροπία Hardy-Weinberg.

ΠΙΝΑΚΑΣ 64		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΣΡΑΗΛ		
ΓΟΝΙΔΙΟ PGM		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	0	
3	1	
4	0	
5	0	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
33	50	50
ΣΥΝΟΛΟ	50	50
H-W	P=1,000	

ΠΙΝΑΚΑΣ 65		
ΠΛΗΘΥΣΜΟΣ ΙΣΡΑΗΛ		
ΓΟΝΙΔΙΟ α-GPDH		
ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ	
1	0	
2	1	
ΓΟΝΟΤΥΠΟΙ	ΠΑΡΑΤΗΡΗΘΕΝΤΕΣ	ΘΕΩΡΗΤΙΚΩΣ ΑΝΑΜΕΝΟΜΕΝΟΙ
11	0	0
12	0	0
22	50	50
ΣΥΝΟΛΟ	50	50
H-W	P=1,000	

Ιταλίας (Πόρτιτσι), με τη συχνότητα του 3 αλληλομόρφου να βρίσκεται, κατ' αντιστοιχία, στο 0,587. Ο αλληλόμορφος 2 παρουσιάζεται με πολύ μικρή συχνότητα μόνο σε 3 από τους συνολικά 18 πληθυσμούς που αναλύθηκαν για το ένζυμο αυτό και συγκεκριμένα στο φυσικό πληθυσμό Χαλκιδικής με συχνότητα 0,008 και στους φυσικούς πληθυσμούς Ισπανίας (Βαλένθια) και Κύπρου (Λευκωσία) με συχνότητα 0,004.

Τα αποτελέσματα αυτά ήταν εν μέρει αναμενόμενα, δεδομένων και παλαιότερων εργασιών σε αυτό το πεδίο, βάσει των οποίων στους πληθυσμούς του δάκου στη φύση παρατηρούνται σταθερά υψηλές συχνότητες του αλληλομόρφου 3, με τον αλληλόμορφο 1 να ακολουθεί και τον αλληλόμορφο 2 να βρίσκεται σε πολύ χαμηλές συχνότητες. Αντίθετα, οι εργαστηριακοί πληθυσμοί του δάκου παρουσιάζουν μείωση της συχνότητας του αλληλομόρφου 3, με επακόλουθη αύξηση στη συχνότητα του 1 και μικρότερο ποσοστό αύξησης στη συχνότητα του αλληλομόρφου 2 (Cosmidis et al., 1997).

ΠΙΝΑΚΑΣ 68

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ					ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ		ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ
	1	2	3	4	5	H _o	H _e	N
ΙΤΑΛΙΑΣ (ΠΟΡΤ.)	0,000	0,077	0,923	0,000	0,000	0,154	0,143	52
ΙΣΠΑΝΙΑΣ (ΒΑΛ.)	0,000	0,014	0,972	0,014	0,000	0,056	0,055	36
ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ	0,000	0,062	0,922	0,016	0,000	0,125	0,147	64
ΚΕΡΚΥΡΑΣ	0,000	0,109	0,728	0,163	0,000	0,500	0,436	46
ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ	0,000	0,085	0,848	0,049	0,018	0,304	0,272	112
ΠΡΕΒΕΖΑΣ	0,000	0,126	0,845	0,029	0,000	0,311	0,271	119
ΛΕΥΚΑΔΑΣ	0,000	0,103	0,833	0,064	0,000	0,333	0,293	63
ΕΥΒΟΙΑΣ	0,000	0,089	0,856	0,055	0,000	0,289	0,260	45
ΒΟΤΑΝΙΚΟΥ	0,000	0,045	0,955	0,000	0,000	0,091	0,088	44
ΠΑΤΡΑΣ	0,000	0,097	0,879	0,024	0,000	0,193	0,218	124
ΑΜΟΡΓΟΥ	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	90
ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑΣ	0,000	0,005	0,819	0,154	0,022	0,154	0,307	91
ΧΑΝΙΩΝ	0,003	0,000	0,990	0,000	0,007	0,007	0,019	154
ΚΥΠΡΟΥ (ΛΕΥΚ.)	0,000	0,009	0,973	0,009	0,009	0,054	0,053	56
ΙΣΡΑΗΛ (ΜΟΝΤ.)	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	50
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,000	0,055	0,903	0,038	0,004	0,171	0,171	
ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ			ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ*					
H _I	0,171		H _I	0,147				
H _S	0,171		H _S	0,140				
H _T	0,180		H _T	0,145				
F _{IS}	-0,003		F _{IS}	-0,053				
F _{ST}	0,055		F _{ST}	0,037				
F _{IT}	0,050		F _{IT}	-0,016				

ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ*: Χωρίς τους πληθυσμούς Κέρκυρας και Κυπαρισσίας.

Και σε αυτή την περίπτωση οι πληθυσμοί παρουσιάζουν ομοιότητες με τον αλληλόμορφο 3 να βρίσκεται σε υπεροχή σε σχέση με τους υπόλοιπους σε όλους τους πληθυσμούς ανεξαιρέτως (μέση συχνότητα 0,903). Στους πληθυσμούς Κύπρου (Λευκωσίας), Μυτιλήνης και Κυπαρισσίας παρουσιάζεται η μεγαλύτερη ποικιλομορφία λόγω της ύπαρξης τεσσάρων διαφορετικών αλληλομόρφων στη γενετική δεξαμενή καθενός πληθυσμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι ο πιο σπάνιος αλληλόμορφος (αλληλόμορφος 1) δεν καταγράφεται σε κανέναν άλλο πληθυσμό παρά μόνο στον πληθυσμό Χανίων με μικρή συχνότητα (συχνότητα 0,003).

⊗ α-GPDH

ΠΙΝΑΚΑΣ 69

ΠΛΗΘΥΣΜΟΙ	ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΟΙ		ΕΤΕΡΟΖΥΓΩΤΙΑ		ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΤΟΜΩΝ
	1	2	H _o	H _e	N
ΙΤΑΛΙΑΣ (ΠΟΡΤ.)	0	1	0	0	55
ΙΣΠΑΝΙΑΣ (ΒΑΛ.)	0,159	0,841	0,317	0,269	63
ΧΑΛΚΙΔΙΚΗΣ	0,008	0,992	0,016	0,016	62
ΚΕΡΚΥΡΑΣ	0	1	0	0	50
ΜΥΤΙΛΗΝΗΣ	0	1	0	0	115
ΠΡΕΒΕΖΑΣ	0	1	0	0	134
ΛΕΥΚΑΔΑΣ	0,008	0,992	0,017	0,017	59
ΕΥΒΟΙΑΣ	0,019	0,981	0,038	0,038	78
ΒΟΤΑΝΙΚΟΥ	0	1	0	0	85
ΚΟΡΙΝΘΙΑΣ	0,014	0,986	0,027	0,027	74
ΠΑΤΡΑΣ	0	1	0	0	100
ΑΜΟΡΓΟΥ	0	1	0	0	83
ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑΣ	0,009	0,991	0,019	0,018	108
ΧΑΝΙΩΝ	0,002	0,998	0,005	0,005	203
ΚΥΠΡΟΥ (ΛΕΥΚ.)	0	1	0	0	96
ΙΣΡΑΗΛ (ΜΟΝΤ.)	0	1	0	0	50
ΜΕΣΗ ΤΙΜΗ	0,014	0,986	0,027	0,024	
ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ			ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ*		
H _I	0,027		H _I	0,008	
H _S	0,024		H _S	0,008	
H _T	0,027		H _T	0,008	
F _{IS}	-0,126		F _{IS}	-0,008	
F _{ST}	0,112		F _{ST}	-0,012	
F _{IT}	-0,013		F _{IT}	-0,021	

ΠΛΗΘΥΣΜΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ*: Χωρίς τον πληθυσμό Ισπανίας.

Στην περίπτωση του γονιδίου του α-GPDH, παρατηρήθηκαν δύο μόνο αλληλόμορφοι, όπου ο ένας εκ των δύο (ο αλληλόμορφος 2) παρατηρείται σε συντριπτική υπεροχή (με μέση συχνότητα 0,986) έναντι του δευτέρου (0,014), ο οποίος, καθότι σπάνιος, συναντάται μόνο σε ετεροζυγωτά άτομα για τα συγκεκριμένα μεγέθη των δειγμάτων μας. Όλοι οι πληθυσμοί ακολουθούν τις συχνότητες ισορροπίας H-W.

Πίνακες Δοκιμασίας Ομοιογένειας- Συγκρίσεις μεταξύ των Πληθυσμών ανά ένζυμο

Σημείωση: Στους πίνακες που παρατίθενται, οι διαφορές μεταξύ των πληθυσμών παριστάνονται με το σύμβολο «+» και η έλλειψη διαφορών με το σύμβολο « - ».

⊗ ADH

ΠΙΝΑΚΑΣ 70

ADH	ΕΥΒΟΙΑ	ΚΟΡΙΝΘΙΑ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑ	ΚΕΡΚΥΡΑ	ΑΜΟΡΓΟΣ	ΠΡΕΒΕΖΑ	ΛΕΥΚΑΔΑ	ΡΕΘΥΜΝΟ	ΎΠΡΟΣ (ΛΕΥΚ)	ΙΤΑΛΙΑ	ΙΣΡΑΗΛ	ΣΠΑΝΙΑ (ΒΑΛ)	ΣΠΑΝΙΑ (ΛΑΚ)	ΟΥΡΚΙΑ (ΤΣΑΝ)	ΒΟΤΑΝΙΚΟΣ	ΧΑΝΙΑ 1	ΧΑΝΙΑ 2	
ΕΥΒΟΙΑ		-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ΚΟΡΙΝΘΙΑ	-		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ΜΥΤΙΛΗΝΗ	-	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	+	-	-		-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑ	-	-	-	-		-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
ΚΕΡΚΥΡΑ	-	-	-	-	-		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
ΑΜΟΡΓΟΣ	-	-	-	-	-	-		-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-
ΠΡΕΒΕΖΑ	-	-	-	-	-	-	-		-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-
ΛΕΥΚΑΔΑ	+	-	-	-	-	-	-	-		-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-
ΡΕΘΥΜΝΟ	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
ΚΥΠΡΟΣ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		-	+	+	+	-	+	-	-	+
ΙΤΑΛΙΑ	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-		-	+	-	-	-	-	-	-
ΙΣΡΑΗΛ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		+	-	-	-	-	+	-
ΙΣΠΑΝΙΑ ΒΑΛ.	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-		-	+	+	+	+	+
ΙΣΠΑΝΙΑ ΛΑΚ.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-		-	-	-	+	-
ΟΥΡΚΙΑ	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-		-	-	-	-
ΒΟΤΑΝΙΚΟΣ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-		-	+	-
ΧΑΝΙΑ 1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+		-	-
ΧΑΝΙΑ 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-

Από τις συγκριτικές αναλύσεις των πληθυσμών προς μελέτη, αποδεικνύεται ότι δεν υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των πληθυσμών, παρά το γεγονός ότι είναι απομακρυσμένοι γεωγραφικά, με εξαίρεση τους πληθυσμούς της Κύπρου, της Ισπανίας καθώς και των Χανίων που παρουσιάζουν απόκλιση από τους υπόλοιπους (Πίνακας 70). Ειδικά οι πληθυσμοί της Κύπρου (Λευκωσία) και της Ισπανίας (Βαλένθια) διαφέρουν με 15 από τους συνολικά 1 πληθυσμούς προς μελέτη, της παρούσας διατριβής, στους ελέγχους ομοιογένειας ανά δύο πληθυσμούς.

§ 6-PGD

ΠΙΝΑΚΑΣ 71

6-PGD	ΕΥΒΟΙΑ	ΚΟΡΙΝΘΙΑ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑ	ΚΕΡΚΥΡΑ	ΑΜΟΡΓΟΣ	ΠΡΕΒΕΖΑ	ΛΕΥΚΑΔΑ	ΧΑΝΙΑ 1	ΚΥΠΡΟΣ	ΙΤΑΛΙΑ	ΙΣΡΑΗΛ	ΙΣΠΑΝΙΑ ΒΑΛ.	ΠΑΤΡΑ
ΕΥΒΟΙΑ		+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+
ΚΟΡΙΝΘΙΑ	+		+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
ΜΥΤΙΛΗΝΗ	+	+		-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	+	+	-		+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+
ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑ	+	-	+	+		-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
ΚΕΡΚΥΡΑ	+	+	+	+	-		+	-	+	+	+	+	+	+	+
ΑΜΟΡΓΟΣ	-	+	+	-	+	+		+	-	+	-	-	-	+	+
ΠΡΕΒΕΖΑ	+	+	+	+	-	-	+		+	+	+	+	+	+	+
ΛΕΥΚΑΔΑ	-	+	+	+	+	+	-	+		+	-	-	+	+	+
ΧΑΝΙΑ 1	+	-	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
ΚΥΠΡΟΣ	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+		-	-	-	+
ΙΤΑΛΙΑ	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-		-	+	+
ΙΣΡΑΗΛ	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-		+	+
ΙΣΠΑΝΙΑ ΒΑΛ.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+		-
ΠΑΤΡΑ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

Ενώ στην περίπτωση της ADH παρατηρείται μεγαλύτερη ομοιογένεια μεταξύ των πληθυσμών, αναφορικά με την 6-PGD οι διαφορές είναι μεγαλύτερες. Οι πληθυσμοί Αμοργού, Πάτρας, και Χανίων εμφανίζουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς (Πίνακας 71), με τις συχνότητες για τους αλληλομόρφους F, I και S να είναι οι εξής, αντίστοιχα: 0,333/0,667/0,000 για τον πληθυσμό Αμοργού, 0,223/0,636/0,141 για τον πληθυσμό Πάτρας και 0,441/0,438/0,121 για τον πληθυσμό Χανίων.

⊗ PGM

ΠΙΝΑΚΑΣ 72

PGM	ΕΥΒΟΙΑ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑ	ΚΕΡΚΥΡΑ	ΑΜΟΡΓΟΣ	ΠΡΕΒΕΖΑ	ΛΕΥΚΑΔΑ	ΧΑΝΙΑ 1	ΒΟΤΑΝΙΚΟΣ	ΠΑΤΡΑ	ΚΥΠΡΟΣ	ΙΤΑΛΙΑ	ΙΣΡΑΗΛ	ΙΣΠΑΝΙΑ ΒΑΛ.
ΕΥΒΟΙΑ		-	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
ΜΥΤΙΛΗΝΗ	-		-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	-	-		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑ	+	+	+		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ΚΕΡΚΥΡΑ	-	-	+	-		-	+	-	+	+	-	+	-	+	+
ΑΜΟΡΓΟΣ	+	+	+	-	-		+	+	+	+	+	+	+	+	+
ΠΡΕΒΕΖΑ	+	+	+	+	+	+		+	-	+	+	-	+	-	-
ΛΕΥΚΑΔΑ	-	-	+	+	-	+	+		+	+	-	+	+	+	+
ΧΑΝΙΑ 1	+	+	+	+	+	+	-	+		+	+	-	+	-	-
ΒΟΤΑΝΙΚΟΣ	+	+	-	+	+	+	+	+	+		-	-	-	-	-
ΠΑΤΡΑ	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-		+	-	+	+
ΚΥΠΡΟΣ	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+		-	-	-
ΙΤΑΛΙΑ	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+		+	-
ΙΣΡΑΗΛ	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+		-
ΙΣΠΑΝΙΑ ΒΑΛ.	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	

Μεγαλύτερη ανομοιομορφία με βάση τον έλεγχο ομοιογένειας μεταξύ των πληθυσμών παρουσιάζουν οι πληθυσμοί Κυπαρισσίας και Κέρκυρας (Πίνακας 72), με τον πληθυσμό Κυπαρισσίας να διαφέρει με όλους τους πληθυσμούς, πλην της Κέρκυρας και τον πληθυσμό Κέρκυρας (αντίστοιχα) να διαφέρει απ' όλους τους πληθυσμούς πλην της Κυπαρισσίας. Οι συχνότητες των αλληλομόρφων 1,2,3,4 και 5 για τον πληθυσμό Κυπαρισσίας ήταν 0,000/0,005/0,819/0,154/0,022 και για τον πληθυσμό Κέρκυρας 0,000/0,109/0,728/0,163/0,000, δεδομένου ότι οι μέσες συχνότητες έκαστου αλληλομόρφου για όλους τους πληθυσμούς ήταν 0,000/0,055/0,903/0,038/0,004 κατ' αντιστοιχία.

⊗ α-GPDH

ΠΙΝΑΚΑΣ 73

α-GPDH	ΕΥΒΟΙΑ	ΚΟΡΙΝΘΙΑ	ΜΥΤΙΛΗΝΗ	ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑ	ΚΕΡΚΥΡΑ	ΑΜΟΡΓΟΣ	ΠΡΕΒΕΖΑ	ΛΕΥΚΑΔΑ	ΧΑΝΙΑ 1	ΠΑΤΡΑ	ΚΥΠΡΟΣ	ΙΤΑΛΙΑ	ΙΣΡΑΗΛ	ΙΣΠΑΝΙΑ ΒΑΛ.
ΕΥΒΟΙΑ		-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
ΚΟΡΙΝΘΙΑ	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
ΜΥΤΙΛΗΝΗ	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ΧΑΛΚΙΔΙΚΗ	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
ΚΥΠΑΡΙΣΣΙΑ	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
ΚΕΡΚΥΡΑ	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	+	-	+
ΑΜΟΡΓΟΣ	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	+
ΠΡΕΒΕΖΑ	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-	+	-	+
ΛΕΥΚΑΔΑ	+	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	+	-	+
ΧΑΝΙΑ 1	+	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	+	-	+
ΠΑΤΡΑ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-	+
ΚΥΠΡΟΣ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	+
ΙΤΑΛΙΑ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	+
ΙΣΡΑΗΛ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		+
ΙΣΠΑΝΙΑ ΒΑΛ.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	

Από τους 16 πληθυσμούς προς μελέτη, ο πληθυσμός Ισπανίας (Βαλένθια) παρουσιάζει διαφοροποίηση με συχνότητες 0,841 για τον αλληλόμορφο 2 και 0,159 για τον αλληλόμορφο 1 (Πίνακας 73). Η ύπαρξη ποικιλομορφίας που καταγράφεται στον πληθυσμό Ισπανίας για το εν λόγω ένζυμο αποτελεί σημαντικό στοιχείο που μπορεί να αξιοποιηθεί στη μελέτη της εξελικτικής πορείας του εντόμου και της διάδοσής του από την Αφρική στην ήπειρο της Ευρώπης, συμπληρωματικά με παλαιότερες έρευνες σε αυτό το πεδίο, όπως θα αναφερθεί παρακάτω.



υζήτηση



Population Genetics
The Power of Populations™

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο δάκος της ελιάς, *Bactrocera Oleae*, αποτελεί ένα εξαιρετικά μεγάλης οικονομικής σημασίας έντομο, εξαιτίας της ιδιαιτερότητάς του να προσβάλλει κατ' αποκλειστικότητα τον ελαιόκαρπο, στο στάδιο της προνύμφης, και να επιφέρει ζημιά στις ελαιοκαλλιέργειες, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά στις περιοχές που έχει διαδοθεί. Όντας το κύριο παράσιτο του καρπού της ελιάς ευθύνεται για το μεγαλύτερο ποσοστό των οικονομικών απωλειών της καλλιέργειάς της (Montiel-Bueno and Jones, 2002).

Ο δάκος της ελιάς εντοπίζεται στις μέρες μας στην Ανατολική και Νότια Αφρική, στην περιοχή της Μεσογείου και στο Πακιστάν, συμπίπτοντας κατά ένα μεγάλο μέρος στην περιοχή διάδοσης της ελαιοκαλλιέργειας μέχρι ένα ορισμένο σημείο (Tzanakakis, 2006). Πρόσφατα, ο δάκος εισήχθη κατά τυχαίο τρόπο στην Καλιφόρνια (Rice 1999, Rice et al. 2003, Taylor 2000, Nardi et al. 2005, 2006, Zygouridis et al. 2009) και στο Μεξικό (Rice, 2000).

Στην παρούσα εργασία αναλύθηκαν τέσσερις ενζυμικοί πολυμορφισμοί, σε φυσικούς πληθυσμούς του δάκου της ελιάς στη λεκάνη της Μεσογείου και ιδιαίτερα στην Ελλαδική περιοχή. Οι περιοχές που επελέγησαν με κριτήριο τη μέγιστη δυνατή κάλυψη του Ελλαδικού χώρου για τη δειγματοληψία, είναι γεωγραφικά απομακρυσμένες, έτσι ώστε να μειώνεται η πιθανότητα ανάμειξης πληθυσμών. Στο σύνολό τους καλύπτουν επαρκώς από γεωγραφικής πλευράς τον Ελλαδικό χώρο. Με την προσθήκη και πληθυσμών εκτός Ελλάδος (Ισπανία, Ιταλία, Τουρκία, Κύπρος και Ισραήλ) το δείγμα μας γίνεται πιο αντιπροσωπευτικό για τους πληθυσμούς του δάκου της Μεσογείου. Άλλωστε, αυτή η ομάδα πληθυσμών παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, δεδομένης της εκτεταμένης διάδοσης της ελαιοκαλλιέργειας στις περιοχές αυτές, στις οποίες αποτελεί και βασική πηγή οικονομικών προσόδων. Η ύπαρξη και διατήρηση πολλών και διαφορετικών, από άποψη μεγέθους και γενετικής σύστασης, πληθυσμών συνιστά χρήσιμο εργαλείο για τη μελέτη του εντόμου ως προς την απόκριση στις εκάστοτε περιβαλλοντικές συνθήκες και στους εξωγενείς παράγοντες που το επηρεάζουν (ανθρωπογενείς δραστηριότητες).

Έλεγχος των φυσικών πληθυσμών δάκου της ελιάς για την υπόθεση ισορροπίας Hardy-Weinberg

Οι φυσικοί πληθυσμοί που επελέγησαν να αποτελέσουν πειραματικό υλικό της παρούσας διατριβής εμφανίζονται στην πλειονότητά τους να βρίσκονται σε ισορροπία Hardy-Weinberg και για τα τέσσερα ένζυμα, με ορισμένες εξαιρέσεις. Επίσης, εφαρμόστηκαν οι διορθώσεις Williams (Sokal and Rohlf, 2009) και Bonferroni (Bonferroni 1935, 1936) για τον πληθυσμό Κορινθίας (ADH), η διόρθωση Bonferroni για τον πληθυσμό Ισραήλ (ένζυμο 6-PGD) και οι συνενώσεις κατηγοριών λόγω μικρού μεγέθους αναμενόμενων (κάτω του 5) και η διόρθωση Bonferroni για τους πληθυσμούς Χανίων (PGM), Κυπαρισσίας (6-PGD) και Πάτρας (6-PGD) που αποδεικνύουν ότι οι προαναφερόμενοι πληθυσμοί ακολουθούν την ισορροπία Hardy-Weinberg.

Για το ένζυμο της ADH, απόκλιση από την ισορροπία H-W εμφανίζει ο πληθυσμός των Χανίων Κρήτης (Πίνακας 40). Δεδομένου, ότι εμφανίζεται τεράστια περίσσεια ομοζυγωτών των κατηγοριών 11 και 33 και έλλειμμα ετεροζυγωτών 13 για τον εν λόγω πληθυσμό και για το ένζυμο ADH και για το ένζυμο 6-PGD (Πίνακας 42), πιθανολογείται ότι λαμβάνει χώρα το φαινόμενο Wahlund. Με βάση το φαινόμενο αυτό, ένας πληθυσμός, στην προκειμένη περίπτωση ο πληθυσμός Χανίων, ενδεχομένως αποτελείται από υποπληθυσμούς, σε καθένα εκ των οποίων ισχύει η ισορροπία H-W, μα εάν θεωρηθούν όλοι ως δείγματα του ίδιου πληθυσμού, δεν ισχύει η ισορροπία H-W. Σχετικά με τον πληθυσμό Χανίων, έγινε συλλογή των εντόμων από ελιές προερχόμενες από τουλάχιστον τρεις διαφορετικούς ελαιώνες, ως εκ τούτου, το δείγμα αυτό χαρακτηρίζεται ετερογενές σε σχέση με τα υπόλοιπα.

Σχετικά με το ένζυμο της 6-PGD, οι πληθυσμοί των Χανίων και Αμοργού, δεν εμφανίζονται να ακολουθούν τον νόμο H-W. Η περίπτωση του πληθυσμού Αμοργού για το γονίδιο της 6-PGD είναι ιδιαίτερη, καθότι παρατηρείται έλλειψη ενός αλληλομόρφου, του αλληλομόρφου 3, ο οποίος καταγράφεται σε όλους τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στο μικρό μέγεθος του πληθυσμού από τον οποίο έγινε η δειγματοληψία, είτε στη δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης στον εν λόγω πληθυσμό. Επίσης, και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται έλλειμμα ετεροζυγωτών, όπως και στον

πληθυσμό Χανίων, άρα, μπορεί να δρα το φαινόμενο Wahlund.

Ως προς το γονίδιο της PGM, ο πληθυσμός της Κυπαρισσίας δεν υπόκειται στον νόμο H-W, εμφανίζοντας έλλειμμα ετεροζυγωτών, γεγονός που μπορεί να οφείλεται στο μικρό αριθμό του δείγματος προς ανάλυση.

Όσον αφορά στο γονίδιο του α-GPDH, όλοι οι πληθυσμοί, ανεξαιρέτως, ακολουθούν το νόμο H-W.

Συνεπώς καταγράφονται συχνότητες παμμιξίας και για τα τέσσερα γονίδια, στην πλειονότητα των πληθυσμών προς μελέτη. Παράλληλα, και τα τέσσερα γονίδια ακολουθούν ένα σταθερό γενετικό πρότυπο. Συγκεκριμένα, σε κάθε γονίδιο ένας αλληλόμορφος εμφανίζεται να βρίσκεται σε μεγαλύτερη συχνότητα και η κατάταξη των αλληλομόρφων ως προς τις συχνότητές τους παραμένει σταθερή. Η παρατήρηση αυτή ενισχύει την υπόθεση της δράσης επιλεκτικών πιέσεων στους φυσικούς πληθυσμούς του δάκου της ελιάς, παρά την καταγραφή συχνοτήτων παμμιξίας. Δηλαδή, οι συχνότητες παμμιξίας δε σημαίνουν υποχρεωτικά και απουσία της φυσικής επιλογής (Λουκάς, 2003).

Ποικιλομορφία των ενζύμων προς μελέτη

Ο δάκος της ελιάς αποτελεί ένα είδος αποκλειστικά μονοφάγο. Με βάση κάποιους συγγραφείς (Powell 1941, Levinton 1973, Gillespie and Langley, 1974, Yong 1992) θα αναμενόταν θετική συσχέτιση μεταξύ της γενετικής ποικιλομορφίας ενός είδους και του βαθμού διαφοροποίησης των βιοθέσεων (niche) στο οποίο αυτό απαντάται. Πάντως, σύγκριση των επιπέδων της γενετικής ποικιλομορφίας που παρατηρούνται στους πληθυσμούς του δάκου που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη με τα αντίστοιχα των άλλων ειδών της οικογένειας Tephritidae αποδεικνύουν ότι η γενετική ποικιλομορφία στο δάκο της ελιάς δεν ακολουθεί αυτή την υπόθεση. Επί παραδείγματι, οι τιμές της ετεροζυγωτίας, του πολυμορφισμού και των αριθμών των αλληλομόρφων για γενετικούς τόπους στη μύγα της μεσογείου, *Ceratitis Capitata*, που είναι ένα εξαιρετικά πολυφάγο είδος, είναι πολύ μικρότερες, εν γένει, σε σχέση με τις αντίστοιχες τιμές για το δάκο της ελιάς (Huettel et al. 1980, Morgante et al. 1981, Gasperi et al. 1986, 1991, Loukas 1989, Milani et al. 1989, Malacrida et al. 1992, Reyes and Orchano 1994).

Συνεπώς το ερώτημα που τίθεται είναι κατά πόσον αυτές οι υψηλές

τιμές είναι χαρακτηριστικές του είδους ή, εν αντιθέσει, εάν οι μελετηθέντες πληθυσμοί αποτελούν μία εξαιρετική περίπτωση. Δυστυχώς, δεν υπάρχουν διαθέσιμες πολλές πληροφορίες σχετικά με τη γενετική ποικιλομορφία των φυσικών πληθυσμών του δάκου. Με βάση όσες έχουν μέχρι στιγμής διεξαχθεί στον τομέα της Γενετικής Πληθυσμών του δάκου (Tsakas and Krumbas 1975, Bush and Kitto 1979, Tsakas and Zouros 1980, Loukas et al. 1985, Orchando and Reyes 1994), εξάγεται το συμπέρασμα ότι το υψηλό επίπεδο πολυμορφισμού που παρατηρείται αποτελεί χαρακτηριστικό του είδους.

Με βάση τα αποτελέσματα, διαπιστώνεται και για τα τέσσερα γονίδια των ενζύμων που μελετήθηκαν ότι ένα μοντέλο τυχαίας γενετικής παρέκκλισης δεν είναι συμβατό και επαρκές για την επεξήγησή τους. Αυτό ισχύει, δεδομένου ότι ο ίδιος αλληλόμορφος είναι σε υψηλή συχνότητα και δεν αλλάζει η κατάταξη των αλληλομόρφων εκάστοτε γονιδίου όσον αφορά στη σχετική τους συχνότητα στον πληθυσμό, αλλά διαφοροποιούνται μόνο οι συχνότητές τους, κυμαινόμενες εντός ενός ορισμένου σχετικά μικρού εύρους.

Ουσιαστικά, η τυχαία αλλαγή στις συχνότητες των γονιδίων, εξαιτίας της τυχαίας δειγματοληψίας ενός περιορισμένου αριθμού γαμετών, αποτελεί το φαινόμενο της "**τυχαίας γενετικής παρέκκλισης**" (Wright 1955). Η διαδικασία αλλαγής των συχνοτήτων των γονιδίων δεν είναι συστηματική, αφού δεν μπορεί να προβλεφθεί ως προς την κατεύθυνση (παρά μόνο ως προς την ποσότητα της αλλαγής), αλλά τυχαία ή στοχαστική (Λουκάς, 2003).

Στην πραγματικότητα, λίγοι φυσικοί πληθυσμοί διατηρούν μέγεθος τόσο μεγάλο όσο απαιτεί η εφαρμογή του νόμου των Hardy-Weinberg. Φραγμοί γεωγραφικοί, οικολογικοί, συμπεριφοράς, κ.ά., διαχωρίζουν τους πληθυσμούς και συμβάλλουν στη δημιουργία μικρών πληθυσμιακών μονάδων. Στους μικρούς αυτούς πληθυσμούς οι συχνότητες αλλάζουν τυχαία ώστε να παρατηρείται όλο το φάσμα των συχνοτήτων των αλληλομόρφων ενός γονιδίου. Συνεπώς, με δεδομένο το μικρό μέγεθος των πληθυσμών στη φύση, γίνεται αντιληπτό ότι το δραστικό μέγεθος (N_e) καθορίζεται από το μικρότερο πληθυσμιακό μέγεθος με βάση τη σχέση (1) και τα κάτωθι: $N_e = t/[\sum(1/N_i)]$ (σχέση 1).

Αν το μέγεθος του πληθυσμού ακολουθεί μία γεωμετρική αύξηση, σε έναν κύκλο έξι γενεών, 10 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 και μετά επανέρχεται στο 10 και ο κύκλος επαναλαμβάνεται, τότε όπως προκύπτει

από την σχέση (1), $N_e=54$. Ο αριθμός αυτός είναι πολύ πιο κοντά στο μικρότερο μέγεθος του πληθυσμού παρά στο μεγαλύτερο. Έτσι, οι γενεές με τους μικρότερους αριθμούς ατόμων έχουν τη μεγαλύτερη επίδραση στο δραστικό μέγεθος του πληθυσμού (Λουκάς, 2003).

Όσον αφορά στο δάκο, λαμβάνοντας υπόψη τη φυσιολογία του, δηλαδή το βιολογικό του κύκλο, σε συνδυασμό με την εφαρμοζόμενη εντατική καταπολέμησή του με τα σύγχρονα χημικά μέσα, επεξηγείται η δραστική μείωση του μεγέθους των φυσικών του πληθυσμών κατά την περίοδο των ψεκασμών. Ένδειξη του μικρού πληθυσμιακού μεγέθους του δάκου στη φύση αποτελεί και η καταγραφή της παρουσίας ανθεκτικών ατόμων στα εφαρμοζόμενα εντομοκτόνα. Συγκεκριμένα, οι μεταλλαγές στο γονίδιο της ακετυλοχολινεστεράσης που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα έντομα έναντι των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων εμφανίζονται με μεγάλη συχνότητα στους φυσικούς πληθυσμούς (αδημοσίευτα δεδομένα, προσωπική επικοινωνία με κ.Κοσμίδη). Σε συμφωνία με τα παραπάνω δεδομένα, πρόσφατη μελέτη σε φυσικούς πληθυσμούς από διάφορες περιοχές της Τουρκίας κατέγραψε τη διασπορά των μεταλλαγών αυτών (Başkurt et al., 2011).

Άρα, συνέπεια αυτής της εντονότατης δράσης των εντομοκτόνων αποτελεί η ύπαρξη πληθυσμών στη φύση με υψηλή συχνότητα των μεταλλαγών ανθεκτικότητας και με μειωμένο πληθυσμιακό μέγεθος. Ενώ θα αναμενόταν έντονη δράση του φαινομένου της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης σε πληθυσμούς που μειώνεται τόσο πολύ το μέγεθός τους σε κάποιο σημείο του βιολογικού τους κύκλου, δεν ισχύει αυτή η υπόθεση. Αντίθετα, παρατηρούμε ότι οι πληθυσμοί προς μελέτη έχουν μεγάλη ομοιότητα στη γενετική τους δομή, πάντα ο ίδιος αλληλόμορφος είναι ο πιο κοινός κι οι συχνότητες των αλληλομόρφων είναι πολύ κοντά η μία στην άλλη. Καιτοι, δεν αποκλείεται η ύπαρξη γονιδιακής ροής μεταξύ των πληθυσμών (όπως παρατηρείται κι από άλλες μελέτες-Orchando and Reyes, 2000; Augoustinos et al., 2002-), το γεγονός ότι καταγράφονται πολύ κοντινές συχνότητες σε πληθυσμούς πολύ απομακρυσμένους γεωγραφικά, χωρίς να μεσολαβούν στις ενδιάμεσες περιοχές άλλοι πληθυσμοί του δάκου, συνηγορεί υπέρ της άποψης ότι οι φυσικοί πληθυσμοί υπόκεινται στη δράση ισχυρών επιλεκτικών πιέσεων. Ακόμη κι αν υφίσταται ένα ποσό γονιδιακής ροής, δεν είναι σε θέση να αναιρέσει τη δράση των επιλεκτικών δυνάμεων.

Τέλος, σχετικά με τα γονίδια που ελέγχουν την έκφραση των

ενζύμων α -GPDH και PGM συμπεραίνουμε ότι τείνουν προς τη μονιμοποίηση ενός αλληλομόρφου και στις δύο περιπτώσεις (του αλληλομόρφου 2 και του αλληλομόρφου 3, κατ' αντιστοιχία). Άρα, πρόκειται για δύο γονίδια με σταθερή γενετική σύσταση, που η επεξεργασία των δεδομένων τους συνιστά δυνητικά ένα σημαντικό εργαλείο για την εξαγωγή συμπερασμάτων για τα μονοπάτια εξέλιξης και διάδοσης του δάκου της ελιάς στην Ευρώπη. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, επικρατέστερες οδοί εισαγωγής του εντόμου στη λεκάνη της Μεσογείου αποτελούν η Κύπρος (από την Ανατολή) και η Ισπανία (από τη Δύση), καθώς οι φυσικοί πληθυσμοί του δάκου σε αυτές τις περιοχές παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση από τους υπόλοιπους πληθυσμούς και τη μεγαλύτερη γενετική ποικιλομορφία. Συγκεκριμένα, οι πληθυσμοί τόσο της Ισπανίας (Βαλένθια) όσο και της Κύπρου φέρουν σπάνιους αλληλομόρφους, όπως στην περίπτωση του γονιδίου της ADH, ο αλληλόμορφος I απαντάται στην Ισπανία και στην Κύπρο με συχνότητα 0,004. Ο ίδιος αλληλόμορφος δεν απαντάται στους υπόλοιπους πληθυσμούς προς μελέτη, με εξαίρεση τον πληθυσμό της Χαλκιδικής, όπου φέρει συχνότητα 0,008. Επίσης, για το ίδιο ένζυμο παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη διαφοροποίηση συγκριτικά με τους υπόλοιπους πληθυσμούς. Επιπρόσθετα, ο πληθυσμός της Κύπρου για το γονίδιο της PGM εμφανίζει μεγάλη ποικιλομορφία, καθώς καταγράφεται η ύπαρξη τεσσάρων από τους πέντε αλληλομόρφους που εντοπίστηκαν συνολικά στους φυσικούς πληθυσμούς, των αλληλομόρφων 2, 3, 4 και 5. Ο πιο σπάνιος αλληλόμορφος (αλληλόμορφος 1) εντοπίστηκε με συχνότητα 0,003 μόνο στον πληθυσμό των Χανίων Κρήτης. Σημαντική ένδειξη που ισχυροποιεί αυτή την υπόθεση εργασίας, αποτελεί η μεγάλη διαφοροποίηση του πληθυσμού της Ισπανίας ως προς το γονίδιο του α -GPDH. Όπως προαναφέρθηκε, σε σύνολο 16 πληθυσμών μόνο το δείγμα της Ισπανίας από την περιοχή της Βαλένθια φέρει τον σπάνιο αλληλόμορφο 1 σε συχνότητα 0,159 και τον αλληλόμορφο 2 σε συχνότητα 0,841, ενώ στους υπόλοιπους πληθυσμούς ο αλληλόμορφος 2 τείνει προς τη μονιμοποίηση με τη συχνότητά του να κυμαίνεται από 0,981 έως και 1.

Ειδικότερα, αναφορικά με τα γονίδια των ενζύμων ADH και 6-PGD, γίνεται αντιληπτή η επίδραση επιλεκτικών πιέσεων στους φυσικούς πληθυσμούς του δάκου. Δεδομένου του γεγονότος ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων και των δύο γονιδίων είναι συχνότητες

παμμειξίας, συμπεραίνουμε ότι ο μηχανισμός της επιλογής πιθανότατα δρα στο στάδιο του ακμαίου, πριν την έναρξη των διασταυρώσεων. Κατ' αυτό τον τρόπο, η επιλογή αλλάζει τις συχνότητες των γονοτύπων της γενεάς στην οποία δρα και, κατά συνέπεια, διαμορφώνει τις συχνότητες των αλληλομόρφων της αμέσως επόμενης γενεάς. Από το σημείο αυτό και στη συνέχεια του βιολογικού κύκλου του εντόμου, οι διασταυρώσεις γίνονται με τυχαίο τρόπο, ως εκ τούτου, οι συχνότητες των αλληλομόρφων παραμένουν σταθερές από γενεά σε γενεά έως ότου δράσει ξανά η επιλογή στο ίδιο στάδιο (ακμαίο πρώτων ημερών, πριν τις διασταυρώσεις). Μάλιστα, εξαιτίας της διατήρησης και των τριών αλληλομόρφων (F, I και S) στη γενετική δεξαμενή των δύο γονιδίων θεωρούμε ότι δρα ο μηχανισμός του εξισορροπημένου πολυμορφισμού (balancing selection) στα γονίδια των ενζύμων ADH και 6-PGD. Άλλωστε, έχει καταγραφεί δράση επιλεκτικής πίεσης, με βάση προηγούμενες μελέτες, σε πληθυσμούς του δάκου στο εργαστήριο αλλά σε διαφορετικό στάδιο -στο στάδιο μεταξύ αυγού και προνύμφης πρώτου σταδίου-.

Το ότι τα δύο αυτά γονίδια διατηρούν τον πολυμορφισμό τους υπό τη δράση της φυσικής επιλογής αποδεικνύεται και από το γεγονός ότι οι πολυμορφισμοί τους διατηρούνται σε παρόμοιες συχνότητες, καίτοι οι πληθυσμοί του δάκου, ως γνωστόν, βρίσκονται υπό την πίεση των δυνάμεων που ασκούνται σε πληθυσμούς μικρού μεγέθους. Όντως, οι πληθυσμοί του δάκου που αποτελούν θυγατρικούς πληθυσμούς από εισαγόμενους πληθυσμούς, έχουν προέλθει από περιορισμένο αριθμό ατόμων με μειωμένη γενετική ποικιλομορφία (Αρχή του Ιδρυτή- Founder Effect) και εξακολουθούν να υφίστανται δραστική μείωση του μεγέθους τους με τη συστηματική καταπολέμηση. Στις περιπτώσεις αυτές δραστικής μείωσης του μεγέθους αναμένεται άλλοι πληθυσμοί να καταστούν μονομορφικοί ή σχεδόν μονομορφικοί για τον ένα ή για τον άλλο αλληλόμορφο, το οποίο όμως δεν παρατηρείται.

Συμπεράσματα



5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι Nardi et al. (2005), κατέδειξαν ως περιοχή προέλευσης του δάκου την Αφρική, ωστόσο δεν εντόπισαν το/τα μονοπάτι/α εξάπλωσής του στον υπόλοιπο κόσμο. Οι Augoustinos et al., (2002) κατέγραψαν μία μείωση της γενετικής ποικιλότητας από Ανατολάς προς Δυσμάς που ενδεχομένως συνοδεύει μια πιθανή πορεία εποίκισμού του δάκου. Ωστόσο δεν αποκλείεται η είσοδος του στην Ευρώπη να έλαβε χώρα από περισσότερα του ενός μονοπάτια, π.χ. μέσω Κύπρου και ταυτόχρονα μέσω της Ισπανίας, με βάση τα ευρήματα της παρούσας διατριβής. Η παρουσία σπάνιων αλληλομόρφων στους πληθυσμούς αυτούς και η διαφοροποίησή της γενετικής τους δομής σε σχέση με τους υπόλοιπους πληθυσμούς συντείνουν σε αυτή την υπόθεση.

Επίσης, τα αποτελέσματά μας είναι σύμφωνα με τα ευρήματα των Orchancho and Reyes (2000), που υποστηρίζουν ότι παρότι η γενετική ροή είναι σε υψηλά επίπεδα, πιθανότατα ο μηχανισμός της φυσικής επιλογής ευθύνεται για τον καθορισμό του προτύπου εξάπλωσης του δάκου της ελιάς. Και για τα τέσσερα ένζυμα παρατηρείται το ίδιο πρότυπο γονοτυπικής σύνθεσης, όπου πάντα ο ίδιος αλληλόμορφος εμφανίζεται σε μεγαλύτερη συχνότητα και ακολουθούν οι υπόλοιποι, με συχνότητες εντός ενός ορισμένου μικρού εύρους. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι οι συχνότητες των αλληλομόρφων των γονιδίων βρίσκονται σε ισορροπία H-W, μας οδηγεί στην διατύπωση της πρότασης ότι η φυσική επιλογή δρα στο στάδιο του ακμαίου πρώτων ημερών, πριν την έναρξη των διασταυρώσεων. Στους εργαστηριακούς πληθυσμούς, αντίθετα, έχει καταγραφεί επιλογή στο στάδιο της προνύμφης, με επιλεκτικό παράγοντα την τεχνητή εκτροφή.

Η παρατηρούμενη ομοιομορφία μεταξύ των μελετηθέντων πληθυσμών του δάκου, αναφορικά με το πρότυπο της γενετικής τους δομής και διαφοροποίησης για τα τέσσερα αυτά ένζυμα, οδηγεί και σε συμπεράσματα σχετικά με το ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων στον καθορισμό αυτής της ομοιομορφίας. Όλοι οι πληθυσμοί, παρόλο που κατά τόπους μπορεί να διαφέρουν σε ορισμένες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως υγρασία και θερμοκρασία, δεν παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση. Συνεπώς, το περιβάλλον δεν φαίνεται να έχει σημαντική επίδραση στη διαφοροποίηση μεταξύ των πληθυσμών όσο αφορά στα τέσσερα αυτά ένζυμα. Σχετικά με τους πληθυσμούς Ισπανίας και Κύπρου, εμφανίζουν τις μεγαλύτερες αποκλίσεις και αυτό μπορεί να

αποδοθεί στις διαφορετικές ποικιλίες που καλλιεργούνται και στις περιβαλλοντικές συνθήκες που επικρατούν σε αυτές τις περιοχές.

Με βάση την υπόθεση ότι η επιλογή δρα στο στάδιο του ακμαίου πρώτων ημερών, και ότι για τα γονίδια *Adh* και *6-Pgd* ισχύει το φαινόμενο του εξισορροπημένου πολυμορφισμού (balancing selection), επί του πρακτέου, μπορεί να εφαρμοστεί η μέθοδος του στείρου εντόμου σε άτομα διπλά ετεροζυγωτά (ετεροζυγωτά και για τα δύο γονίδια). Συγκεκριμένα, στο εργαστήριο μπορούν να δημιουργηθούν ομοζυγωτοί πληθυσμοί δάκου για τους αλληλομόρφους *F* και *I* για τα γονίδια *Adh* και *6-PGD*, αντίστοιχα, και ομοζυγωτοί πληθυσμοί δάκου για τους αλληλομόρφους *S* και *F* για τα γονίδια *Adh* και *6-PGD*, αντίστοιχα. Εν συνεχεία, θα δημιουργηθεί θυγατρικός πληθυσμός από τις διασταυρώσεις αρσενικών ατόμων από τον έναν πληθυσμό με θηλυκά άτομα από τον άλλο, με σκοπό τη δημιουργία εντόμων διπλά ετεροζυγωτών, γονοτύπων *FS* για το γονίδιο του ενζύμου *ADH* και *FI* για το γονίδιο του ενζύμου *6-PGD*. Η εξαπόλυση στείρων εντόμων αυτού του γονοτύπου, που εμφανίζει τη μεγαλύτερη βιωσιμότητα στη φύση, μπορεί να οδηγήσει συντομότερα στη δραστική μείωση του μεγέθους των φυσικών πληθυσμών του δάκου.

Συνεπώς, η παρούσα διατριβή θα μπορούσε να αποτελέσει εφαλτήριο για τη διεξαγωγή μιας σειράς πειραμάτων, με μεγαλύτερο αριθμό πληθυσμών και με σκοπό τη μελέτη και άλλων ενζύμων για να αποκτήσουμε πληρέστερη εικόνα της γενετικής δομής των φυσικών πληθυσμών του δάκου. Η γνώση αυτή θα συμβάλλει στην αποτελεσματικότερη και φιλικότερη προς το περιβάλλον αντιμετώπιση του εντόμου. Η εν λόγω μέθοδος θα μπορούσε να εμπλουτιστεί και με μελέτη σε νουκλεοτιδικό επίπεδο, μέσω αλληλούχισης του DNA και περαιτέρω μεθόδων, ώστε να απαντά ολοκληρωμένα στα θεμελιώδη ερωτήματα της γενετικής των πληθυσμών, που σχετίζονται με τη διατήρηση των ενζυμικών πολυμορφισμών στους πληθυσμούς του δάκου στη φύση.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akmoutsou, P., Mademtzoglou, D., Nakou, I., Onoufriadis, A., Papadopoulou, X., Kounatidis, I., Frantzios, G., Papadakis, G., Vasiliadis, K., Papadopoulos, N. T. and Mavragani-Tsipidou, P., (2011), Evaluation of toxicity and genotoxic effects of spinosad and deltamethrin in *Drosophila melanogaster* and *Bactrocera oleae*. *Pest Management Science*. doi: **10.1002/ps.2208**
- Alexandrakis, V. and Neuenschwander, P., (1979), *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **11: 171**
- Apostolaki, A., Livadaras, I., Saridaki, A., Chrysargyris, C., Savakis, C., Bourtzis, K., (2011). Transinfection of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* with *Wolbachia*: towards a symbiont-based population control strategy, *Journal of Applied Entomology*, **135(7): 546-553**
- Arambourg, Y., and Pralavorio, R., (1970). Survie Hivernale de *Dacus Oleae* Gmel. *Ann.Zool.Ecol.Anim.* **2: 659-662**
- Arambourg, Y., (1986) In: Reunion sur la protection phytosanitaire de l'olive, April 1986, Sfax, Tunisia, p. 75, Madrid, FAO
- Askew, R.R., (1971). Parasitic insects. *Heinemann Educational Books*, London, **316 p.**
- Augoustinos, A.A., Stratikopoulos, E.E., Zacharopoulou, A., Mathiopoulos, K.D., (2002). Polymorphic microsatellite markers in the olive fruit, *Bactrocera oleae*. *Molecular Ecology Notes*, **2: 278-280**
- Augustinos, A.A., Mamuris, Z., Stratikopoulos, E.E., D'Amelio, S., Zacharopoulou, A., Mathiopoulos, K.D., (2005). Microsatellite analysis of olive fly populations in the Mediterranean indicates a westward expansion of the species. *Genetica*.**125: 231–241**
- Awadallah A. M., (1986). In Reunion sur la protection phytosanitaire de l'Olivier, April 1986, Sfax, Tunisia, p. 69-72. Madrid, FAO.

- Ayala, F.J., (1982). Population and evolutionary genetics: A primer. *The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 2727 Sand Hill Road Menlo Park, California 94025.*
- Başkurt, S.I., Doğaç, E., Taşkın, V. and Taşkın, G., (2011). Frequencies of organophosphate resistance-associated mutations in the acetylcholinesterase gene of field collected olive fruit fly (*Bactrocera oleae*) populations under different insecticide regimes, *Acta Biologica Hungarica, Akademiai Kiado*, **62(1):22-33**
- Bolle, r E.F. and Prokopy, R.J., (1976). Bionomics and management of *Rhagoletis*, *Annual Review of Entomology*. **21:223-246**
- Bonferroni, C. E., (1935). Il calcolo delle assicurazioni su gruppi di teste. *In Studi in Onore del Professore Salvatore Ortu Carboni. Rome: Italy*, **13-60**
- Bonferroni, C. E., (1936). Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. *Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze*. **8:3-62**
- Broumas, T. and Haniotakis, G.E., (1994). Comparative field studies of various traps and attractants of the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, *Entomologia experimentalis et applicata*. **73(2):145-150**
- Bush, G.L. and Kitto , G.B. ,(1979). Research on the genetic structure of wild and laboratory strains of the olive fly. F.A.O. Report: Development of pest management systems for olive culture program. *Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome*
- Canale, A.,(1998). Effect of parasitoid/host ratio on superparasitism of *Ceratitis capitata* (Wiedemann) larvae (Diptera, Tephritidae) by *Opius concolor* Szepliget (Hymenoptera, Braconidae), *Frustula entomologica*. **21: 137-148**
- Canale, A. and Raspi, A.,(2000). Host location and oviposition behavior in *Opius concolor* Szepliget (Hymenoptera, Braconidae), *Entomological problems*. **31(1): 25-32**

- Capuzzo, C., Firrao, G., Mazzon, L., Squartini, A. and Girolami, V., (2005). “*Candidatus Erwinia dacicola*”, a coevolved symbiotic bacterium of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Gmelin). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55: 1641-1647**
- Charlesworth, B., (1998). Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability, *Mol. Biol. Evol.*, **15(5): 538-543**
- Cosmidis, N, Goulielmos, G, Eliopoulos, E. and Loukas, M., (2008). Selection at 6-PGD locus in laboratory populations of *Bactrocera oleae*. *Genetical research.* **90(5): 379-384**
- Cosmidis, N., Loukas, M., Peppas, V., Goulielmos, G., and Zouros, E., (2002). Effect of acetone feeding on alcohol dehydrogenase activity in the olive fruit fly, *Bactrocera oleae*. *Heredity.* **89(6):453-9**
- Cosmidis, N., Loukas, M., and Zouros, E., (1997). Differences in fitness components among alcohol dehydrogenase genotypes of the olive fruit fly (Diptera, Tephritidae) under artificial rearing. *Ann.Ent. Soc. Amer.* **90(3): 367-371**
- Delrio, G., Ortu, S. and Prota, R., (1979). *Redia.* **62: 229-255**
- Delrio, G., (1985). Biotechnical methods for olive pest control. In: Integrated Pest Control in Olive Groves. R.Cavalloro and A. Crovetto (Eds). *Proceedings of the CEC/FAO/IOBC International Joint Meeting, Pisa, 3-6 April 1984*, pp.394-410
- Economopoulos, A.P. and Loukas, M., (1986). ADH allele frequency changes in the olive fruit fly shift from olives to artificial larval food and vice versa, effect of temperature. *Entomologia exp. appl.* , **40: 2115-21**
- Economopoulos, A.P. (1972). Sexual competitiveness of y-ray sterilized males of *Dacus Oleae*. Mating frequency of artificial reared and wild females. *Environ. Ent.*, **1: 490-7**

- Economopoulos , A.P., and Zervas, G.A., (1982). The quality problem in olive flies produced for SIT experiments. Sterile insect technique and radiation in insect control. *IAEA-SM-255/39*, **357-368**
- Economopoulos, A.P., Avtzis, N., Zervas, G., Tsitsipis. J., Haniotakis, G., Tsiropoulou, G., Manoukas, A., (1977). Experiments on the control of the olive fly, *Dacus Oleae* (Gmel), by the combined effect of the insecticides and releases of gamma-ray sterilized insects. *Z ang.Ent.*, **83:201-15**
- Economopoulos, A.P., Giannakakis, A., Tzanakakis, M.E., and Voyatzoglou, A.V., (1971). Reproductive behavior and physiology of the olive fruit fly.I. Anatomy of the adult vectum and odor emitted by adults. *Ann. ant .Soc, Am.*, **64:1114-6**
- Economopoulos, A.P., Raptis, A., Stavropoulou-Delivoria, A., and Papadopoulos. A., (1986). Control of *Dacus Oleae* by yellow sticky traps combined with ammonium acetate slow release dispensers. *Ent.exp.appl*, **41:11-6**
- Economopoulos, A.P. Voyatzoglou, A.V., and Giannakakis, A.,(1971). Reproductive behavior and physiology of *Dacus Oleae*. Fecundity as affected by mating, adult diet and artificial rearing. *Ann.ent.Soc.Am.*, **69: 725-9**
- Estes, A. M., Nestel, D., Belcari, A., Jessup, A., Rempoulakis, P. and Economopoulos, A. P. (2011), A basis for the renewal of sterile insect technique for the olive fly, *Bactrocera oleae* (Rossi). *Journal of Applied Entomology*. doi: **10.1111/j.1439-0418.2011.01620.x**
- Fletcher, B. S., and Kapatos E., (1981). Dispersal of the olive fly, *Dacus oleae*, during the summer period on Corfu. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **29:1-8**.
- Fletcher, B.S., (1987). The Biology of Dacine Fruit Flies, *Annual Review of Entomology*. **32:115-114**

- Fytizas, E. and Tzanakakis, M.E.(1966). Development des larves de *Dacus Oleae* dans des olives lorsque leurs parents ont reçu la streptomycine, incorporée à leur nourriture. *Ann. Epiphyties*. **17: 53-9**
- Gasperi, G., Malacrida, A., Tosetti, M. and Milani, R., (1986). Enzyme variability: a tool for investigating the genome organization and the population structure of *Ceratitis Capitata*. In: *Fruit Flies of Economic Importance 84*. Ed. By CAVALLORO, R. Rotterdam: A.A. Balkema. **153-161**
- Gasperi G., Goulielmino R.C., Malacrida A.R. and Milani R., (1991). Genetic variability and gene flow in geographical populations of *Ceratitis capitata* (Wied.). *Heredity*, **67: 347-356**
- Gillespie, J. H and Langley, C.H., (1974). A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics*. **76: 837-848**
- Goulielmos, G.N., Cosmidis N., Eliopoulos E, Loukas M. and Zouros E.,(2006). Cloning and structural characterization of the 6-phosphogluconate dehydrogenase locus of the medfly *Ceratitis capitata* and the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Biochemical and biophysical research communications*. **341(3):721-7**
- Goulielmos, G.N., Eliopoulos E., Loukas M. and Tsakas, S., (2004). Functional constraints of 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) based on sequence and structural information, *J.Mol.Evol.*, **59(3): 358-71**
- Goulielmos, G.N., Cosmidis, N., Theodorakopoulou, M.E., Loukas, M., and Zouros, E., (2003), Tracing the history of an enzyme polymorphism: the case of alcohol dehydrogenase-2 (Adh-2) of the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Molecular biology and evolution*. **20(3):293-306**
- Goulielmos, G.N., Cosmidis, N., Loukas, M., Tsakas, S., and Zouros, E.,(2001). Characterization of two alcohol dehydrogenase (Adh) loci from the olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae* and implications for Adh duplication in dipteran insects. *Journal of molecular evolution*. **52(1):29-39**

- Hagen, K. S., (1966). Dependence of the olive fly, *Dacus oleae*, larvae on symbiosis with *Pseudomonas savastanoi* for the utilization of olive. *Nature*. **209**: 423–424
- Haniotakis, G.E., (1986). Control of *Dacus oleae* by mass-trapping: present status and prospects. *Bull. OEPP*. **16**: 395-425
- Haniotakis, G.E. and Voyadjoglou A., (1978). Oviposition regulation in *Dacus oleae* by various olive fruit characters, *Entomologia Experimentalis et Applicata*. **24(3)**: 387-392
- Haniotakis, G.E., (2003). Olive pest control: present status and prospects. In: *Proceedings of the IOBC/WPRS Conference. Integrated Protections of Olive Crops, Chania, Crete*
- Hirose M., Sugimoto E., Sasaki R. and Chiba H., (1970). Crystallization and reaction mechanism of yeast phosphoglucomutase. *J.Biochem*. **68**: 449- 457
- Hoelmer, K.A., Kirk, A.A., Pickett, C.H., Daane, K.M and Johnson, M.W., (2011), Prospects for improving biological control of olive fruit fly, *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae), with introduced parasitoids (Hymenoptera), *Biological Science and Technology*. **21(9)**: 1005-1025
- Howard, D. J., Bush, G. L. and Breznak, J. A., (1985). The evolutionary significance of bacteria associated with *Rhagoletis*. *Evolution*. **39**, 405-17
- Hsu, J. C., H. T. Feng, and W. J. Wu., (2004). Resistance and synergistic effects of insecticides in *Bactrocera dorsalis* (Diptera: Tephritidae) in Taiwan. *J. Econ. Entomol*. **97**: 1682–1688. BioOne, PubMed
- Huettel, M.D., Fuerst, P.A., Maruyama, T. and Chakraborty, R., (1980). Genetic effect of multiple population bottlenecks in the Mediterranean fruit fly *Ceratitis Capitata*, *Genetics*. **94**:47
- Kakani, E. G., Ioannides, I. M., Margaritopoulos, J. T., Seraphides, N. A., Skouras, J. A., Mathiopoulus, K. D. (2008) A small deletion in the olive fly acetylcholinesterase gene associated with high levels of

organophosphate resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **38**, 781–787

Kakani, E., Zygouridis, N., Tsoumani, K., Seraphides, N., Zalom F. and Mathiopoulos K., (2010). Spinosad resistance development in wild olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae) populations in California, *Pest Manag. Sci.*:**2014256**

Kapatos, E. and Fletcher, B.S., (1983). Seasonal changes in the efficiency of McPhail traps and a model of estimating olive fly densities from trap catches using temperature data. *Entomologia Experimentalis et Applicata.* **33**: 20-26

Kitto, G.B. and Briggs, M.H., (1962). Relationship between locomotory habits and enzyme concentration in insects, *Science.***135**:9-18

Knipling, E. F., (1979). The basic principles of insect suppression and management. *U.S. Dep. Agric. Handbook 512. U.S. Government Printing Office. Washington, DC*

Koç, F., (2002). Rearing and releasing of *Opius concolor* in organic olive orchards. [Elevage et lâcher d'*Opius concolor* dans les oliveraies biologiques].*Thesis, IAMB Mediterranean Agronomic Institute of Bari, Organic Farming. Tesi Master of Science, 280*

Kounatidis, I., Crotti, E., Sapountzis, P., Sacchi, L., Rizzi, A., Chouaia, B., Bandi, C., Alma, A., Daffonchio, D., Mavragani-Tsipidou, P. and Bourtzis, K., *Acetobacter tropicalis* is a major symbiont in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Appl Environ Microbiol.*, **75**:**3281-3288**

Krimbas, C.B., (1963). A contribution to the cytogenetics of *Dacus oleae* (Gmel) (Diptera: Tephritidae): the salivary gland and mitotic chromosomes. *Caryologia.* **16**: 371-376

Larson, A., Wake, D. and Yanev, K.P., (1984). Measuring Gene Flow among Populations Having High Levels of Genetic Fragmentation. *Genetics.* **106**(2): 293-308

Levinton, R. C., (1973). Genetic variations in a gradient of environmental variability: marine *Bivalvia* (Mollusca). *Science.* **180**: 75-76

- Loukas, M., Economopoulos, A.P., Zouros, E., and Vergini, Y., (1985). Genetic changes in artificially reared colonies of the olive fruit fly (Diptera, Tephritidae). *Ann.Ent.Soc.Am.*, **78:159-165**
- Loukas, M., (1989). Population genetic studies of fruit flies of economic importance, especially medfly and olive fruit fly, using electrophoretic methods. In: *Electrophoretic Studies on Agricultural Pests*, Ed. By LOXDALE, H. D.; DEN HOLLANDER, J. Systematic Association Oxford. *Clarendon Press*. **39: 69-102**
- Malacrida, A., Guglielmino, C., Gasperi, G., Baruffi, L. and Milani, R., (1992). Spatial and temporal differentiation in colonizing populations of *Ceratitis Capitata*. *Heredity*. **69:101-111**
- Manousis, T. and Moore N., (1987). Cricket Paralysis Virus, a Potential Control Agent for the Olive Fruit Fly, *Dacus oleae* Gmel., *Applied and Environmental Microbiology*. **53(1):142-148**
- Margaritopoulos, J.T., Skavdis, G., Kalogiannis, N., Nikou, D., Morou, E., Skouras, P., Tsitsipis, J.A, Vontas, J., (2008). Efficacy of the pyrethroid alpha-cypermethrin against *Bactrocera oleae* populations from Greece and improved diagnostic for an iAChE mutation, *Pest Management Science*. **64(9): 900-908**
- Mavragani-Tsipidou, P., Karamanlidou, G., Zacharopoulou, A., Koliais, S. and Kastritsis, C.D., (1992), Mitotic and polytene chromosome analysis in *Dacus oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genome*. **35: 373-378**
- Mavragani-Tsipidou, P., (2002), Genetic and cytogenetic analysis of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* (Diptera: Tephritidae). *Genetica*. **116: 45-57**
- Mazi. V, Cosmidis, N., Loukas, M., Clonis, Y., and Zouros, E. (1998) ,Biochemical differences between products of the ADH locus in olive fruit fly (*Bactrocera oleae*). *Biochemical genetics*. **36(7-8):259-69**
- Mazi, V.E., Cosmidis, N., Clonis, Y.D., and Loukas, M.,(1998) Purification of alcohol dehydrogenase from four genotypes of the

olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*, *Biotechnology progress*.
14(2):294-9

Mazomenos, B.E., Pantazi-Mazomenou, A. and Stefanou, D., (2002).

Attract and kill of the olive fruit fly *Bactrocera oleae* in Greece as a part of an integrated control system, *IOBC wprs Bulletin Vol.25*

Milani, R., Gasperi, G. and Malacrida, A., (1989). Biochemical genetics.

In: *Fruit Flies: Their Biology, Natural Enemies and Control*. Ed. By Robinson, A.S., Hooper, G. Amsterdam: Elsevier Sc. Publications, **3B: 33-56**

Miller, S., Percy, R.W. and Berger, E., (1975). Polymorphism at the a-

glycerophosphate dehydrogenase locus in *Drosophila melanogaster*. I. Properties of adult allozymes. *Bioch. Genet.* **13: 175-188**

Montiel Bueno, A., (1986). The use of sex pheromone for monitoring and

control of olive fruit fly. *Fruit flies Proceedings of the Second International Symposium 16-21 September 1986, Colymbari, Crete, Greece*

Montiel-Bueno, A. and Jones, O., (2002). Alternative methods for

controlling the olive fly, *Bactrocera oleae*, involving semiochemicals. *IOBC Wprs Bull.* **25: 1-11**

Morgante, J.S., De Souza, H.M.L., De Conti, E. and Cytrynowick, M.,

(1981). Allozymic variability in an introduced fruit fly pest *Ceratitis Capitata* (Wiedeman), 1824, (Diptera-Tephritidae). *Rev. Brasil. Gen.* **2: 183-191**

Michelakis, S.E., (1989). The olive fruit fly (*Dacus oleae* gmel.) in Crete,

Greece, *ISHS Acta Horticultutsr 286, International Symposium on Olive Growing*

Nardi, F., Capelli, A., Romano, D., Roderick, G. and Frati F., (2005).

Population structure and colonization history of the olive fly, *Bactrocera oleae* (Diptera, Tephritidae). *Mol. Ecol.* **14: 2729-2738**

Nardi, F., Capelli, A., Romano, D., Vontas, J., Roderick, G. and Frati F.,

(2006). Geographical distribution and evolutionary history of

- organophosphate-resistant Ace alleles in the olive fly (*Bactrocera oleae*). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. **36**: 593-602
- Navrozidis, E.I., Vasara, E., Karamanlidou, G., Salpiggidis, G.K., and Koliais, S.I. (2000). Biological Control of *Bactrocera oleae* (Diptera : Tephritidae) Using a Greek *Bacillus thuringiensis* Isolate. *Journal of Economic Entomology*. **93(6)**: 1657-1661
- Neuenschwander, P., Bigler, F., Delucchi, V. and Michelakis, S., (1983). Natural enemies of preimaginal stages of *Dacus oleae* Gmel. (Dipt., Tephritidae) in Western Crete. I. Bionomics and phenologies, *Boll. Lab. Ent. Agr.*, «F. Silvestri». **40**:3-32
- O'Brien, S.J. and Macintyre, R.J.,(1972). The -glycerophosphate in *Drosophila melanogaster*. II. Genetic aspects. *Genetics*. **71(1)**:127–138
- Orchando, M.D. and Reyes, A., (2000). Genetic population structure in olive fly *Bactrocera oleae* (Gmelin): gene flow and patterns of geographic differentiation. *J. Appl. Ent.* **124**:177-183
- Papp, J., (2011). Revision of the SERRAULAX quicke species described by Scepligeti in the years 1905-1914 with description of new species (Hymenoptera: Braconidae: Braconinae), *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*. **57 (1)**: 43-73
- Petri, L.,(1909)., Ricerche sopra I batteri intestinali della mosca olearia, Mem.R.Staz.Patol.agr.Roma
- Petri, I., (1910). Untersuchung uber die Daembakterium der Oliven Fliege. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg.* **26**:357-67
- Powell, J.P., (1971). Genetic polymorphisms in varied environments. *Science*. **174**: 1035-1036
- Prokopy, R.J., Economopoulos, A.P. and McFadden, M.W., (1975). Attraction of wild and laboratory – cultured *Dacus oleae* flies to small rectangles of different hues, shades and tints. *Entomol. Exper. Appl.* **18**: 141-152

- Prophetou-Athanasiadou, D.A., Tzanakakis, M.E., Myrouannis, D., and Sakas, G.,(1991). Deterrence of oviposition in *Dacus oleae* by copper hydroxide . *Entomologia Experimentalis et Applicata, Springer*. **21:1-5**
- Prota, R., (1979). *IOBC/WPRS Bulletin*. **2/1: 5-15**
- Ratner, S. S. and Stoffolano, G., (1982). Development of the oesophageal bulb of the apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Diptera : Tephritidae); morphological, histological, and histochemical study. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **75:(5)55-62**
- Ratner, S. S., and Stoffolano, J. G.,(1984). Ultrastructural changes of the oesophageal bulb of the adult female apple maggot, *Rhagoletis pomonella* (Walsh) (Diptera : Tephritidae). *Int. J. Insect Morphol. Embryol.* **13: 191-208**
- Ray JR. W.J. and Roscelli G.A., (1970). A kinetic study of the phosphoglucomutase pathway. *J.Biol. Chem.* **239: 1228- 1236**
- Rempoulakis, P. and Nestel, D. ,(2011). Dispersal ability of marked, irradiated olive fruit flies [*Bactrocera oleae* (Rossi) (Diptera: Tephritidae)] in arid regions. *Journal of Applied Entomology*. **doi: 10.1111/j.1439-0418.2011.01623.x**
- Reyes, A. and Orchando, M.D., (1994). A study of gene-enzyme variability in three Spanish populations of *Ceratitis Capitata*. *IOBC/Wprs Bull.* **17: 151-160**
- Rice, R.E., (1999). Olive fruit fly, *Bactrocera (Dacus) oleae*. *UC Plant Protection. Quarterly*, **92**
- Rice, R.E., (2000). Bionomics of the olive fruit fly *Bactrocera (Dacus) oleae*. In: Olive Notes. Tulare County, *University of California cooperative extension*, **1-5**
- Rice, R.E., Phillips, P.A., Stewart-Leslie, J. and Sibbett, G.S., (2003). Olive fruit fly populations measured in central and southern California. *California Agriculture*. **57:122-127**

- Savio, C., Mazzon, L., Martinez-Sanudo, I., Simonato, M., Squartini, A. and Girolami V., (2011). Evidence of two lineages of the symbiont “*Candidatus Erwinia dacicola*” in Italian populations of *Bactrocera oleae* (Rossi) based on 16S rRNA gene sequence, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **21378134**
- Skouras, P.J., Margaritopoulos, J.T, Seraphides, N.A, Ioannides, I.M., Kakani, E.G., Mathiopoulos, K.D. and Tsitsipis, J.A., (2007). Organophosphate resistance in olive fruit fly, *Bactrocera oleae*, populations in Greece and Cyprus. *Pest Manag. Sci.* **63: 42-48**
- Sokal, R. and Rohlf, F., (2009). Introduction to Biostatistics. *Dover edition (2nd edition)*. **159-160**
- Stavraki, H., (1970). *Entomophaga*. **15: 225-231**
- Szepligeti, G.Y., (1911). Braconidae der I. Zentral-Afrika-Expedition. Pp. 393–418. In: Wissenschaftliche Ergebnisse der deutschen Zentral-Afrika-Expedition 1907–1908 unter Führung Adolf Friedrichs, Herzog zu Mecklenburg, *Band III Zoologie*. Verlag Klinkhardt & Biermann, Leipzig
- Taylor, J.M., (2000). The olive in California: History of an immigrant Tree , *Ten Speed Press*, Berkeley
- Tsakas, S. and Krimbas, C.B., (1975). How many genes are selected in populations of *Dacus Oleae*? *Genetics*. **79: 675-679**
- Tsakas, S. and Zouros, E., (1980). Genetic differences among natural and laboratory-reared populations of the olive fruit fly *Dacus oleae* (Diptera, Tephritidae). *Ent. exp.appl.*, **268-276**
- Tsolakis, H., Ragusa, E. and Tarantino P., (2011). Control of *Bactrocera oleae* by low environmental impact methods: NPC methodology to evaluate the efficacy of lure-and-kill method and copper hydroxide treatments, *Bulletin of Insectology*. **64(1): 1-8**
- Tzanakakis, M.E., Prophetou, D.A., Savopoulou, M.C. and Kordelas, A.G., (1975). *Entomol. Exp. Appl.*, **18: 302-312**

- Tzanakakis, M.E and Koveos, D., (1986). Inhibition of ovarian maturation in the olive fruit fly *Dacus oleae* (Diptera, Tephritidae), under long photophase and an increase of temperature. *Annals of Entomological Society of America*, **79**: 15-18
- Tzanakakis, M. E., (2006). Insects and mites feeding on olive. *Brill Academic Publishers*, Boston, MA.
- Vontas, J.G., Cosmidis, N., Loukas, M., Tsakas, S., Hejazi, M.J., Ayountanti, A. and Hemingway, J., (2001). Altered acetylcholinesterase confers organophosphate resistance in *Bactrocera oleae*. *Pestic biochemical physiology*.**71**: 124-132
- Vontas, J.G., Hejazi, M.J., Hawkes, N.J., Cosmidis, N., Loukas, M. and Hemingway, J. (2002). Resistance-associated point mutations of organophosphate insensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. *Insect Molecular Biology*.**11**: 329-336
- Vontas, J., Hernández-Crespo, P., Margaritopoulos, J.T., Ortego, F., Feng H.T., Mathiopoulos, K.D. and Hsu, J.C., (2011). Insecticide resistance in Tephritid flies, *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **100(3)**: 199-205
- Wahlund, S., (1928). Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas*.**11**:65–106
- Wright, S., (1951). The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.* **15**: 323-354
- Wright, S., (1984). Evolution and the genetics of populations. Chicago: *University of Chicago Press*
- Yamvrias, C., Panagopoulos, C.G., and Psallidas, P.G., (1970). Preliminary study of the internal bacterial flora of the olive fruit fly (*Dacus oleae*, Gmelin). *Ann.Inst.Phytopath.Benaki*, **N.S.9**, 201-6.
- Yokoyama, V. Y., P. Rendon, and Sivinski J., (2008) . *Psytallia* cf.*concolor* (Hymenoptera: Braconidae) for biological control of olive fruit fly (Diptera: Tephritidae) in California, *Environ. Entomol.* **37(3)**: 764-773

- Yokoyama, V., Rendon P., Wang, X.G., Opp, S.B., Johnson, M.W. and Daane K.M., (2011), Response of *Psytallia humilis* (Hymenoptera: Braconidae) to Olive Fruit Fly (Diptera: Tephritidae) and Conditions in California Olive Orchards, *Environ. Entomol.* **40(2)** : **315-323**
- Yong, H.S., (1992). Allozyme variation in the melon fly *Dacus curcubitae* from Peninsular Malaysia. *Comp. Bioch. Phys.* **102B**: **367-370**
- Zacharopoulou, A., (1990) . Polytene chromosome maps in the med.fly *Ceratitis Capitata*, *Genome.* **33** : **184-197**
- Zambetaki, A., Kleanthous, K. and Mavragani-Tsipidou, P., (1995). Cytogenetic analysis of Malpighian tubule and salivary gland polytene chromosomes of *Bactrocera oleae* (*Dacus oleae*) (Diptera: Tephritidae). *Genome.* **38**: **1070-1081**
- Zouros, E., Van Delden ,W., Odense, R., and Van Dijk, H., (1982). *Biochem. Genet.* **20**: **929-942**
- Zygouridis, N.E, Augoustinos, A.A., Zalom, F.G. and Mathiopoulos K.D., (2009). Analysis of olive fly invasion in California based on microsatellite markers, *Heredity.* **102**: **402-412**
- Αυγουστίνος, Α., (2005). Απομόνωση μικροδορυφόρων από το δάκο της ελιάς, *Bactrocera oleae* και χρησιμοποίησή τους για την ανάλυση φυσικών πληθυσμών του είδους, *Διδακτορική διατριβή, Πάτρα 2005.*
- Γιαμβριάς, Χ., (1998). Γεωργική Εντομολογία: Εντομολογικοί Εχθροί Ελιάς. *Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα, 126 σελ.*
- Ζιώγας, Ν.Β., (1996). «Ο Δάκος της ελιάς». **Σελ.25-26, 44-45, 48-52, 89-97**
- Κοσμίδης, Ν., (1995). Μελέτη του γονιδίου της αλκοολικής αφυδρογονάσης στο δάκο της ελιάς. *Διδακτορική διατριβή. Αθήνα 1995.*

- Κουκούλη, Ε., (2001). Μελέτη του γονιδίου της αφυδρογονάσης του 6-φωσφογλυκονικού (6-PGD) στον δάκο της ελιάς. *Μεταπτυχιακή μελέτη. Αθήνα 2001.*
- Λουκάς, Μ., (2003). Γενετική Πληθυσμών Α', *Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα*
- Μανίκας, Γ.(1974). Συμβολή εις την μελέτη της βιολογίας και οικολογίας του *Dacus Oleae* Gmel. (Diptera, Tephritidae). *Διδακτορική διατριβή, Ανώτατη Γεωπονική Σχολή Αθηνών*
- Μπρούμας, Θ., (1994). Ο δάκος της ελιάς. *Γεωργία-Κτηνοτροφία (8): 26-31*
- Μπρούμας Θ., (2000). Οι ελκυστικές φερομόνες των εντόμων και η χρησιμοποίησή τους για καταπολέμηση επιβλαβών ειδών. *Σημειώσεις Μαθημάτων Μετεκπαίδευσης Γεωπόνων, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, σελ. 15-19*
- Μπρούμας, Θ.,(2002). «Ολοκληρωμένη αντιμετώπιση των Εχθρών της Ελιάς» *Γεωργία και Κτηνοτροφία. 3: 99-107*
- Πελεκάσης, Κ.Δ., (1980). Μαθήματα Γεωργικής Εντομολογίας, Β' Τόμος, Ειδική Εντομολογία
- Τζανακάκης, Μ., (1980). Μαθήματα Εφαρμοσμένης Εντομολογίας. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη. Γενικό Μέρος, **364 σελ.**
- Τζανακάκης, Μ. και Κατσόγιαννος Β., (2003). Έντομα Καρποφόρων Δέντρων και Αμπέλου. *Αγρότυπος Α.Ε., Θεσσαλονίκη, σελ.360*

7. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στο εν λόγω παράρτημα, παρατίθενται οι αμινοξικές και νουκλεοτιδικές ακολουθίες του mRNA των αλληλομόρφων S, I και F του γονιδίου Adh2, το οποίο μελετάται στην παρούσα διατριβή καθώς και η αμινοξική και νουκλεοτιδική ακολουθία του mRNA του γονιδίου της 6-PGD.

Bactrocera oleae mRNA for alcohol dehydrogenase-2S (adh-2s gene)

MGLSGKNVVFVGGGLGFYGEACKQIMTKNVASFFVFDVLENAEIKALQAINPKTKVYYTKFDITNKASI
KSAFADVIAKVQYIDVLVNGAGILTDPNVELTMNINLIGLINTTLEAIPMDKNKNGRGGLIVNIASVL
GLEPAPPAAIYCASKFGVMGFSRSISDPYYYNLTGIAVATFCPGLTETPLKNNIATKYTFEYSKVIKDK
LNNTKTQKPEACGAHLAQVLDTAENGGIYISNQGTLSKVTPTVYWQPTFN

ORIGIN

```

1   atggggtttga gcgggcaaaaa tgtcgttttc gttggcggtt tgggcttcat cgtttacgag
61  gcctgcaaac agattatgac caagaatgtg gcgtccttct tcgtgttcga cgttttggaa
121 aatgccgaga atattaaggc tcttcaggcc atcaatccca agaccaaagt ctattacacc
181 aaattcgaca tcaccaacaa ggcgagcatt aagtcggcat tcgccgatgt tatcgccaag
241 gtgcaataca tcgatgtact cgtcaatggt gccggcatac tcaccgatcc caatgtagag
301 ttaaccatga acatcaatth gattgggtcct atcaatacca cgctagaggc aattccactc
361 atggacaaga ataagaacgg acgcggtggc ctgattgtca acattgcttc cgtggtgggt
421 ttggagcccg caccacccgc cgccatctac tgcgcatcga aattcgggtg tatgggcttc
481 tcgcatcaa tttccgatcc ctattattac aaccttaccg gtattgcggt agccacattt
541 tgtcccgggt tgacagaaac gccgttgaag aacaatattg cactaaata caccttcgaa
601 tattcgaagg tgattggtga taaactcaac aacaccaaga cgcagaaacc cgaagcttgt
661 ggcgctcatt tggctcaggt gctcgataca gccgagaatg gtggcatcta tattagcaac
721 caaggcactt tgtccaaggt cacaccgacc gtctactggc aaccacatt caactag
//

```

Bactrocera oleae mRNA for alcohol dehydrogenase-2I (adh-2i gene)

MGLSGKNVVFVGGGLGFYGEACKQIMTKNVASFFVFDVLENAENIKALQAINPKTKVYYTKFDITNKAS
IKSAFADVIAKVQYIDVLVNGAGILTDPNVELTMNINLIGLINTTLEAIPMDKNKNGRGGLIVNIASV
LGLEPAPPAAIYCASKFGVMGFSRSISDPYYYNLTGIAVATFCPGLTETPLKNNIATKYTFEYSKVIKDK
KLNNTKTQKPEACGAHLAQVLDTAENGGIYISNQGTLSKVTPTVYWQPTFN

ORIGIN

```

1   atgggtttga gcggcacaaa tgctgttttc gttggcggtt tgggcttcat cggttacgag
61  gcctgcaaac agattatgac caagaatgtg gcgtccttct tcgtgttcga cgttttggaa
121 aatgccgaga atattaaggc tcttcaggcc atcaatccca agaccaaagt ctattacacc
181 aaattcgaca tcaccaacaa ggcgagcatt aagtcggcat tcgccgatgt tatcgccaag
241 gtgcaataca tcgatgtact cgtcaatggt gccggcatac tcaccgatcc caatgtagag
301 ttaacatga  acatcaatth gattggtcct atcaatacca cgctagaggc aattccactc
361 atggacaaga ataagaacgg acgcggtggc ctgattgtca acattgcttc cgtggtgggt
421 ttggagcccg caccacccgc cgccatctac tgcgcatcga aattcgggtg tatgggcttc
481 tcgcatcaa  tttccgatcc ctattattac aaccttaccg gtattgctgt agccacattt
541 tgtcccgggt tgacagaaac gccgttgaag aacaatattg ccactaaata caccttcgaa
601 tattcgaagg tgattggtga taaactcaac aacaccaaga cgcagaaacc cgaagcttgt
661 ggcgctcatt tggctcaggt gctcgataca gccgagaatg gtggcatcta tattagcaac
721 caaggcactt tgtccaaggt cacaccgacc gtctactggc aaccacatt caactag
//

```

Bactrocera oleae mRNA for alcohol dehydrogenase-2F (adh-2f gene)

```

MGLSGKNVVFVGGGLGFIGYEACKQIMTKNVASFFVFDVLENAENIKALQAINPKTKVYYTKFDITNKAS
IKSAFADVIKQYIDVLVNGAGILTDPNVELTMNINLIGLINTTLEAIPMDKNKKGRGGLIVNIASV
LGLEPAPPAAIYCASKFGVMGFSRSISDPYYNLTGIAVATFCPGLTETPLKNNIATKYTFEYSKVIDG
KLNNTKTQKPEACGAHLAQVLDTAENGGIYISNQGLSKVTPTVYWQPTFN

```

ORIGIN

```

1   atgggtttga gcggcacaaa tgctgttttc gttggcggtt tgggcttcat cggttacgag
61  gcctgcaaac agattatgac caagaatgtg gcgtccttct tcgtgttcga cgttttggaa
121 aatgccgaga atattaaggc tctacaggcc atcaatccca agaccaaagt ctactacacc
181 aaattcgaca tcaccaacaa ggcgagcatt aagtcggcat tcgccgatgt tatcgccaag
241 gtgcaataca tcgatgtact cgtcaatggt gccggcatac tcaccgatcc caatgtagag
301 ttaacatga  acatcaatth gattggtcct atcaatacca cgctagaggc aattccactc
361 atggacaaga ataagaaggg acgcggtggc ctgattgtca atattgcttc cgtggtgggt
421 ttggagcccg caccacccgc cgccatctac tgcgcatcta aattcgggtg tatgggcttc
481 tcgcttcaa  tttccgatcc ttattattac aaccttaccg gtattgctgt agccacattt
541 tgtcccgggt tgacagaaac gccgttgaag aacaatattg ctactaaata caccttcgaa
601 tattcgaagg tgattggtga taagctcaac aacaccaaga cgcagaaacc cgaagcttgt
661 ggcgctcatt tggctcaggt gctcgataca gccgagaatg gtggcatcta tattagcaac
721 caaggcactt tgtccaaggt cacaccgacc gtctactggc aaccacatt caactag
//

```

Bactrocera oleae partial mRNA for 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD gene)

MSAKADIALIGLAVMGQNLILNMNDNGFVVCAYNRTVEKVNQFLKNEAKGTKVIGATSLQDMVNKLLKP
 RKIMLLVKAGSAVDDFIQQLVPLLSPGDVIIDGGNSEYQDTARRCDELRAKKILYVSGSVSGGEEGARH
 GPSLMPGGHPEAWPLIQPIFQSICAKADKEPCCEWVGEGGAGHFVKMVHNGIEYGDMQLICEAYQIMKA
 LDLSQAEMATEFEKWNSEELDSFLIEITRDILNYQDKKGFLLEIRDTAGQKGTGKWTAAIAALQYGVVP
 TLIGEAVFSRCLSALKDERVAASKQFSGPGVSAKVADLPNFLNHKHALYCSKIVSYAQGFMLMREAAK
 ENNWNLNYYGIALMWRGGCIIRRVFLGNIKDAYTRNPQLSNLLDDFFKKAIEVQNSWRQVVANAFW
 GIPVPALSTALSFYDGYRTEKLPANLLQAQRDYFGAHTYELLGAEGKFVHTNWTGTGGNVASASTYQA

ORIGIN

1 atgtcagcta aagcggatat tgcactgata ggtttggccg ttatgggtca gaatctaatt
 61 ttgaacatga acgataatgg attcgtgggtt tgcgcctaca atcgcacggc cgagaaggtc
 121 aatcaatttc taaagaacga ggccaagggc acaaaagtga tcggcgctac atcgttgtag
 181 gatatgggtga acaaattgaa gttgccacgt aaaattatgc ttttgggtcaa ggccggttagc
 241 gctgtggacg atttcattca gcaattgggtg ccactattat cgcccgggtga tgttatcatc
 301 gatgggtggta actccgagta ccaggatacc gcacgccgtt gcgatgaatt gcgcgccaag
 361 aagatattgt atgtttggctc tgggtgtgagt ggtggcgaag aggggtgcacg tcatgggtcca
 421 tctcttatgc ctgggtgggtca tcccgaagcg tggccactta tccaacccat tttccaatca
 481 atttgcgcaa aagccgacaa ggagccatgc tgcgagtggg tcggcgaagg tgggtgctgga
 541 cattttgtca aaatggtaca taacgggtatt gagtatgggtg atatgcaatt aatttgcgaa
 601 gcgtatcaaa tcatgaaagc gcttgatctg tctcaagccg aaatggctac agagtctcag
 661 aagtgggaaca gcgaagaatt ggattcattc ctcatcgaaa tcacacgtga cattttaaat
 721 tatcaggata agaaaggttt tctgtttggag cgcatacgcg acacagctgg acagaagggg
 781 acgggggaagt ggacagccat tgctgcgctg caatacgggtg tacctgtaac gctaactcgtt
 841 gaagcgggtat tttcacggtg cctatccgcg ttgaaggatg aacgtgtggc agcaagcaaa
 901 caattcagcg gaccagggcgt atcggcaaag gttgcggatc tacccaattt cttgaatcac
 961 atcaagcatg cattgtactg ctcgaaaatc gtgtcctacg cacaaggttt catggtgatg
 1021cgtgagggcgg ccaaagagaa taactggaac ctgaattatg gtggcattgc gttgatgtgg
 1081cgtgggtgggtt gcattattcg caggggtgttc ttgggtaaca tcaaggatgc ctacaccgc
 1141aatccacaac tctcgaacct gttgtttgat gatttcttca agaaggcaat tgaagttggc
 1201caaaactcgt ggcgtcaagt cgtcgccaac gcctttctgt ggggcattcc tgtaccagct
 1261ctttcgaccg cgctctcgtt ctacgatggc tatcgcacag aaaaattacc cgccaacttg
 1321ttgcaagcgc aacgcgatta tttcggcgca cacacctatg aactattggg cgctgagggc
 1381aaatattgtgc ataccaattg gaccggcact ggtggtaatg tctctgcaag cacataccag
 1441 gcgtaa

//

Για το γονίδιο 6-Pgd έχει βρεθεί η αλληλουχία δύο αλληλομόρφων, του F (Fast) και του I (Intermediate), που διαφέρουν στις θέσεις των νουκλεοτιδικών βάσεων 501 και 703, με τον F αλληλόμορφο να φέρει τα κωδικόνια AAC και GAG, αντίστοιχα, και τον I αλληλόμορφο να φέρει τα κωδικόνια AAG και AAG, στις αντίστοιχες προαναφερόμενες θέσεις.

Bactrocera oleae partial 6-Pgd gene for 6-phosphogluconate dehydrogenase, exons 1-2

MSAKADIALIGLAVMGQNLILNMNDNGFVVCAYNRTVEKVNQFLKNEAKGTKVIGATSLQDMVNKLLKP
 RKIMLLVKAGSAVDDFIQQLVPLLSPGDVIIDGGNSEYQDTARRCDELRAKKILYVSGSVSGGEEGARH
 GPSLMPGGHPEAWPLIQPIFQSICAKADNEPCCEWVGEGGAGHFVKMVHNGIEYGDMQLICEAYQIMKA
 LDLSQAEMATEFEKWNSEELDSFLIEITRDILNYQDEKGFLLERIRDITAGQKGTGKWTATAALQYGVVP
 TLIGEAVFSRCLSALKDERVAASKQFSGPGVSAKVADLPKFLNHKHALYCSKIVSYAQGFMLMREAAK
 ENNWNLNYYGGIALMWRGGCIIRRVFLGNIKDAYTRNPQLSNLLDDFFKKAIEVQNSWRQVVANAFW
 GIPVPALSTALSFYDGYRTEKLPANLLQAQRDYFGAHTYELLGAEGKFVHTNWTGTGGNVSASTYQA

ORIGIN

1 atgtcagcta aagcggatat tgcactgata ggtttggccg ttatgggtca gaatctcatt
 61 ttgaacatga atgataatgg cttcgtggtt tgcgcctaca atcgcacggt cgagaaggtc
 121 aatcaatttc taaagaacga ggccaagggc acaaaagtga tcggcgctac atcgttgtag
 181 gatatggtga acaaattgaa gttgccacgt aaaattatgc ttttgggtcaa ggccggttagc
 241 gctgtggatg atttcattca gcaattggtg ccaactattat cgcccgggtga tgttattatc
 301 gatggtggta actccgagta ccaggataacc gcacgccgtt gcgatgaatt gcgcgccaag
 361 aagatattgt atgttggctc tgggtgtgagt ggtggcgaag aggggtgcacg tcatggtcca
 421 tctcttatgc ctggtgggtca tcccgaagcg tggccactta tccaacccat tttccaatca
 481 atttgcgcaa aagccgacaa cgagccatgc tgcgagtggg tcggcgaagg tgggtgctgga
 541 cattttgtca aaatggtaca taacggtatt gagtatggtg atatgcaatt gatttgcgaa
 601 gcgatcaaaa tcatgaaagc gcttgatctg tcacaagccg aaatggctac agagttcgag
 661 aagtggaaca gcgaagaatt ggattcattc ctcatcgaaa tcacacgtga cattttaaat
 721 tatcaggatg agaaaggttt tctggttgag cgcatacgcg acacagctgg acagaagggg
 781 acggggaagt ggacagccat tgctgcgctg caatacggtg tacctgtaac gctaatcggg
 841 gaagcgggat tttcacgttg cctatccgcg ttgaaggatg aacgtgtggc ggcaagcaaa
 901 caattcagcg gaccggcgt atcggcaaaag gttgcggatc taccgaagtt ctggaatcac
 961 atcaagcatg cattgtactg ctcgaaaatc gtgtcctacg cacaaggttt catggtgatg
 1021cgtgaggcgg ccaaagagaa taactggaac ctgaattatg gtggcattgc gttgatgtgg
 1081cgtggtgggt gcattattcg caggtaagtc ttgtgtgcat gtgtaattat gtaaagcaga
 1141aattcttata cacaaacggt actctgtttg cagggtttct tgggtaacat caaggatgcc
 1201tacaccgcga atccacaact ctcgaaacctg ttggtggatg atttcttcaa gaaggcaatt
 1261gaagttggcc aaaactcatg gcgtcaagtt gtcgccaacg cctttctgtg gggcattcct
 1321gtaccagctc tttogaccgc gctctcgttc tacgatggct atcgcacaga aaaattaccc
 1381gccaaacttg tgcaagcgca acgcgattat ttcggcgcac acacctatga actattgggc
 1441gctgagggca aatttgtgca taccaattgg accggcactg gtggtaatgt ctctgcaagt
 1501acataaccagg cgtaa

Ακολουθεί η ευθυγράμμιση των νουκλεοτιδικών αλληλουχιών του γονιδίου Adh2 με χρήση του προγράμματος ClustalW.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

S          ATGGGTTTGAGCGGCAAAAATGTCGTTTTTCGTTGGCGGTTTGGGCTTCATCGGTTACGAG 60
I          ATGGGTTTGAGCGGCAAAAATGTCGTTTTTCGTTGGCGGTTTGGGCTTCATCGGTTACGAG 60
F          ATGGGTTTGAGCGGCAAAAATGTCGTTTTTCGTTGGCGGTTTGGGCTTCATCGGTTACGAG 60
          *****

S          GCCTGCAAACAGATTATGACCAAGAATGTGGCGTCCTTCTTCGTGTTGACGTTTTGGAA 120
I          GCCTGCAAACAGATTATGACCAAGAATGTGGCGTCCTTCTTCGTGTTGACGTTTTGGAA 120
F          GCCTGCAAACAGATTATGACCAAGAATGTGGCGTCCTTCTTCGTGTTGACGTTTTGGAA 120
          *****

S          AATGCCGAGAATATTAAGGCTCTTCAGGCCATCAATCCCAAGACCAAAGTCTATTACACC 180
I          AATGCCGAGAATATTAAGGCTCTTCAGGCCATCAATCCCAAGACCAAAGTCTATTACACC 180
F          AATGCCGAGAATATTAAGGCTCTTCAGGCCATCAATCCCAAGACCAAAGTCTATTACACC 180
          *****

S          AAATTCGACATCACCAACAAGGCGAGCATTAAAGTCGGCATTTCGCCGATGTTATCGCCAAG 240
I          AAATTCGACATCACCAACAAGGCGAGCATTAAAGTCGGCATTTCGCCGATGTTATCGCCAAG 240
F          AAATTCGACATCACCAACAAGGCGAGCATTAAAGTCGGCATTTCGCCGATGTTATCGCCAAG 240
          *****

S          GTGCAATACATCGATGTACTCGTCAATGGTGCCGGCATACTCACCAGTCCCAATGTAGAG 300
I          GTGCAATACATCGATGTACTCGTCAATGGTGCCGGCATACTCACCAGTCCCAATGTAGAG 300
F          GTGCAATACATCGATGTACTCGTCAATGGTGCCGGCATACTCACCAGTCCCAATGTAGAG 300
          *****

S          TTAACCATGAACATCAATTTGATTTGGTCTTATCAATACCACGCTAGAGGCAATTCACACTC 360
I          TTAACCATGAACATCAATTTGATTTGGTCTTATCAATACCACGCTAGAGGCAATTCACACTC 360
F          TTAACCATGAACATCAATTTGATTTGGTCTTATCAATACCACGCTAGAGGCAATTCACACTC 360
          *****

S          ATGGACAAGAATAAGAACGGACGCGGTGGCCTGATTGTCAACATTGCTTCCGTGTTGGGT 420
I          ATGGACAAGAATAAGAACGGACGCGGTGGCCTGATTGTCAACATTGCTTCCGTGTTGGGT 420
F          ATGGACAAGAATAAGAAGGGACGCGGTGGCCTGATTGTCAACATTGCTTCCGTGTTGGGT 420
          *****

S          TTGGAGCCCGCACCACCCGCCCATCTACTGCGCATCGAAATTCGGTGTATGGGCTTC 480
I          TTGGAGCCCGCACCACCCGCCCATCTACTGCGCATCGAAATTCGGTGTATGGGCTTC 480
F          TTGGAGCCCGCACCACCCGCCCATCTACTGCGCATCTAAATTCGGTGTATGGGCTTC 480
          *****

S          TCGCGATCAATTTCCGATCCCTATTATTACAACCTTACCGGTATTGCGGTAGCCACATTT 540
I          TCGCGATCAATTTCCGATCCCTATTATTACAACCTTACCGGTATTGCGGTAGCCACATTT 540
F          TCGCGTTCATTTCCGATCCCTATTATTACAACCTTACCGGTATTGCGGTAGCCACATTT 540
          *****

S          TGTCCCGGTTTGACAGAAACGCCGTTGAAGAACAATATTGCCACTAAATACACCTTCGAA 600
I          TGTCCCGGTTTGACAGAAACGCCGTTGAAGAACAATATTGCCACTAAATACACCTTCGAA 600
F          TGTCCCGGTTTGACAGAAACGCCGTTGAAGAACAATATTGCTACTAAATACACCTTCGAA 600
          *****

S          TATTCTGAAGGTGATTGGTGATAAAGTCAACAACACCAAGACGCGAGAAACCCGAAGCTTGT 660
I          TATTCTGAAGGTGATTGGTGATAAAGTCAACAACACCAAGACGCGAGAAACCCGAAGCTTGT 660
F          TATTCTGAAGGTGATTGGTGATAAGTCAACAACACCAAGACGCGAGAAACCCGAAGCTTGT 660
          *****

S          GGCCTCATTTGGCTCAGGTGCTCGATACAGCCGAGAATGGTGGCATCTATATTAGCAAC 720
I          GGCCTCATTTGGCTCAGGTGCTCGATACAGCCGAGAATGGTGGCATCTATATTAGCAAC 720
F          GGCCTCATTTGGCTCAGGTGCTCGATACAGCCGAGAATGGTGGCATCTATATTAGCAAC 720
          *****

S          CAAGGCACTTTGTCCAAGGTACACCGACCGTCTACTGGCAACCCACATTCAACTAG 777
I          CAAGGCACTTTGTCCAAGGTACACCGACCGTCTACTGGCAACCCACATTCAACTAG 777
F          CAAGGCACTTTGTCCAAGGTACACCGACCGTCTACTGGCAACCCACATTCAACTAG 777
          *****

```

Ακολουθεί η ευθυγράμμιση των αμινοξικών αλληλουχιών του ενζύμου ADH2 με χρήση του προγράμματος ClustalW.

CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

```

S           MGLSGKNVVFVGGGLGFIGYEACKQIMTKNVASFFVFDVLENAE-IKALQAINPKTKVYYT
59
I           MGLSGKNVVFVGGGLGFIGYEACKQIMTKNVASFFVFDVLENAENIKALQAINPKTKVYYT
60
F           MGLSGKNVVFVGGGLGFIGYEACKQIMTKNVASFFVFDVLENAENIKALQAINPKTKVYYT
60
*****

S           KFDITNKASIKSAFADVIKVQYIDVLVNGAGILTDPNVELTMNINLIGLINTTLEA IPL
119
I           KFDITNKASIKSAFADVIKVQYIDVLVNGAGILTDPNVELTMNINLIGLINTTLEA IPL
120
F           KFDITNKASIKSAFADVIKVQYIDVLVNGAGILTDPNVELTMNINLIGLINTTLEA IPL
120
*****

S           MDKNKNGRGGLIVNIASVLGLEPAPPAAIYCASKFGVMGFSRSISDPYYNLTGIAVATF
179
I           MDKNKNGRGGLIVNIASVLGLEPAPPAAIYCASKFGVMGFSRSISDPYYNLTGIAVATF
180
F           MDKNKNGRGGLIVNIASVLGLEPAPPAAIYCASKFGVMGFSRSISDPYYNLTGIAVATF
180
*****

S           CPGLTETPLKNNIATKYTFEYSKVI GDKLNNTKTQKPEACGAHLAQVLDTAENGGIYISN
239
I           CPGLTETPLKNNIATKYTFEYSKVI GDKLNNTKTQKPEACGAHLAQVLDTAENGGIYISN
240
F           CPGLTETPLKNNIATKYTFEYSKVI GDKLNNTKTQKPEACGAHLAQVLDTAENGGIYISN
240
*****

S           QGTL SKVTPTVYWQPTFN 257
I           QGTL SKVTPTVYWQPTFN 258
F           QGTL SKVTPTVYWQPTFN 258
*****

```