

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Κυριακή Ζητούδη

Συμβολή στη γενετική πληθυσμών του *Myzus persicae* (Sulzer)
(Homoptera: Aphididae)

Επιβλέπων Καθηγητής Ι. Α. Τσιτσιπής

Ν. ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ 2002

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ
ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Κυριακή Ζητούδη

Συμβολή στη γενετική πληθυσμών του *Myzus persicae* (Sulzer)
(Homoptera: Aphididae)

Επιβλέπων Καθηγητής Ι. Α. Τσιτσιπής

Ν. ΙΩΝΙΑ ΜΑΓΝΗΣΙΑΣ 2002



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ
ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»

Αριθ. Εισ.: 59/1
Ημερ. Εισ.: 28-08-2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ
2002
ΖΗΤ



ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Ι. Α. ΤΣΙΤΣΙΠΗΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ Π.Θ.

Α. ΠΑΠΠΑΣ : ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ Π.Θ.

Ζ. ΜΑΜΟΥΡΗΣ: ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ Π.Θ.

Αφιερωμένο στο γιο μου Ιωάννη

Πρόλογος

Στην παρούσα εργασία μελετάται η γενετική παραλλακτικότητα διαφόρων κλώνων της αφίδας *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae).

Η πτυχιακή διατριβή αποτελείται από δυο μέρη. Το γενικό μέρος στο οποίο περιγράφεται ο βιολογικός κύκλος των αφίδων, η προσαρμογή τους στους διάφορους ξενιστές, το είδος αναπαραγωγής καθώς και οι αρχές των μοριακών μεθόδων στις αφίδες. Στο ειδικό μέρος περιγράφονται οι μέθοδοι εκτροφής στις κλωνικές αποικίες, οι πειραματικές εργασίες που έγιναν στο εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, τα αποτελέσματα, η συζήτηση και τα συμπεράσματα που προέκυψαν.

Ευχαριστίες

Πολλές ευχαριστίες εκφράζονται στον επιβλέποντα Καθηγητή μου Ι. Α. Τσιτσιπή για τη βοήθεια και την πολύτιμη καθοδήγηση. Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον Δρ. Ι. Μαργαριτόπουλο του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Φυτικής και Ζωικής Παραγωγής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την πολύτιμη βοήθειά του κατά τη διάρκεια της εργασίας. Επίσης ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζονται στον Αναπληρωτή Καθηγητή Ζ. Μαμούρη για τη βοήθειά του και την προσφορά επιστημονικών γνώσεων, στον υποψήφιο διδάκτορα Κ. Σταμάτη, στον υποψήφιο διδάκτορα Κ. Ζάρπα όπως και στο προσωπικό του εργαστηρίου για τη βοήθεια και συμπαράσταση που μου προσέφεραν. Τέλος ευχαριστώ πολύ την οικογένειά μου, τους φίλους μου και όσους με την αγάπη τους στήριξαν την προσπάθειά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελίδα
Περίληψη	8
 <u>Α΄. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
1) Εισαγωγή	10
2) Βιολογικός κύκλος	13
3) Προσαρμογή σε ξενιστες	15
4) Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης PCR	19
α. Αρχή της μεθόδου	19
β. Χαρακτηριστικά της μεθόδου	25
5) RAPD-PCR	27
Ανάλυση και χρησιμότητα της μεθόδου RAPD-PCR	27
6) Το είδος <i>Myzus persicae</i>	29
7) Σκοπός της εργασίας	34
 <u>Β΄. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
1) Εισαγωγή	35
2) Υλικά και μέθοδοι	37
α. Πειραματικό υλικό	37
β. Μέθοδος δειγματοληψίας	37
γ. Διατήρηση κλώνων και έλεγχος βιολογικού κύκλου	40
δ. Πειραματική διαδικασία	41
3) Αποτελέσματα	45
4) Συζήτηση-Συμπεράσματα	51
5) Βιβλιογραφία	55

6) Παράρτημα	61
7) Summary	63
8) Δημοσίευση εργασίας	64

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) είναι ένα είδος αφίδας με μεγάλη οικονομική σημασία για πολλές καλλιέργειες λόγω των άμεσων και έμμεσων ιών που μεταδίδει. Θεωρείται ο πιο σοβαρός φορέας ιών, καθώς μεταδίδει αποτελεσματικά περισσότερους από 100 ιούς φυτών. Το 1997 ο Blackman, μελετώντας τη μορφολογία κλώνων του συμπλόκου *M. persicae* που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές σε τέσσερις ηπείρους έδειξε ότι οι αφίδες από τον καπνό μπορούν να διακριθούν από αυτές των άλλων ξενιστών με τη χρήση της ανάλυσης πολλαπλών ανταποκρίσεων μεταβλητών. Στην ίδια μελέτη παρέθεσε αποδείξεις που υποστηρίζουν τη γενετική απομόνωση των πληθυσμών που τρέφονται στον καπνό. Σύμφωνα με αυτά τα δεδομένα η μορφή που τρέφεται στον καπνό περιγράφηκε ως καινούργιο είδος, το *Myzus nicotianae* Blackman (Blackman 1987).

Με τη μέθοδο (RAPD-PCR) (Τυχαία Πολλαπλασιαζόμενο Πολυμορφικό DNA-Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης), με 10 δεκαμερείς εκκινητές (random primers), αναλύθηκαν 96 κλώνοι του συμπλόκου *M. persicae* με σκοπό την εύρεση γενετικών δεικτών που να διακρίνουν τους κλώνους που τρέφονται σε καπνό από αυτούς που τρέφονται σε άλλους ξενιστές και τη διευκρίνιση της ταξινομικής θέσης του *Myzus nicotianae* Blackman. Οι κλώνοι αντιπροσωπεύουν επτά πληθυσμούς που συλλέχθηκαν από διαφορετικά φυτά ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας. Χρησιμοποιήθηκαν δέκα δεκαμερείς τυχαίοι εκκινητές για να εκτιμηθεί η γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των εξεταζομένων δειγμάτων. Παρόλη την παραλλακτικότητα που βρέθηκε ανάμεσα στους κλώνους δεν ανιχνεύθηκε κανένας δείκτης RAPD ο οποίος να ξεχωρίζει τους διάφορους πληθυσμούς. Μια σημαντική

διαπίστωση ήταν ότι οι αφίδες από ροδακινιά και πιπεριά, οι οποίες συλλέχθηκαν μακριά από περιοχές όπου καλλιεργείται καπνός, ειδικά αυτές από ροδακινιά, παρουσίασαν γενετική απόκλιση από τους κλώνους που συλλέχθηκαν σε καπνό. Επιπλέον, η ανάλυση των δεδομένων αποκάλυψε σημαντική γενετική διαφοροποίηση μεταξύ ολοκυκλικών και ανολοκυκλικών πληθυσμών που συλλέχθηκαν σε καπνό. Οι ολοκυκλικοί κλώνοι έδειξαν υψηλότερο επίπεδο εκτιμώμενης ετεροζυγωτίας απ' ότι οι μη ολοκυκλικοί (ανολοκυκλικοί, ανδροκυκλικοί και ενδιάμεσοι).

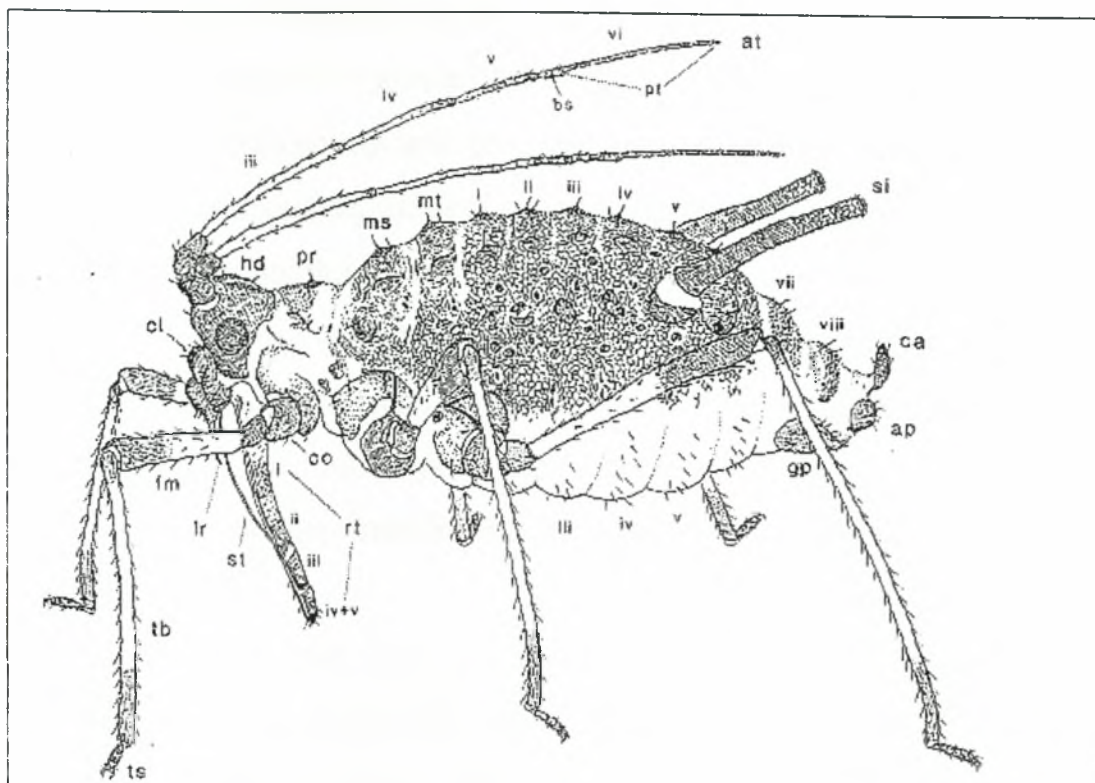
Α'. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αφίδες είναι έντομα πολύ γνωστά με τα κοινά ονόματα μελίγκρα, ψείρες και ψύλλοι. Ανήκουν στην υπεροικογένεια Aphidoidea της τάξης Homoptera (Remaudière & Stroyan 1984).

Οι αφίδες είναι μικρόσωμα έντομα με μαλακό σώμα μήκους 1-10 mm. Έχουν λεπτά και συνήθως μακριά πόδια, με διάρθρους ταρσούς και με κεραίες που αποτελούνται από 3 έως 6 άρθρα. Τα κυριότερα μορφολογικά χαρακτηριστικά που διακρίνουν τις αφίδες από τα άλλα έντομα είναι τα εξής:

- Στα νώτα του πέμπτου κοιλιακού δακτυλίου υπάρχει ένα ζευγάρι σωληνόμορφων αποφύσεων που λέγονται σιφώνια ή κεράτια, τα οποία είναι εκφορητικοί αγωγοί αδένων που παράγουν φερομόνες συναγερού. Όταν η αφίδα προσβληθεί από ένα αρπακτικό έντομο ή άλλο ζώο εκλύει τις φερομόνες οι οποίες επηρεάζουν τη συμπεριφορά των άλλων αφίδων που αποσύρουν τα στοματικά τους μόρια και απομακρύνονται από το σημείο που διατρέφονται.
- Στην άκρη της κοιλιάς υπάρχει μια απόφυση που λέγεται ουρίτσα ή ουρά (cauda).
- Η βάση του ρύγχους βρίσκεται μεταξύ και εμπρός από τα ισχία του πρώτου ζεύγους ποδιών.
- Η κεραία αποτελείται από δύο βασικά άρθρα (σκάπος και ποδίσκος) και το σχετικά λεπτό μαστίγιο, που συνήθως έχει τέσσερα άρθρα.
- Τα φτερά έχουν ένα μόνο χαρακτηριστικό επίμηκες νεύρο (Dixon 1998).



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

Οι αφίδες ζουν κυρίως σε τρυφερούς βλαστούς και τρυφερά φύλλα διαφόρων φυτών. Μερικά είδη είναι ριζόβια ή φυλλόβια και ριζόβια και αρκετά είναι κηκιδόβια. Ζουν συνήθως σε ομάδες το ένα κοντά στο άλλο με την κεφαλή συνήθως προς τη βάση του βλαστού ή του φύλλου. Οι αποικίες τους την άνοιξη μπορεί να σκεπάσουν ολόκληρο το κορυφαίο μέρος νεαρών βλαστών σε ορισμένα φυτά.

Οι αφίδες αφαιρούν μεγάλη ποσότητα χυμού από τα φυτά και το νύγμα πολλών ειδών προκαλεί συστροφή των φύλλων. Με αυτόν τον τρόπο προστατεύονται από τους εχθρούς και γίνεται η καταπολέμησή τους. Διατρεφόμενες με μεγάλες ποσότητες χυμού παράγουν άφθονα μελιτώδη απεκκρίματα που ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς και ευνοούν την εμφάνιση καπνιάς που δημιουργείται από ανάπτυξη σαπροφυτικών μυκήτων. Σε πολλά είδη έχουν αναπτυχθεί σχέσεις συμβίωσης με μυρμήγκια, τα οποία συλλέγουν τα μελιτώδη αποχωρήματα προστατεύοντας τις αφίδες από διάφορους εχθρούς (Banks 1962).

Οι αφίδες είναι από τις κυριότερες κατηγορίες εντόμων που μεταδίδουν στα φυτά παθογόνους ιούς. Ορισμένα είδη είναι φορείς πολλών σοβαρών ιώσεων των καλλιεργούμενων φυτών (van Emden *et al.* 1969, Blackman & Eastop 1984).

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

Οι αφίδες είναι άφθονες κυρίως την άνοιξη και το φθινόπωρο και γενικά με μετρίως θερμό και υγρό καιρό πολλαπλασιαζόμενες παρθενογενετικά. Την άνοιξη τα παρθενογενετικά θηλυκά αναπαράγονται ταχύτατα, γιατί ο καιρός και η ύπαρξη άφθονων τρυφερών φύλλων και βλαστών ευνοούν την ανάπτυξή τους. Σε κλίματα όπως της Ελλάδας οι ζεστοί και ξηροί μήνες του καλοκαιριού δεν ευνοούν τη συνεχή αναπαραγωγή πολλών βλαβερών αφίδων και οι πληθυσμοί τους περιορίζονται (Τζανακάκης 1980).

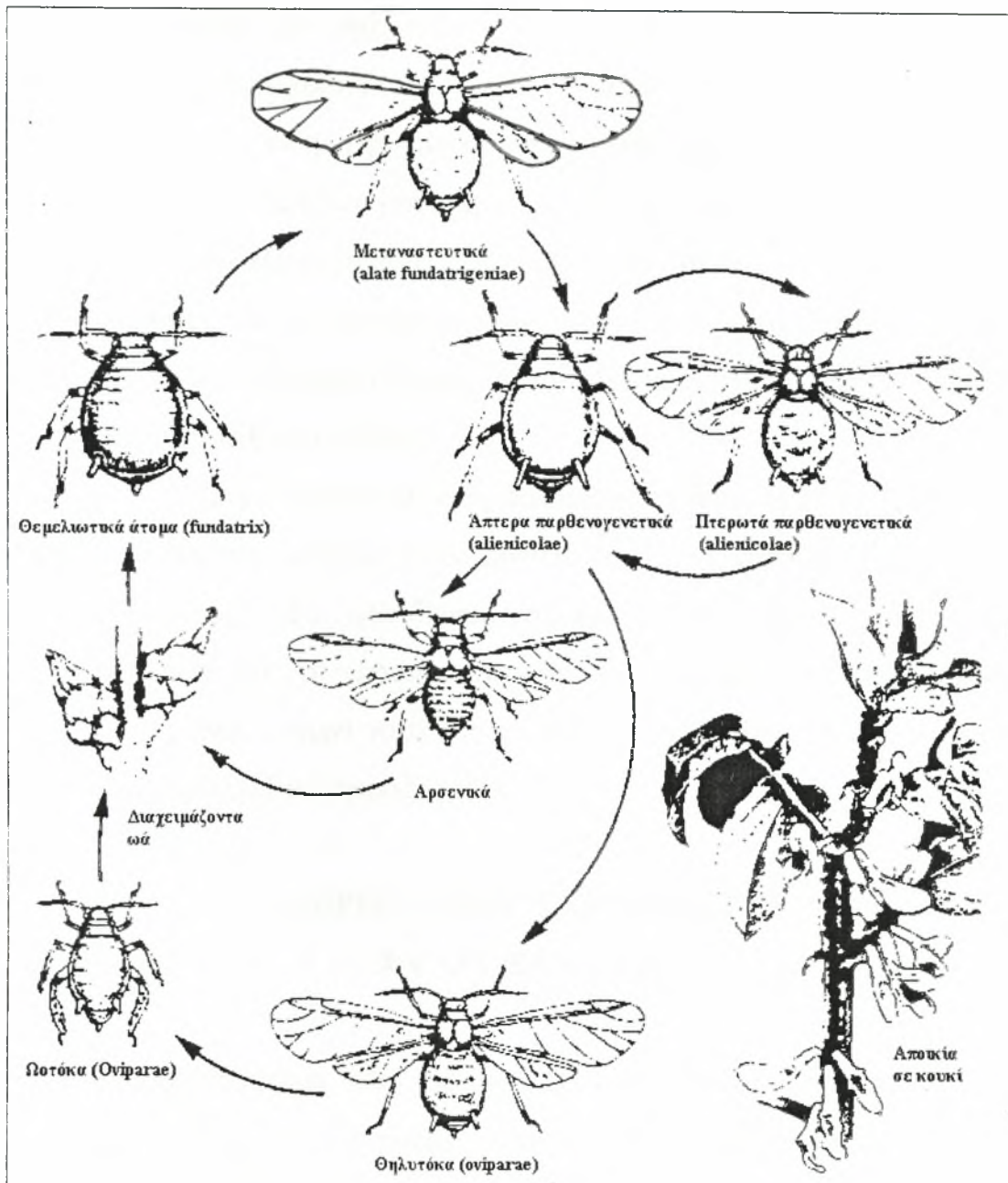
Το γεγονός ότι με φυσικές συνθήκες οι αφίδες δεν καταστρέφουν τελείως την φυτική παραγωγή οφείλεται κατά μεγάλο μέρος στους πολλούς και αποτελεσματικούς φυσικούς εχθρούς τους. Ανάμεσα

στους εχθρούς αυτούς είναι είδη αρπακτικών που ανήκουν σε διάφορες τάξεις: Δίπτερα (Syrphidae, Cecidomyiidae), Νευρόπτερα (Hemerobiidae, Chrysopidae), Κολεόπτερα (Coccinellidae, Staphylinidae, Carabidae), Υμενόπτερα (Proctotrypidae, Aphididae, Chalcididae, Braconidae). Επιπλέον υπάρχουν εχθροί των αφίδων που ανήκουν στα αραχνοειδή καθώς και σε τάξα μυκήτων, όπως είδη των γενών *Empusa*, *Entomophthora*, *Verticillium*.

2.ΒΙΟΛΟΓΙΚΟΣ ΚΥΚΛΟΣ

Τα διάφορα είδη αφίδων από πλευράς ετήσιου κύκλου ζωής κατατάσσονται σε ετερόοικα (μεταναστευτικά) και σε μονόοικα (μη μεταναστευτικά). Στα μεταναστευτικά είδη είναι απαραίτητοι δυο τουλάχιστον ξενιστές: ο κύριος ξενιστής, όπου γίνεται η σύζευξη και γεννιούνται τα χειμερινά ωά, και ο δευτερεύοντας ξενιστής όπου η αφίδα αναπτύσσεται παρθενογενετικά.

Ένας συνηθισμένος ετήσιος κύκλος ενός μεταναστευτικού είδους αφίδας είναι ο εξής. Τα χειμερινά ωά γεννιούνται το φθινόπωρο στο φλοιό του κύριου ξενιστή από το γονιμοποιημένο θηλυκό (ονίπαγα). Την άνοιξη τα ωά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά που ονομάζονται θεμελιωτικά ή ιδρυτικά άτομα (fundatrix). Αυτά παράγουν άπτερα θηλυκά (apterous fundatrigeniae) και αριθμό πτερωτών θηλυκών (alatae fundatrigeniae). Ακολουθούν λίγες παρθενογενετικές γενεές, αλλά με αυξανόμενο το ποσοστό των πτερωτών παρθενογενετικών θηλυκών. Τα πτερωτά αυτά θηλυκά διασπείρονται σε άλλα φυτά του ίδιου είδους ή μεταναστεύουν σε φυτά του δευτερεύοντα ξενιστή (ή ξενιστών) όπου δημιουργούν νέες αποικίες πτερωτών και άπτερον παρθενογενετικών ατόμων.



Σχήμα 2. Βιολογικός κύκλος του ετερόοικου είδους *Aphis fabae* Scopolii (Τροποποιημένο από Blackman & Eastop 1984)

Την άνοιξη, το καλοκαίρι και τις αρχές του φθινοπώρου, στο δευτερεύοντα ξενιστή η μια γενιά διαδέχεται την άλλη. Στα τέλη του θέρους ή το φθινόπωρο, καθώς η διάρκεια της ημέρας μειώνεται, τα άπτερα θηλυκά παράγουν στον δευτερεύοντα ξενιστή πτερωτά άτομα

(gynoparae) και αρσενικά, που μεταναστεύουν στον πρωτεύοντα ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα θα γεννήσουν τα έμφυλα θηλυκά (ονίparae) που εναποθέτουν τα χειμερινά ωά μετά από σύζευξη με τα αρσενικά. Σε είδη της οικογένειας Pemphigidae παράγεται στον δευτερεύοντα ξενιστή μόνο μια μεταναστευτική μορφή, που είναι πτερωτά παρθενογενετικά θηλυκά και ονομάζονται φυλογόνα (sexuparae). Τα φυλογόνα γεννούν στον πρωτεύοντα ξενιστή άπτερα αρσενικά και ωτόκα θηλυκά. Έτσι κλείνει ο ετήσιος κύκλος ζωής (Blackman & Eastop 1984).

Στα μη μεταναστευτικά είδη αφίδων ο παραπάνω ετήσιος κύκλος συμπληρώνεται μόνο σε έναν ξενιστή (στο ίδιο φυτό ή σε φυτά του ίδιου είδους). Το φθινόπωρο άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά (sexuparae) θα γεννήσουν ωτόκα και αρσενικά. Τα αρσενικά συνήθως είναι άπτερα γιατί δεν χρειάζεται να μεταναστεύσουν για να ολοκληρωθεί ο βιολογικός κύκλος.

3. ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΞΕΝΙΣΤΕΣ ΦΥΛΕΣ ΞΕΝΙΣΤΩΝ

Τα περισσότερα είδη αφίδων ζουν σε ένα ή λίγα είδη ενός συγκεκριμένου γένους φυτών, είναι δηλαδή μονόοικα είδη. Περίπου το 10% των ειδών είναι ετερόοικα, δηλαδή περνούν το φθινόπωρο, το χειμώνα και την άνοιξη σ' έναν πρωτεύοντα ξενιστή και το καλοκαίρι σ' ένα δευτερεύοντα ξενιστή ο οποίος σπάνια σχετίζεται με τον πρωτεύοντα. (Dixon 1984).

Η προσαρμογή των αφίδων στους ξενιστές οφείλεται στα χημικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυτών τα οποία καθιστούν τις αφίδες ικανές να διακρίνουν τους ξενιστές από τους μη ξενιστές, καθώς και τα περισσότερο από τα λιγότερο θρεπτικά μέρη των φυτών.

Οι αφίδες αντιδρούν σε οπτικά χαρακτηριστικά, ειδικά στο κίτρινο χρώμα. Το χρώμα είναι ένας καλός δείκτης της θρεπτικής κατάστασης ενός φυτού. Επίσης, οι αφίδες είναι πιθανότερο να εγκατασταθούν στο φυτό στην παρουσία παρά στην απουσία συγκεκριμένων οσμών (Kennedy *et al.* 1962).

Η αναγνώριση των ξενιστών γίνεται με τις κεραίες και τα στοματικά μόρια των αφίδων. Η αφίδα, καθώς περπατάει και ελέγχει την επιφάνεια ενός φυτού, παίρνει πληροφορίες για τις φυσικές και χημικές ιδιότητές του. Οι αφίδες που τρέφονται με χυμούς από τους ξυλώδεις ιστούς των φυτών χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να διεισδύσουν, συνεπώς, θα ήταν πιο εύκολο για τις αφίδες να αναγνωρίζουν το κατάλληλο φυτό από τη φύση της επιφάνειάς του. Πτητικές ουσίες και χαρακτηριστικά στην επιφάνεια ενός φυτού, όπως η ύπαρξη τριχών και κηρωδών ουσιών, μπορεί να είναι πολύ σημαντικά. Μελέτες της συμπεριφοράς των αφίδων του μπιζελιού *Acyrtosiphon pisum* (Harris) που κινούνται ελεύθερα πάνω στην επιφάνεια του φύλλου έδειξαν ότι η προτίμηση του ξενιστή επιτυγχάνεται με τη μεσολάβηση χημικών ερεθισμάτων και πιθανόν να οφείλεται σε αλληλοχημικές ουσίες (Caillaud 1999). Οι αφίδες του μπιζελιού δεν μπορούν να διακρίνουν τους ξενιστές από τους μη ξενιστές από κάποια απόσταση αλλά είναι ικανές να καθορίσουν αν το φυτό είναι κατάλληλο μετά από μια σύντομη έρευνα.

Η αφίδα *Aphis gossypii* (Glover) είναι ένα πολυφάγο είδος που αναπαράγεται κυρίως παρθενογενετικά. Από μελέτες που έγιναν φαίνεται ότι οι γενότυποι που ζουν στο χρυσάνθεμο και το αγγούρι αποτελούν διαφορετικές φυλές. Μικρή ή και μηδενική αναπαραγωγή παρατηρήθηκε μετά από αμοιβαία μεταφορά ξενιστών. Η ανάπτυξη επί τρεις γενιές των κλώνων του αγγουριού πάνω σε χρυσάνθεμα δεν οδήγησε σε κάποιο καλύτερο αποτέλεσμα όσον αφορά το χρόνο

ανάπτυξης και το βάρος ενηλίκου. Τα παραπάνω δείχνουν ότι η *A. gossypii* ανέπτυξε διαφορετικές φυλές προσαρμοσμένες σε διαφορετικούς ξενιστές (Guldemon *et al.* 1994).

Η πράσινη αφίδα της ροδακινιάς *Myzus persicae* (Sulzer) είναι πολυφάγο είδος με ξενιστές πάνω από 400 είδη φυτών που ανήκουν σε περισσότερες από 50 οικογένειες. Η φαινοτυπική πλαστικότητα των ατόμων και η γενετική παραλλακτικότητα των πληθυσμών πιθανόν να συμβάλλουν στην πολυφαγία. Μελέτες που έγιναν σε πληθυσμούς *M. persicae* από ζαχαρότευτλα και πατάτα, όπου εξετάστηκαν περισσότεροι από 1000 κλώνοι, έδειξαν ευρεία γενετική παραλλακτικότητα στην προσαρμογή στους ξενιστές (Weber 1985). Πριν από την περιγραφή της σαν διακριτό είδος, η αφίδα του καπνού *Myzus nicotianae* Blackman (Homoptera: Aphididae) θεωρούνταν μια μορφή του *M. persicae* που τρέφεται στον καπνό. Μελέτες που έγιναν με την μέθοδο της RAPD-PCR δεν ξεχώρισαν πληθυσμούς με βάση το φυτό ξενιστή ή την προέλευσή τους, γεγονός που υποστηρίζει την υπόθεση ότι το *M. persicae* και το *M. nicotianae* είναι το ίδιο είδος (Margaritoroulos *et al.* 1998). Επίσης, σε μελέτη της παραλλακτικότητας διαφόρων μορφολογικών χαρακτηριστικών σε κλώνους *M. persicae*, που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές (ροδακινιά, καπνό, λάχανο, ζαχαρότευτλο και πιπεριά) βρέθηκαν μορφολογικές διαφορές που σχετίζονται με το φυτό ξενιστή από το οποίο συλλέχθηκαν οι αφίδες. Η μορφή της αφίδας του καπνού σε γενικές γραμμές διακρίθηκε από τις αφίδες που προέρχονταν από άλλα φυτά ξενιστές δείχνοντας ότι αυτή η διαφορά πρέπει να έχει κάποια γενετική βάση (Margaritoroulos *et al.* 2000).

Η αφίδα *Therioaphis trifolii* (Monell) προσβάλλει κυρίως τη μηδική το τριφύλλι και κάποια άλλα όσπρια. Συγκρίνοντας δείγματα της αφίδας που συλλέχθηκαν από τη μηδική και το τριφύλλι και

χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές (αναπαραγωγή σε διάφορους ξενιστές, μορφολογία και συνδυασμό γενετικών δεικτών μιτοχονδριακού DNA και RAPD-PCR) βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στο φυτό ξενιστή από τον οποίο συλλέχθηκαν οι αφίδες και του γενοτύπου των αφίδων. Οι αφίδες που συλλέχθηκαν από τη μηδική είχαν διαφορετική μορφή γενοτύπου από αυτές που συλλέχθηκαν από το τριφύλλι. Και οι δυο αυτές ομάδες αφίδων ξεχώριζαν μορφολογικά από την κίτρινη αφίδα του τριφυλλιού, την άλλη μορφή του είδους που έχει αναγνωρισθεί μέχρι στιγμής. Συνεπώς θεωρείται ότι η αφίδα του τριφυλλιού και η αφίδα της μηδικής αποτελούν διαφορετικές φυλές της *T. trifolli* (Sunnucks *et al.* 1997). Σε δείγματα του *Rhopalosiphum maidis* (Fitch), που συλλέχθηκαν από το καλαμπόκι, βρέθηκε ότι ο καρυότυπός τους είναι $2n=8$ ενώ αυτά από το κριθάρι και τη μουχρίτσα $2n=10$. Δείγματα από το σιτάρι είχαν διαφορετικούς καρυότυπους ($2n=8,9,10$). Τα αποτελέσματα έδειξαν υψηλή επιλεκτικότητα στην αποίκηση του καλαμποκιού και του κριθαριού από διαφορετικούς γενοτύπους του *R. maidis* (Blackman *et al.* 1990).

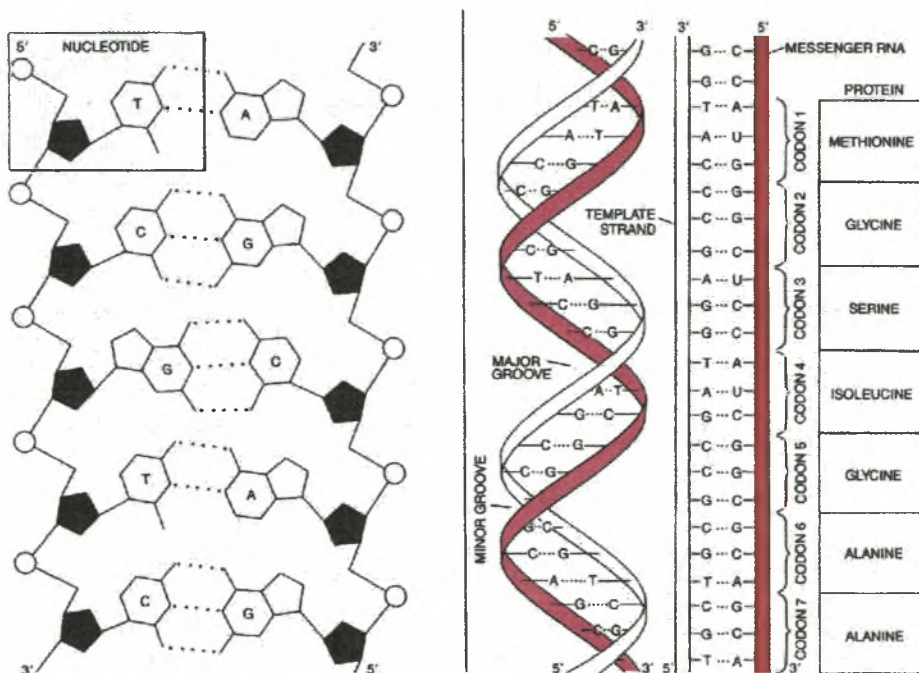
4. ΑΛΥΣΙΔΩΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΠΟΛΥΜΕΡΑΣΗΣ (PCR)

A. Αρχή της μεθόδου

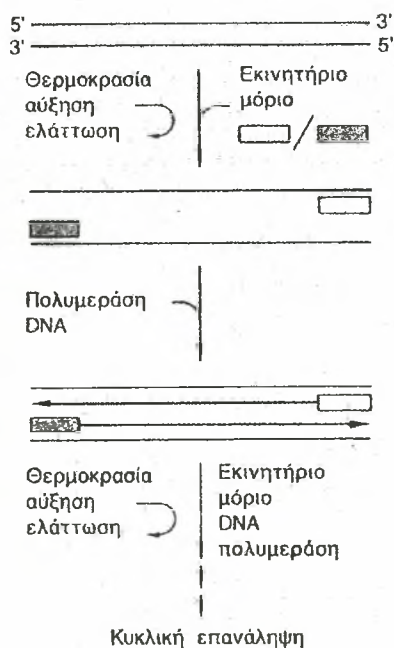
Με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης, Polymerase Chain Reaction (PCR) επιτυγχάνεται ο ενζυμικός πολλαπλασιασμός *in vitro* ενός τμήματος DNA που ονομάζεται και DNA στόχος, από ελάχιστες αρχικές ποσότητες δείγματος εντός ολίγων ωρών. Η μέθοδος της PCR πραγματοποιείται σε κύκλους όπου ο κάθε κύκλος αποφέρει εκθετικό πολλαπλασιασμό του DNA στόχου. Από αρχική ποσότητα δείγματος DNA μη ανιχνεύσιμου με κλασσικές τεχνικές υβριδισμού (Southern και Northern blotting) το DNA επεκτείνεται με την PCR και γίνεται εύκολα ανιχνεύσιμο (Williams *et al.* 1991).

Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου στηρίζεται στη χρήση:

1. Μικρής ποσότητας DNA που παίζει το ρόλο του μορίου-μήτρας.
2. Ενός ζεύγους συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων τα οποία ονομάζονται εκκινητές (primers).
3. Ειδικής DNA πολυμεράσης (Taq DNA polymerase) που έχει απομονωθεί από το θερμοφιλο βακτήριο *Thermus aquaticus* και είναι θερμοσταθερή διατηρώντας τη δραστηκότητά της σε θερμοκρασίες έως και 95° C.
4. Ενός κατάλληλου διαλύματος ελεύθερων 5' τριφωσφορικών δεοξυριβοζονουκλεοτιδίων (dNTPs).
5. Κατάλληλης συγκέντρωσης διαλύματος MgCl₂
6. Ειδικού διαλύματος για την Taq πολυμεράση.



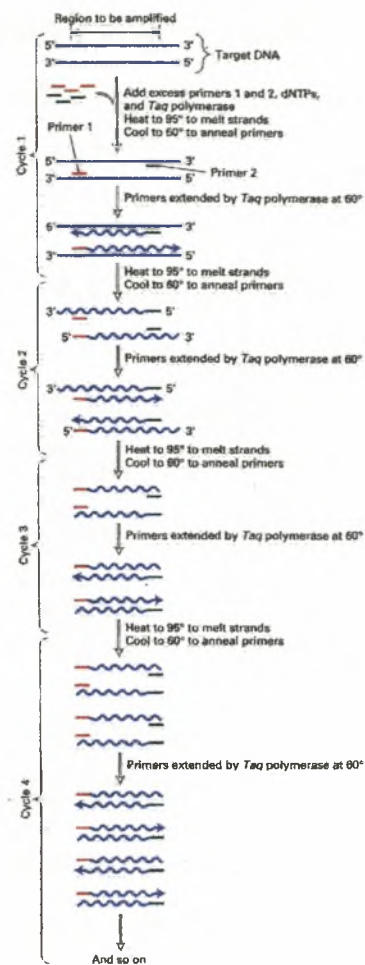
Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση του μορίου του DNA



Σχήμα 4. Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης. Ολιγονουκλεοτίδια, που παράγονται με χημική σύνθεση, χρησιμοποιούνται ως εκκινητήρια μόρια (primer) για τη σύνθεση του μεταξύ των δυο εκκινητηρίων μορίων τμήματος DNA.

Κάθε κύκλος της PCR αποτελείται από 3 στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι η θερμική αποδιάταξη του DNA στόχου, όπου το δίκλωνο DNA μετατρέπεται σε μονόκλωνο. Το δεύτερο στάδιο είναι η θερμική επαναδιάταξη του DNA, κατά την οποία τα δύο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια, συνδέονται με τις δύο συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA στόχου δηλαδή τις απλές αλυσίδες DNA. Στο τρίτο στάδιο γίνεται η σύνθεση του DNA με το διπλασιασμό του DNA-στόχου παρουσία θερμοάντοχης DNA πολυμεράσης και τριφωσφορικών δεοξυριβονουκλεοτιδίων, οπότε προστίθενται συμπληρωματικές βάσεις στα 3' άκρα των εκκινητών και οι πολυνουκλεοτιδικές αλυσίδες επεκτείνονται. Το σύνολο των τριών σταδίων: 1) μετουσίωσης-αποδιάταξης (denaturation), 2) υβριδισμού-πρόσδεσης των εκκινητών (annealing) επί των συμπληρωματικών τους αλληλουχιών στις μονόκλωνες αλυσίδες του DNA στόχου και 3) επέκτασης-πολυμερισμού των προσδεδμένων εκκινητών (extension), αποτελεί έναν κύκλο της αντίδρασης PCR (Mullis *et al.* 1987).

Στο τέλος αυτής της διαδικασίας, από μια δίκλωνη γονική έλικα DNA δημιουργούνται δυο θυγατρικές δίκλωνες έλικες DNA. Στον αμέσως επόμενο κύκλο οι δίκλωνες έλικες DNA γίνονται 4 (δύο του αρχικού υποστρώματος και δυο αντίγραφα) που αποτελούν πρότυπα καλούπια για τη σύνθεση νέων κλώνων DNA-στόχου στον επόμενο κύκλο. Συνεπώς, στο τέλος του 2⁰⁰ κύκλου οι κλώνοι του DNA στόχου θα είναι 8 και σε κάθε νέο κύκλο θα αυξάνονται με εκθετική πορεία κατά 2ⁿ, όπου n, ο αριθμός των κύκλων της αντίδρασης. Ο πολλαπλασιασμός συνεχίζεται για 25-40 κύκλους. Το τελικό αποτέλεσμα είναι ο πολλαπλασιασμός του τμήματος DNA-στόχου κατά εκατομμύρια φορές μέσα σε λίγες ώρες. Εάν υποθέσουμε ότι η απόδοση του συστήματος είναι 100% για κάθε κύκλο, τότε μετά από 25 κύκλους θα έχουμε την παραγωγή 2²⁵ (33.554.432) αντιγράφων, ενώ μετά από 40 κύκλους



Σχήμα 5. Πολλαπλασιασμός ενός τμήματος DNA με τη μέθοδο της Αλυσιδωτής Αντίδρασης Πολυμεράσης.

έχουμε την παραγωγή 2^{40} (1.099.511.627.716) μονόκλωνων συμπληρωματικών αντιγράφων DNA-στόχου (Innis *et al.* 1990).

Κάθε κύκλος της PCR περιλαμβάνει τρεις διαφορετικές θερμοκρασίες για τα τρία στάδια αποδιάταξης, υβριδισμού και πολυμερισμού. Η αποδιάταξη του DNA επιτυγχάνεται συνήθως σε θερμοκρασία 92-95°C για 30 δευτερόλεπτα περίπου, ο υβριδισμός στους 50-65°C για 1'-2' λεπτά ανάλογα με την περιεκτικότητα των οδηγών σε A/T-G/C και τέλος ο πολυμερισμός πραγματοποιείται σε θερμοκρασία 70-78°C για 1'-2' λεπτά. Οι εναλλαγές της θερμοκρασίας κατά την PCR, επιτυγχάνονται με την χρήση ειδικών αυτοματοποιημένων συσκευών,

των θερμικών ανακυκλωτών ή θερμοκυκλοποιητών και είναι ταχύτατες (η θερμοκρασία των δειγμάτων αυξομειώνεται κατά 40° C σε λιγότερο από 1 λεπτό) (Mullis *et al.* 1987).

ΚΥΚΛΟΣ ΤΗΣ PCR

ΣΤΑΔΙΟ	ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ (°C)	ΧΡΟΝΟΣ (sec)
1 ^ο	92-95	30
2 ^ο	50-65	60-120
3 ^ο	70-78	60-120

Συνήθως για την επέκταση του DNA-στόχου επαρκούν 100 ng ολικού DNA. Η αλληλουχία του DNA στόχου πρέπει να είναι ακέραια ώστε να επιτευχθεί η αντιγραφή της. Η νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA στόχου μπορεί να είναι άγνωστη, πρέπει απαραιτήτως όμως οι αλληλουχίες των δύο άκρων του DNA στόχου να είναι γνωστές ώστε να σχεδιαστούν τα απαραίτητα για την μέθοδο συνθετικά ολιγονουκλεοτίδια-εκκινητές.

Ο σχεδιασμός και η επιλογή των κατάλληλων εκκινητικών μορίων-οδηγών γίνεται με βάση τις σταθερές περιοχές του DNA στόχου. Οι οδηγοί πρέπει να έχουν παρόμοια περιεκτικότητα σε G/C, να μην εμφανίζουν συμπληρωματικότητα στο 3' ή το 5' άκρο τους, να απέχουν μεταξύ τους κατά 50 τουλάχιστον ζεύγη βάσεων και να έχουν παρόμοια θερμοκρασία τήξεως (melting temperature, T_m) (Williams *et al.* 1991). Η θερμοκρασία τήξεως δίκλωνου DNA είναι συνάρτηση της αλληλουχίας του μορίου, και κατά προσέγγιση υπολογίζεται με βάση την περιεκτικότητα του μορίου σε πουρίνες και πυριμιδίνες σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο: $T_m = (4 \times \text{αριθμός βάσεων G+C}) + (2 \times \text{αριθμός βάσεων A+T})$. Επιθυμητές T_m κυμαίνονται κατά κανόνα μεταξύ 55-65° C.

Μεγάλο ρόλο στην τεχνική της PCR παίζει και η θερμοκρασία επαναδιάταξης (Τα annealing temperature) των εκκινητικών μορίων. Η Τα επιλέγεται κατά 5-10° C χαμηλότερη της Tm. Η παρασκευή των συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων γίνεται σε αυτόματες συσκευές σύνθεσης DNA.

Ο άριστος αριθμός κύκλων εξαρτάται από τη συγκέντρωση του DNA στόχου και την απόδοση της PCR σε κάθε κύκλο. Μεγαλύτερος αριθμός κύκλων από τον άριστο οδηγεί συνήθως στην αύξηση των μη ειδικών προϊόντων της γονιδιακής επέκτασης, ενώ μικρότερος αποδίδει χαμηλότερο αριθμό αντιγράφων με αποτέλεσμα τη δυσχερή έως αδύνατη ανίχνευση του DNA στόχου. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι όταν ο αριθμός των μορίων του DNA στόχου σε ένα βιολογικό υλικό είναι 10⁵ απαιτούνται 30 κύκλοι, όταν είναι 10⁴ απαιτούνται 35 κύκλοι ενώ όταν είναι 10³ ή μικρότερος απαιτούνται 40-45 κύκλοι (Erlich *et al.* 1989).

Το κύριο προϊόν της PCR είναι δίκλωνο DNA, τα 5' άκρα του οποίου καθορίζονται από τους εκκινητές. Το μέγεθος του προϊόντος της PCR σε ζεύγη βάσεων, ισούται με το άθροισμα των βάσεων του ζεύγους των εκκινητικών μορίων και της παρεμβαλλόμενης αλληλουχίας του DNA στόχου που επεκτείνεται.

Ας σημειωθεί ότι η αλληλουχία των νουκλεοτιδίων, που προστίθενται στο 3' άκρο μιας αφετηρίας στην αρχή δεν σταματά υποχρεωτικά στην επιθυμητή 5' θέση του άλλου ολιγονουκλεοτιδίου, αλλά προχωρεί άλλοτε λίγο και άλλοτε περισσότερο. Ωστόσο, μετά από μερικούς κύκλους αντίδρασης επικρατούν οι θυγατρικές αλυσίδες, που έχουν ως άκρα τους τα προκαθορισμένα σημεία της επιθυμητής αλληλουχίας. Είναι δυνατόν, κατά τους πρώτους κύκλους της PCR, να σχηματισθούν αλυσίδες DNA μακρύτερες από το τελικό μήκος του DNA στόχου, οι οποίες όμως αποτελούν ελάχιστο ποσοστό του προϊόντος της PCR και δεν είναι ανιχνεύσιμες.

B. Χαρακτηριστικά της μεθόδου

Η επιτυχία της PCR εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία υβριδισμού (T_a), η οποία εξαρτάται από την ειδική σύνδεση των εκκινητικών μορίων με το DNA στόχο. Όσο μικρότερη είναι η διαφορά ανάμεσα στην T_a και την T_m τόσο μεγαλύτερη είναι η επιτυχία της αντίδρασης. Άλλοι παράγοντες που συμβάλλουν στην επιτυχία της αντίδρασης είναι η συγκέντρωση των ιόντων Mg^{++} ο αριθμός των κύκλων, η συγκέντρωση του ενζύμου Taq πολυμεράση καθώς και η συγκέντρωση των εκκινητικών μορίων και του DNA-στόχου (Erllich 1992).

Η ειδικότητα του προϊόντος της αντίδρασης πιστοποιείται με την παρουσία ομοιογενούς προϊόντος αναμενόμενου μεγέθους σε ηλεκτροφόρηση αгарόζης παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου (1 $\mu\text{g/ml}$). Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στη δυνατότητα του βρωμιούχου αιθιδίου να φθορίζει όταν βρίσκεται σε υπεριώδες φως. Το βρωμιούχο αιθίδιο παρεμβάλλεται μεταξύ διαδοχικών βάσεων της διπλής έλικας και διευκολύνει την ανίχνευση του προϊόντος της PCR σε περιβάλλον υπεριώδους φωτισμού.

Η ταυτοποίηση του προϊόντος της PCR γίνεται συνήθως με υβριδισμό με γνωστό ανιχνευτή (probe) σημασμένο με ^{32}P , βιοτίνη, φλουορεσκίνη, αλκαλική φωσφατάση, υπεροξειδάση, ή κάποια άλλη εύκολα ανιχνεύσιμη ουσία. Εναλλακτικά, η ταυτότητα του προϊόντος της γονιδιακής επέκτασης, μπορεί να εξακριβωθεί και με ηλεκτροφορητική ανάλυση των προϊόντων διάσπασης από κατάλληλα ένζυμα περιορισμού.

Το κύριο χαρακτηριστικό της PCR είναι η μεγάλη ευαισθησία της μεθόδου. Με ραδιενεργό σήμανση του μορίου ανιχνευτή (probe) είναι δυνατή η ανίχνευση έως 1 pg DNA. Με την τεχνική της επανεντοπισμένης PCR (nested PCR) η ευαισθησία μπορεί να αυξηθεί

στο 1 fg. Στην τεχνική αυτή 1-2 μl του προϊόντος της PCR υποβάλλονται σε 2^η PCR με νέο ζεύγος εκκινητικών μορίων, εσωτερικό των αρχικών (inner primers). Όταν η πρώτη PCR γίνει για 25 κύκλους και το προϊόν της υποβληθεί σε επανεντοπισμένη PCR για 25 ακόμα κύκλους παράγονται $1,1 \times 10^{15}$ αντίγραφα του DNA στόχου. Θεωρητικά, η επανεντοπισμένη PCR έχει τη δυνατότητα να ανιχνεύσει 1 αντίγραφο προϊόντος HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus) σε 1×10^6 κύτταρα (Innis *et al.* 1990).

Μεγάλη είναι η ευαισθησία της τεχνικής της PCR και στις μολύνσεις. Πιθανή επιμόλυνση της PCR μπορεί εύκολα να οδηγήσει σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. Η επιμόλυνση μπορεί να προέλθει και από αιωρούμενο (aerosol) DNA στο χώρο εργασίας. Προς αποφυγή των επιμολύνσεων η προετοιμασία των χώρων εκτέλεσης της τεχνικής πρέπει να είναι σχολαστική. Για την μείωση των επιμολύνσεων συνιστάται:

- 1) Χρήση διαφορετικών χώρων επεξεργασίας των δειγμάτων και διεξαγωγής των αντιδράσεων, ιδιαίτερα σε περιπτώσεις διαδοχικών PCR.
- 2) Χρησιμοποίηση διαφορετικών συσκευών καθέτου νηματικής ροής (Laminar flow hood) για την απομόνωση του DNA και την προετοιμασία των αντιδραστηρίων
- 3) Αποστείρωση αντιδραστηρίων και σωληναρίων, προσεκτικός καθαρισμός πιπετών με αιθανόλη και έκθεση του χώρου ή των χώρων εργασίας σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV) μετά το τέλος της εργασίας για 12 τουλάχιστον ώρες.

Οι διαγνωστικές εφαρμογές της PCR και των παραλλαγών της, πρέπει να εκτελούνται με ιδιαίτερη προσοχή. Σε κάθε αντίδραση PCR, πρέπει να περιλαμβάνονται πολλοί αρνητικοί μάρτυρες και να μην αξιολογείται κάποιο δείγμα ως θετικό αν δεν επαληθευτεί και

επιβεβαιωθεί το αποτέλεσμα δύο τουλάχιστον φορές ιδανικά με δύο διαφορετικά ζεύγη οδηγών.

Μεγάλη σημασία έχει και η επιλογή του προς επέκταση DNA στόχου, καθώς και ο σχεδιασμός των κατάλληλων εκκινητών και ανιχνευτών ιδιαίτερα σε περιπτώσεις ανίχνευσης ποικιλιών ιών όπως ο HIV, ή γονιδιακών περιοχών εντόνων ανακατανομών και μεταλλαξιμότητας, όπως διαφόρων εύθραυστων αυτοσωμικών περιοχών, των ψευδοσωματικών περιοχών του Y χρωμοσώματος κ.α. Σε περίπτωση θετικών δειγμάτων, όταν χρησιμοποιούνται περισσότερα από τέσσερα διαφορετικά ζεύγη εκκινητικών μορίων, όπως συνηθίζεται για την επέκταση διαφορετικών γονιδιακών περιοχών, τότε η ευαισθησία και η αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι δυνατό να υπερβεί το 97%.

5. RAPD (Τυχαία Πολλαπλασιαζόμενο Πολυμορφικό DNA)

Ανάλυση και χρησιμότητα της μεθόδου RAPD-PCR

Οι μοριακοί γενετικοί δείκτες έχουν αποδειχθεί πολύτιμα εργαλεία στη μελέτη γενετικών σχέσεων και γενετικής ποικιλομορφίας. Ως μια επέκταση της πληθώρας των τεχνικών που χρησιμοποιούν δείκτες DNA, η μέθοδος RAPD-PCR αποτελεί μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μοριακή οικολογία για να καθορίσει την ταξινομική ταυτότητα, να προσδιορίσει τις φυλογενετικές σχέσεις ανάμεσα σε είδη και να διαχωρίσει δείγματα ανάμικτου γονιδιώματος.

Η χρησιμοποίηση της μεθόδου RAPD έγινε εφικτή μετά τις προόδους στη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction). Ο αριθμός και το μέγεθος των πολλαπλασιαζόμενων τμημάτων DNA εξαρτάται από το μήκος και την

αλληλουχία βάσεων των απλής αλυσίδας συνθετικών ολιγονουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται ως εκκινητές (RAPD primers). Οι εκκινητές συγκολλούνται σε τυχαίες θέσεις στο γονιδίωμα και ο πολυμορφισμός σ' αυτές τις θέσεις ανιχνεύεται στα παραγόμενα προϊόντα με την παρουσία ή την απουσία ενός ή περισσοτέρων τμημάτων. Η μέθοδος επιτρέπει τη μελέτη της παραλλακτικότητας του γενώματος χωρίς προηγούμενη γνώση της αλληλουχίας του DNA (Williams *et al.* 1991, Welsh & McClland 1990, Hadrys 1992) και έχει εφαρμοσθεί με μεγάλη επιτυχία στην εξέταση της παραλλακτικότητας σε πλήθος οργανισμών όπως ψάρια, φυτά, βακτήρια, ποντίκια, μύκητες και μυρμήγκια. Στις αφίδες η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση διαειδικής και ενδοειδικής γενετικής παραλλακτικότητας (Black *et al.* 1992, Cenis *et al.* 1993).

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου RAPD-PCR είναι τα εξής: Είναι σχετικά φθηνή μέθοδος, δεν απαιτεί τη χρήση ραδιενέργειας, ούτε πληροφορία για την ακολουθία του DNA, είναι σύντομη και σχετικά εύκολη στην εκμάθησή της και μπορεί να προσαρμοσθεί στα περισσότερα εργαστήρια.

Ωστόσο, η εφαρμογή της δεν είναι χωρίς τεχνικά προβλήματα και πρακτικούς περιορισμούς. Απαιτείται εκτεταμένη τυποποίηση και είναι δύσκολο να συγκριθούν αποτελέσματα που παράγονται από διαφορετικούς θερμοκυκλοποιητές. Ο αριθμός, το μέγεθος και η ένταση των περιοχών που έχουν πολλαπλασιασθεί είναι πολύ ευαίσθητα σε μικρές αλλαγές των διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην PCR (πχ στη συγκέντρωση του μαγνησίου). Επιπλέον, επειδή η μέθοδος πολλαπλασιάζει τυχαίες περιοχές του γενώματος, παρόμοια σε μέγεθος τμήματα που πολλαπλασιάσθηκαν ανάμεσα σε δύο είδη μπορεί να μην είναι ομόλογα. Άλλο μειονέκτημα είναι ότι δεν ανιχνεύει την

ετεροζυγωτία γι' αυτό αναπτύχθηκαν ειδικές στατιστικές μέθοδοι και μιλάμε για εκτιμώμενη ετεροζυγωτία.

6. ΤΟ ΕΙΔΟΣ *Myzus persicae* (Sulzer) 1776

Ταξινομική θέση. Το είδος *M. persicae* ανήκει στην τάξη Homoptera, στην υπεροικογένεια Aphidoidea, στην οικογένεια Aphididae, στην υποοικογένεια Aphidinae, στο γένος *Myzus* και στο είδος *persicae*. Υπάρχουν περισσότερα από 30 συνώνυμα ονόματα του είδους (Georges & Marc Remaudière 1997) μερικά από τα οποία παρατίθενται στον Πίνακα 1. Το κοινό όνομα της αφίδας είναι πράσινη μελίγκρα της ροδακινιάς (green peach aphid).

Περιγραφή. Το άπτερο ενήλικο παρθενογενετικό θηλυκό έχει σώμα σχετικά λεπτό μήκους 1,2 έως 2,3 mm και χρώμα στις διάφορες αποχρώσεις από πράσινο έως κόκκινο (πράσινο, ανοικτό πρασινοκίτρινο, κιτρινοπράσινο, κίτρινο, κόκκινο). Μερικά άτομα φέρουν καστανές ζώνες στα νώτα τους. Τα σιφώνια είναι λεπτά και μακριά μήκους 0,4 mm αλλά δεν ξεπερνούν την άκρη της κοιλιάς. Η ουρίτσα είναι στενόμακρη μήκους 0,2 mm και με τρία ζεύγη τριχών.

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

Ξενιστές. Είναι εξαιρετικά πολυφάγο είδος και προσβάλλει περισσότερα από 400 είδη φυτών, σε όλες τις ηπείρους. Από τα καλλιεργούμενα φυτά προσβάλλει είδη των οικογενειών Rosaceae, Solanaceae, Malvaceae, Compositae, Chenopodiaceae, Umbelliferae, Papilionaceae, Cruciferae. Τα χειμερινά αυγά αποτίθενται κυρίως στη ροδακινιά (*Prunus persica*) και δευτερευόντως σε άλλα πυρηνόκαρπα

Πίνακας 1. Συνώνυμα του είδους *M. persicae*. (Sulzer) 1776
(Georges & Marc Remaudière 1997)

<i>Aphis dianthi</i> Schrank (1801)
<i>Aphis vulgaris</i> Kyber (1815)
<i>Aphis persicae</i> Morren (1836)
<i>Aphis rapae</i> Curtis (1842)
<i>Aphis dubia</i> Curtis (1842)
<i>Aphis particeps</i> Walker (1845)
<i>Aphis vastator</i> Smee (1846)
<i>Aphis consors</i> Walker (1848)
<i>Aphis persola</i> Walker (1848)
<i>Aphis deposita</i> Walker (1848)
<i>Aphis derelicta</i> Walker (1849)
<i>Aphis ergessa</i> Walker (1849)
<i>Aphis redundans</i> Walker (1849)
<i>Myzus callae</i> Koch (1854)
<i>Siphonophora nasturtii</i> Koch (1855)
<i>Aphis persicophila</i> Rondani (1860)
<i>Siphonophora achyranthes</i> Monell in Riley & Monell (1879)
<i>Siphonophora calenduella</i> Monell in Riley & Monell (1879)
<i>Rhopalosiphum tulipae</i> Thomas (1879)
<i>Rhopalosiphum galeactitis</i> Macciati (1883)
<i>Myzus malvae</i> Oestlund (1886)
<i>Aphis cymbalariae</i> Schouteden (1900)
<i>Myzus pergandii</i> Sanderson (1901)
<i>Aphis cynoglossi</i> Williams (1911)
<i>Rhopalosiphum betae</i> Theobald (1913)
<i>Rhopalosiphum lactucellum</i> Theobald (1914)
<i>Macrosiphum lophosperum</i> Theobald (1914)
<i>Macrosiphum lycopersicella</i> Theobald (1914)
<i>Myzodes tabaci</i> Mordvilko (1914)
<i>Rhopalosiphum trilineatum</i> Guercio (1920)
<i>Myzus persicae</i> var. <i>tuberoscellae</i> Theobald (1922)
<i>Myzus persicae</i> var. <i>sanguisorbiella</i> Theobald (1926)
<i>Myzus persicae</i> var. <i>portulacella</i> Theobald (1926)
<i>Myzus persicae</i> subsp. <i>dyslycialis</i> F.P. Müller (1955)
<i>Myzus nicotianae</i> Blackman (1987)



Εικόνα 1. Άπτερο (α) και πτερωτό (β) παρθενογενετικό θηλυκό του *M. persicae*.

όπως βερυκοκιά (*P. armeniaca*), δαμασκηλιά (*P. domestica*), κερασιά (*P. anium*), αμυγδαλιά (*P. amygdalus*). Μερικές από τις καλλιέργειες που προσβάλλει είναι: καπνός, πατάτα, τομάτα, μαρούλι, καρότο, κουκιά, τεύτλα, σπανάκι και λάχανο.

Βιολογία. Έχει περισσότερες από 5 γενιές το έτος. Σε περιοχές με σχετικά ψυχρό χειμώνα το είδος διαχειμάζει ως χειμερινό ωό στο φλοιό των κύριων ξενιστών (ροδακινιάς ή άλλων πυρηνόκαρπων). Τα χειμερινά ωά, συνήθως 4-6 ανά θηλυκό, βρίσκονται στους οφθαλμούς ή σε εσοχές αδρών μερών του φλοιού. Στο τέλος του χειμώνα με αρχές ανοίξεως τα ωά εκκολάπτονται και δίνουν άπτερα παρθενογενετικά θηλυκά, τα λεγόμενα θεμελιωτικά (*fundatrices*). Ακολουθεί μικρός αριθμός παρθενογενετικών γενεών (*fundatrigeniae*) στη ροδακινιά και έπειτα πτερωτά άτομα μεταναστεύουν σε ποώδη φυτά (δευτερεύοντες ξενιστές), όπου η μια παρθενογενετική γενιά διαδέχεται την άλλη με παραγωγή πτερωτών και άπτερων μορφών. Το φθινόπωρο ή τις αρχές του χειμώνα παράγονται στα ποώδη φυτά πτερωτά θηλυτόκα και αρσενικά τα οποία μεταναστεύουν στο δευτερεύοντα ξενιστή. Εκεί τα θηλυτόκα γεννούν τα ωοτόκα, τα οποία εναποθέτουν τα χειμερινά ωά μετά από συζευξη με τα αρσενικά. Σε περιοχές με σχετικά ζεστό χειμώνα το έντομο αναπαράγεται παρθενογενετικά όλες τις εποχές του έτους. Το φθινόπωρο οι ανδροκυκλικοί κλώνοι παράγουν παρθενογενετικές μορφές, που θα διαχειμάσουν σε αυτοφυή φυτά ή χειμερινές καλλιέργειες και αρσενικά που συμμετέχουν στη σεξουαλική φάση του είδους (Müller 1954, 1958, Waldhauer 1953, 1957, Van Emden *et al.* 1969, Blackman 1971, 1974). Επίσης βρέθηκε ότι στη Βόρεια Ελλάδα, στις κύριες περιοχές που καλλιεργείται η ροδακινιά, υψηλό ποσοστό κλώνων του συμπλόκου *M. persicae* που τρέφεται στον καπνό αποτελείται από ολοκυκλικούς κλώνους (Κεφάλαιο III, Μαργαριτόπουλος και συνεργάτες 1997, 1999).



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

Ζημιές. Προσβάλλει κατά προτίμηση τις κορυφές τρυφερών βλαστών και τρυφερά φύλλα, τα οποία συστρέφονται από την προσβολή. Τα μελιτώδη απεκκρίματά της ρυπαίνουν το φύλλωμα και τους καρπούς. Εκτός από την άμεση ζημιά που προκαλεί στα φυτά, η αφίδα αυτή θεωρείται ο πιο σοβαρός φορέας ιών, αφού μπορεί να μεταδώσει αποτελεσματικά περισσότερους από 100 ιούς φυτών (Kennedy *et al.* 1962). Μερικοί από τους έμμοιους ιούς που μεταδίδει είναι ο ιός του ήπιου κιτρινίσματος των τεύτλων (BMYV), της παραμόρφωσης των νεύρων του καπνού (TVDV), του καρουλιάσματος των φύλλων του μπιζελιού (PLRV) και του καρουλιάσματος των φύλλων της πατάτας (PLRV) (Blackman & Eastop 1984). Επίσης, μεταδίδει αποτελεσματικά και πολλούς μη έμμοιους ιούς, μερικοί από τους οποίους είναι: ο ιός του κίτρινου μωσαϊκού της κοινής κολοκυθιάς (ZYMV), ο ιός της κίτρινης στιγμάτωσης της κολοκυθιάς (ZYFV), ο ιός του μωσαϊκού της αγγουριάς (CMV), ο ιός του Y της πατάτας (PVY), ο ιός του A της πατάτας (PVA), ο ιός του μωσαϊκού της μηδικής (AMV) (Brun *et al.* 1996).

8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας ήταν η εξέταση της ενδοειδικής γενετικής παραλλακτικότητας σε σχέση με την βιολογία του είδους και τα φυτά ξενιστές που αυτό αποικίζει. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν κλώνοι του *M. persicae* με γνωστό βιολογικό κύκλο που συλλέχθηκαν από διάφορους ξενιστές και περιοχές της Ελλάδας.

Επιπλέον, ένα άλλο αντικείμενο της παρούσας μελέτης ήταν η εξέταση της σχέσης του τρόπου αναπαραγωγής του είδους και της γενετικής παραλλακτικότητας στη δομή των πληθυσμών του.

Β'. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η αφίδα *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) είναι ένα κοσμοπολίτικο πολυφάγο είδος σημαντικός εχθρός πολλών καλλιεργειών. Το *M. persicae* θεωρείται ως ο σημαντικότερος εχθρός του καπνού στην Ελλάδα, προκαλώντας άμεσες αλλά και έμμεσες ζημιές στα φυτά μεταφέροντας σοβαρούς μη έμμοτους ιούς (Katis *et al.* 1993). Ένα σημαντικό χαρακτηριστικό της βιολογίας του *M. persicae* είναι η εναλλαγή των ξενιστών. Το φθινόπωρο, όταν η φωτοπερίοδος πέφτει κάτω από ένα κρίσιμο επίπεδο, τα άπτερα θηλυκά των ολοκυκλικών κλώνων παράγουν θηλυτόκα και αρσενικά στους δευτερεύοντες ξενιστές, που μεταναστεύουν στον πρωτεύοντα ξενιστή, τη ροδακινιά (*Prunus persica*) όπου τα θηλυτόκα γεννούν τα ωτόκα θηλυκά. Τα ωτόκα ζευγαρώνουν με τα αρσενικά και εναποθέτουν τα διαχειμάζοντα ωά (van Emden *et al.* 1969). Κατά την πορεία της εξέλιξης του είδους μερικοί πληθυσμοί έχασαν εντελώς ή μερικώς την ικανότητα της σεξουαλικής αναπαραγωγής. Τρεις άλλες κατηγορίες βιολογικού κύκλου, εκτός από τους ολοκυκλικούς γενοτύπους έχουν περιγραφεί σε σχέση με την αντίδραση στη φωτοπερίοδο, οι ανολοκυκλικοί, οι ανδροκυκλικοί και οι ενδιάμεσοι κλώνοι. Οι ανολοκυκλικοί κλώνοι δεν παράγουν σεξουαλικούς απογόνους και διαχειμάζουν ως παρθενογενετικές μορφές σε ζιζάνια ή χειμερινές καλλιέργειες. Οι ανδροκυκλικοί κλώνοι σε συνθήκες μικρής ημέρας παράγουν παρθενογενετικές μορφές και αρσενικά, τα οποία μπορούν να ζευγαρώσουν με ωτόκα θηλυκά των ολοκυκλικών κλώνων. Οι ενδιάμεσοι κλώνοι παράγουν σε συνθήκες μικρής ημέρας πολλά άπτερα θηλυκά, μερικά αρσενικά και πτερωτά

θηλυκά, τα οποία γεννούν κυρίως παρθενογενετικά θηλυκά, και λίγα έμφυλα θηλυκά (Blackman 1971, 1972).

Άλλο χαρακτηριστικό της βιολογίας του *M. persicae* είναι η προσαρμογή σε συγκεκριμένα φυτά-ξενιστές. Ένα αξιοσημείωτο παράδειγμα είναι οι πληθυσμοί που αποικίζουν τον καπνό, οι οποίοι μπορούν να διακριθούν από αυτούς που προέρχονται από άλλους ξενιστές με τη μέθοδο της σωματομετρίας ή με τεχνικές ηλεκτροφόρησης (Margaritoroulos *et al.* 2000). Επίσης, έχει βρεθεί ότι οι δύο ομάδες μπορούν να διατηρούν τις σχετικές με τον ξενιστή τους διαφορές σε περιοχές όπου οι ολοκυκλικοί πληθυσμοί συνυπάρχουν και περνούν τη σεξουαλική φάση στη ροδακινιά (Blackman & Spence 1992, Margaritoroulos *et al.* 1998).

Μελέτες της γενετικής ποικιλότητας του *M. persicae* που βασίστηκαν σε αλλοενζυμικές αναλύσεις απέτυχαν να αποκαλύψουν ενζυμική παραλλακτικότητα ανάμεσα στους πληθυσμούς, εκτός από τις εστεράσες και την γλουταμική οξαλοξική τρανσαμινάση (GOT) (Brookes & Loxdale 1987, Blackman & Spence 1992). Ωστόσο, μοριακές προσεγγίσεις βασισμένες στην ανάλυση του DNA (μιτοχονδριακό και μικροδορυφορικό DNA και RAPD) αποκάλυψαν ποιοτικές και ποσοτικές διαφορές στη γενετική δομή των πληθυσμών άλλων ειδών αφίδων (Powers *et al.* 1989, Martinez *et al.* 1992, Black *et al.* 1992, Cenis *et al.* 1993, Martinez-Torres *et al.* 1997, Nicol *et al.* 1997, 1998).

Σε προηγούμενη μελέτη που έγινε στο Εργαστήριο Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας (Margaritoroulos *et al.* 1998) εξετάσθηκε με τη μέθοδο της RAPD-PCR η γενετική παραλλακτικότητα ανάμεσα σε κλώνους *M. persicae*, που προέρχονταν από τον καπνό και άλλα φυτά ξενιστές από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Οι 64 τυχαίοι εκκινητές που δοκιμάστηκαν απέτυχαν να ανιχνεύσουν κάποια σταθερή διαφορά στο πρότυπο ζωνών

μεταξύ των δύο ομάδων. Μόνο ένας εκκινητής έδωσε σημαντικό πολυμορφισμό των κλώνων σε σχέση με τον ξενιστή προέλευσης.

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

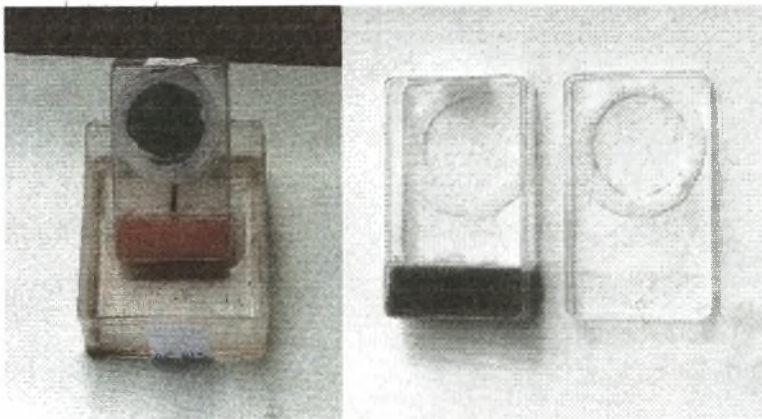
A. Πειραματικό υλικό

Στην εργασία εξετάστηκαν 96 κλώνοι *M.persicae*. Δεκαπέντε (15) κλώνοι συλλέχθηκαν από ροδακινιά, δέκα (10) από πιπεριά και εβδομήντα ένα (71) από καπνό. Η συλλογή των περισσότερων κλώνων έγινε το 1997 ενώ πέντε από αυτούς συλλέχθηκαν το 1998. Οι κλώνοι από πιπεριά και ροδακινιά προέρχονταν από περιοχές όπου δεν καλλιεργείται καπνός. Οι κλώνοι του καπνού συλλέχθηκαν τόσο σε περιοχές όπου καλλιεργούνται ροδακινιές (Αλεξάνδρεια και Κατερίνη) όσο και σε περιοχές όπου δεν συναντώνται συχνά δέντρα ροδακινιάς (Πίνακας 1).

B. Μέθοδος δειγματοληψίας

Η δειγματοληψία από κάθε περιοχή έγινε σε έκταση περίπου ενός εκταρίου. Ένα δείγμα συλλέχθηκε από κάθε φυτό ή δένδρο και αποτελούνταν από 1-3 φύλλα προσβλημένα από αφίδες. Στις ετήσιες καλλιέργειες τα φυτά συλλέγονταν κάθε 4-5 σειρές και τουλάχιστον κάθε πέντε μέτρα επί της σειράς. Στη ροδακινιά τα δείγματα λαμβάνονταν κάθε 3-4 μέτρα στη σειρά. Κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε σφραγισμένη πλαστική σακούλα ελαφρώς φουσκωμένη που περιείχε ένα κομμάτι απορροφητικό χαρτί. Οι σακούλες τοποθετήθηκαν σε πλαστικά κιβώτια που περιείχαν παγοκύστες και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Εκεί δημιουργήθηκαν κλωνικές αποικίες με την τοποθέτηση ενός

παρθενογενετικού θηλυκού σε ειδικό κουτί εκτροφής αφίδων (Εικόνα 1). Οι διαστάσεις του κουτιού εκτροφής είναι 7,7 cm x 4,5 cm x 2 cm, στη βάση του οποίου υπάρχει ένα κομμάτι σφουγγάρι το οποίο διαβρέχεται από νερό (Blackman 1971). Σε αυτό τοποθετήθηκε φύλλο πατάτας (*Solanum tuberosum*) ποικιλίας Sprunta πάνω στο οποίο τρέφονταν οι αφίδες. Τα κουτιά εκτροφής τοποθετήθηκαν σε μεγαλύτερα κουτιά



Εικόνα 1. Πλαστικό κουτί εκτροφής αφίδων, διαστάσεων 7,7 cm x 4,5 cm x 2 cm (Blackman 1971)



Εικόνα 2. Περιοχές της Ελλάδας όπου συλλέχθηκαν οι κλώνοι των αφίδων. Οι κλώνοι από Λεχώνια και Βελεστίνο συλλέχθηκαν από ροδακινιά και πιπεριά αντίστοιχα. Όλοι οι άλλοι κλώνοι συλλέχθηκαν από καπνό.

Πίνακας 1. Κλώνοι (N) του *M. persicae* που συλλέχθηκαν από επτά διαφορετικές περιοχές και ξενιστές το 1997. Η: Ολοκυκλικοί κλώνοι, An: Ανολοκυκλικοί, Ad: Ανδροκυκλικοί, A: Ανολοκυκλικοί κλώνοι που δεν δοκιμάστηκαν για παραγωγή αρσενικών, I: ενδιάμεσοι κλώνοι

Περιοχή	Ξενιστής	N	Κόκκινοι κλώνοι					Πράσινοι κλώνοι					Ολοκυκλικοί κλώνοι (%)
			H	An	Ad	A	I	H	An	Ad	A	I	
Κατερίνη	Καπνός	15	2	-	-	-	-	13	-	-	-	-	100
Αλεξάνδρεια	Καπνός	15	2	-	-	-	1	11	-	-	-	1	87
Δράμα	Καπνός	11*	1	4	-	2	1	1	-	-	1	1	18
Φιλιπιάδα	Καπνός	15	1	3	5	4	2	1	1	1	-	-	7
Αμφίκλεια	Καπνός	15	-	-	3	4	5	1	1	1	-	-	7
Λεχώνια	Ροδακινιά	15						11	-	4	-	-	73
Βελεστίνο	πιπεριά	10						6	1	3			60

*Πέντε κλώνοι συλλέχθηκαν το 1998.

διαστάσεων 14,5 cm x 8,5 cm, που περιείχαν μικρή ποσότητα νερού καθώς και με μια μικρή κλίση έτσι ώστε το φύλλο να βρίσκεται σε μια φυσική θέση και το σφουγγάρι να εμποτίζεται με νερό για την καλύτερη διατήρηση του φύλλου. Επίσης, καταγράφηκε το χρώμα κάθε άπτερης μητέρας.

Γ. Διατήρηση κλώνων και έλεγχος βιολογικού κύκλου

Όλοι οι κλώνοι διατηρήθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης στους 17° C και σε φωτοπερίοδο 16 ώρες φως ανά ημέρα για το συνεχή παρθενογενετικό πολλαπλασιασμό. Δεκαπέντε άπτερα ενήλικα παρθενοτόκα από κάθε κλώνο αποθηκεύτηκαν σε σωλήνες erpendorf στους -25° C μέχρι να γίνει η εξέταση.

Η κατηγορία βιολογικού κύκλου των κλώνων που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία είχε χαρακτηριστεί σε προηγούμενη

μελέτη (Μαργαριτόπουλος 2000) (Διδακτορική διατριβή). Συνοπτικά αναφέρεται η διαδικασία για την μελέτη του βιολογικού κύκλου. Οι κλώνοι διατηρήθηκαν για τρεις συνεχόμενες γενιές σε συνθήκες μικρής ημέρας 10 ωρών φωτός το 24ωρο [SD (L10:D14)] στους 17° C. Ένα ενήλικο άπτερο θηλυκό από την αποικία που διατηρήθηκε σε συνθήκες μεγάλης ημέρας (L16:D8) μεταφέρθηκε σε SD σε ένα κουτί τύπου Blackman πάνω σε φύλλο πατάτας. Περίπου πέντε άπτερα παρθενοτόκα της πρώτης γενιάς συλλέχθηκαν και προσδιορίστηκε η μορφή των πρώτων 60-80 απογόνων τους (δεύτερη γενιά).

Αναγνωρίστηκαν τρεις κατηγορίες πτερωτών θηλυκών από τις μορφές των απογόνων τους που μορφολογικά είναι όμοια. Οι ολοκυκλικοί κλώνοι χαρακτηρίζονται από την παραγωγή θηλυτόκων και αρσενικών στη δεύτερη γενιά, ενώ οι ανολοκυκλικοί από την παραγωγή άπτερων και παρθενοτόκων θηλυκών. Η τρίτη κατηγορία πτερωτών ήταν τα ενδιάμεσα που γέννησαν παρθενογενετικές μορφές και λίγα ωοτόκα. Σε άλλο πείραμα εξετάστηκε η ικανότητα μερικών ανολοκυκλικών κλώνων να παράγουν αρσενικά (ανδροκυκλικοί κλώνοι). Στους ανδροκυκλικούς κλώνους μόνο μερικά άπτερα παρθενοτόκα παράγουν αρσενικά μετά από έναν αριθμό θηλυκών (Blackman 1971, 1972). Συνεπώς, 9-12 άπτερα παρθενοτόκα της πρώτης γενιάς σε SD συλλέχθηκαν και εξετάστηκε η μορφή όλων των απογόνων τους. Οι ανδροκυκλικοί κλώνοι γέννησαν αριθμό αρσενικών στη δεύτερη γενιά σε SD.

Δ. Πειραματική διαδικασία

Το DNA των αφίδων απομονώθηκε σύμφωνα με μια τροποποιημένη μέθοδο των Cenis *et al.* (1993). Μέσα σε σωλήνα erppendorf ομογενοποιήθηκαν 15 άτομα από κάθε κλώνο σε 200 μl από

διάλυμα lysis buffer (200 mM Tris-HCL PH 8.5, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, PH 8 και 0.5% SDS). Έπειτα προστέθηκε ποσότητα 100 μl οξικού νατρίου NaOAc 3M, pH 5.2 και ο σωλήνας τοποθετήθηκε στους -20° C για 10 λεπτά. Οι σωλήνες κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν στις 13000 στροφές για 5 λεπτά και το υπερκείμενο υγρό, που περιείχε το DNA μεταφέρθηκε σε άλλο σωλήνα.

Το DNA καθαρίστηκε μετά από επιτυχημένη εξαγωγή με προσθήκη φαινόλης, φαινόλη:χλωροφόρμιο:ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1; v:v:v) και χλωροφόρμιο:ισοαμυλικής αλκοόλης (24:1; v:v) και φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές ανά λεπτό για 20, 5 και 5 λεπτά αντίστοιχα, και παρέμεινε όλη νύχτα σε παγωμένη αιθανόλη στους -20° C. Ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 13000 στροφές για 20 λεπτά, μετά το DNA ξεπλύθηκε με 70% αιθανόλη, αποξηρανθηκε στους 37° C και τέλος προστέθηκαν 100 μl διαλύματος TE (100mM Tris-HCL, 1mM EDTA, pH 8.0).

Το λεπτομερές πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρατίθεται στο παράρτημα σελ. 61-62.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν δέκα δεκαμερείς τυχαίοι εκκινητές. Οι εννέα από αυτούς (OPA 03, OPA 05, OPA 08, OPA 09, OPA 10, OPA 13, OPA 15, OPA 19 και OPA 20) αγοράστηκαν από την εταιρία Operon Technologies (Alameda, CA, USA) ενώ ο ένας (ECO: 5'-ATGAATTTCGC-3' σχεδιασμένος από τον Du Teau [Black *et al.*, 1992]) συντέθηκε στο Εργαστήριο Βιολογίας-Γενετικής της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα (Πίνακας 2).

Πίνακας 2. Η ακολουθία των δέκα δεκαμερών εκκινητών RAPD που χρησιμοποιήθηκαν στη μελέτη.

Όνομα εκκινητή	Ακολουθία (5' προς 3')
OPA 03*	AGTCAGCCAC
OPA 05	AGGGGTCTTG
OPA 08	GTGACGTAGG
OPA 09	GGGTAACGCC
OPA 10	GTGATCGCAG
OPA 13	CAGCACCCAC
OPA 15	TTCCGAACCC
OPA 19	CAAACGTCGG
OPA 20	GTTGCGATCC
ECO**	ATGAATTTCGC

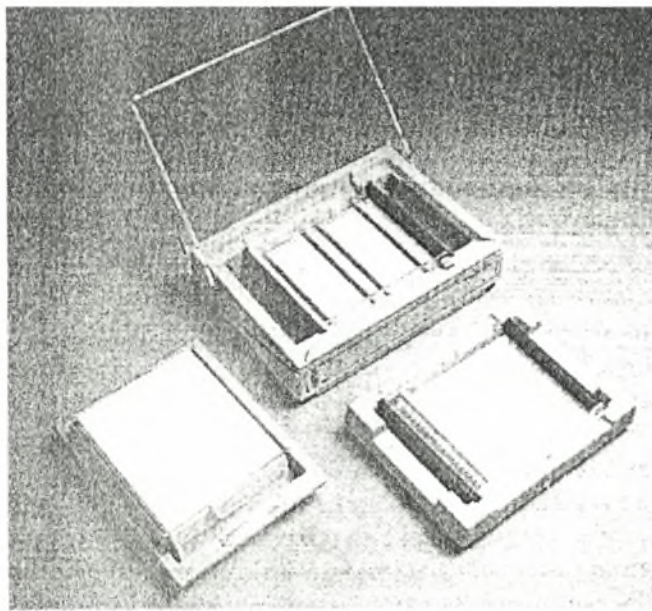
*Operon Technologies (Alameda, CA, USA)

**Σχεδιασμένο από τον DuTeau (Black et al., 1992) και συντεθειμένο στο Εργαστήριο Βιολογίας-Γενετικής, Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας στη Λάρισα.

Οι αντιδράσεις της PCR πραγματοποιήθηκαν στην ίδια συσκευή σε μείγμα αντίδρασης των 25 μl, που περιείχε 30 ng DNA, μία μονάδα Taq πολυμεράσης (Minotech, Ηράκλειο, Κρήτη), 0.25 mM dNTPs, 20 ng από κάθε primer 2.5 mM MgCl₂, και 1X διάλυμα (500 mM KCl, 100 mM Tris pH 9.0) εφοδιασμένο από τον κατασκευαστή του ενζύμου. Οι συνθήκες διεύρυνσης περιελάμβαναν ένα σύνολο 35 κύκλων των 40 δευτερολέπτων στους 94° C, ενός λεπτού στους 38° C και ενός λεπτού στους 72° C, χρησιμοποιώντας την ταχύτερη δυνατόν μετάβαση από την κάθε θερμοκρασία και ακολουθούσε ψύξη στους 4° C μέχρι την ηλεκτροφόρηση.

Ποσότητα 10 μl από κάθε προϊόν της PCR διαχωριζόταν σε πυκτή αγαρόζης 2%, το οποίο περιείχε 0.5 μl ml⁻¹ βρωμιούχο αιθίδιο σε διάλυμα TAE (40 mM Tris/acetate, 1mM EDTA, PH 8). Η εξέταση των ζωνών του DNA έγινε κάτω από λυχνία υπεριώδους ακτινοβολίας. Το

μοριακό βάρος κάθε ζώνης DNA υπολογίσθηκε με τη βοήθεια μάρτυρα (DNA marker) κλίμακας 100 ζευγών βάσεων. Για να αποφευχθούν προβλήματα που σχετίζονται με την παραλλακτικότητα στον αριθμό και την ένταση των προϊόντων της PCR (Hadrys *et al.* 1992, Black 1993, Williams *et al.* 1993), τα προϊόντα του ίδιου πειράματος συγκρίνονταν στην ίδια πυκνή. Κάθε αντίδραση της PCR από την ίδια απομόνωση DNA επαναλαμβανόταν δύο φορές για να ελεγχθεί η ικανότητα αναπαραγωγής των προτύπων RAPD. Οποιοδήποτε μη κανονικό πρότυπο DNA που προερχόταν από μη ικανοποιητική διεύρυνση αποκλειόταν από την ανάλυση.



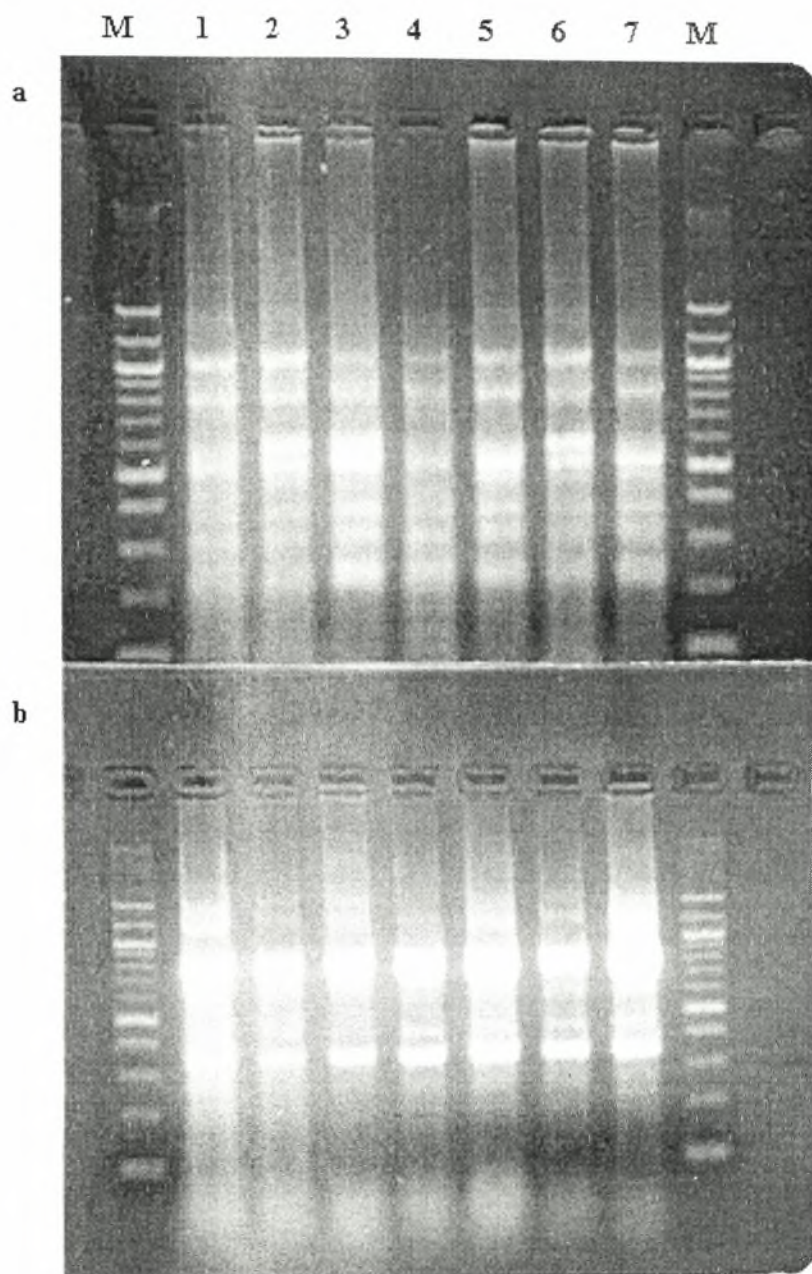
Εικόνα 3. Μικρή συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης.

Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων βασίστηκε στη μέθοδο των Lynch & Milligan (1994). Η συχνότητα από κάθε αλληλόμορφο μέσα σε κάθε πληθυσμό υπολογίστηκε με την προϋπόθεση ότι η παραλλακτικότητα στο πρότυπο των ζωνών αντιπροσωπεύει διαχωρισμό αλληλομόρφων σε ανεξάρτητες θέσεις. Κάθε θέση θεωρήθηκε ως

σύστημα δύο αλληλομόρφων που αντιστοιχούν στην παρουσία ή στην απουσία διευρυμένων ζωνών, όπου το κάθε αλληλόμορφο μπορεί να αποτύχει να πολλαπλασιασθεί είτε λόγω της απουσίας της θέσης του εκκινητή, είτε επειδή υπάρχει απόσταση ανάμεσα στις θέσεις των εκκινητών (Lynch & Milligan 1994). Υπό αυτές τις προϋποθέσεις μια εκτίμηση της συχνότητας του αλληλομόρφου είναι $q = x^{1/2}(1 - (\text{Var}(x)/8x^2))^{-1}$ όπου x είναι η αναλογία των N δειγμάτων που δεν δείχνουν το δείκτη και $\text{Var}(x) = x(1-x) / N$. Επίσης, υπολογίστηκαν τα ζεύγη των γενετικών αποστάσεων του N_{ei} ανάμεσα στους πληθυσμούς για όλους τους εξεταζομένους εκκινητές και η εκτιμώμενη ετεροζυγωτία σύμφωνα με τη μέθοδο των Lynch & Milligan (1994). Οι γενετικές αποστάσεις χρησιμοποιήθηκαν για να υπολογιστεί η γενετική συγγένεια ανάμεσα στους πληθυσμούς με τη βοήθεια της ανάλυσης ομαδοποίησης (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973). Χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα PHYLIP 3.5 (Felsenstein, 1993).

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν ικανοποιητικά προϊόντα πολλαπλασιασμού με όλους τους κλώνους που εξετάστηκαν εκτός από δύο εκκινητές σε δύο κλώνους της πιπεριάς και έναν εκκινητή σε έναν κλώνο που συλλέχθηκε από καπνό. Ο αριθμός των κλώνων που αναλύθηκε ανά πληθυσμό και ανά εκκινητή κυμάνθηκε από 9-15 (Πίνακας 3). Οι ζώνες που παρήχθησαν μετά από τουλάχιστον δύο επαναλήψεις, ανεξάρτητα από την έντασή τους, θεωρήθηκαν αξιόπιστες. Το πρότυπο των ζωνών που έδωσαν οι εκκινητές OPA-09 και OPA-10 φαίνεται στην Εικόνα 3.



Εικόνα 3. Το πρότυπο των ζωνών που έδωσε η μέθοδος RAPD-PCR σε διάφορους κλώνους του *M. persicae* χρησιμοποιώντας τους εκκινητές OPA-09 (a) και OPA-10 (b). Οι κλώνοι συλλέχθηκαν από: 1: Κατερίνη, 2: Βελεστίνο, 3: Λεχώνια, 4: Αλεξάνδρεια, 5: Δράμα, 6: Αμφίκλεια και 7: Φιλιπιάδα

Πίνακας 3. Αριθμός των κλώνων (N), ζώνες (n) που αναλύθηκαν για κάθε πληθυσμό του *M. persicae*, αριθμός (m) και μέσος όρος (P) των μονομορφικών ζωνών που βρέθηκαν σε κάθε εκκινητή και πληθυσμό.

Εκκινητής	N	Λεχώνια		Βελεστίνο		Κατερίνη		Αλεξάνδρεια		Δράμα		Φιλιππιάδα		Αμφίκλεια	
		N	m	N	m	N	m	N	m	N	m	N	m	N	m
OPA 3	13	15	7	10	10	15	8	15	9	11	6	15	8	15	7
OPA 5	13	15	8	10	9	15	8	15	8	11	8	15	8	15	8
OPA 8	11	15	3	10	3	15	1	15	1	11	1	15	3	15	3
OPA 15	13	15	6	9	5	15	5	15	5	10	7	15	6	15	7
OPA 19	12	15	4	10	5	15	4	15	5	11	7	15	5	15	5
OPA 20	10	15	4	9	6	15	5	15	5	11	6	15	7	15	5
OPA 9	10	15	9	10	10	15	7	15	10	11	10	15	7	15	6
OPA 10	12	15	5	10	6	15	8	15	6	11	7	15	6	15	7
OPA 13	11	15	4	10	8	15	9	15	9	11	7	15	9	15	8
ECO	11	15	4	10	5	15	4	15	3	11	7	15	6	15	4
P		0.465		0.587		0.509		0.526		0.569		0.560		0.517	

Οι ζώνες που αναλύθηκαν σε κάθε εκκινητή κυμαίνονταν από 10-13 και όλοι οι εκκινητές έδωσαν 116 καλά αναλύσιμες ζώνες που χαρακτηρίστηκαν ως “loci”. Το μέγεθος των ζωνών κυμάνθηκε από 200 ζ.β.-2100 ζ.β. Κανένας από τους εκκινητές δεν έδωσε διαγνωστική ζώνη ή κάποιο συγκεκριμένο πρότυπο ζωνών το οποίο θα μπορούσε να διαφοροποιήσει τους πληθυσμούς του *M. persicae*. Για να αποκαλυφθούν οι σχετικές γενετικές σχέσεις μεταξύ των επτά πληθυσμών, υπολογίστηκαν οι συχνότητες για τις 116 θέσεις. Οι μονομορφικές ζώνες των αλληλομόρφων κυμάνθηκαν ανάμεσα στους εκκινητές σε όλους τους πληθυσμούς από 9.0 % έως 100 %. Ο ενδοπληθυσμιακός πολυμορφισμός διέφερε σημαντικά μεταξύ των εκκινητών και των πληθυσμών. Για παράδειγμα οι πληθυσμοί από Δράμα, Αλεξάνδρεια και Βελεστίνο ήταν μονομορφικοί για τον primer OPA 09, ενώ μόνο μία θέση από τις 11 που έδωσε ο primer OPA 08 ήταν μονομορφική στους πληθυσμούς της Αλεξάνδρειας και της Δράμας. Επιπλέον, ο μονομορφισμός για τα

δεδομένα όλων των εξετασθέντων εκκινητών κυμάνθηκε ανάμεσα στους επτά πληθυσμούς από 46.5% (Λεχώνια) έως 57.8% (Βελεστίνο) (Πίνακας 3).

Η γενετική απόσταση του Nei (D), που υπολογίστηκε για τους κλώνους που προερχόταν από διάφορες περιοχές, κυμάνθηκε από $D=0.0255$ (Αμφίκλεια-Φιλιπιάδα) έως $D=0.0433$ (Λεχώνια-Κατερίνη) με έναν μέσο όρο $D=0.0344$ (Πίνακας 4). Η γενετική απόκλιση μεταξύ των πληθυσμών ήταν ανεξάρτητη από τη γεωγραφική απόσταση, καθώς συγκρίσεις ανάμεσα στα δείγματα των γενετικών και γεωγραφικών αποστάσεων δεν έδειξαν καμία σημαντική συσχέτιση (Mantel T-test: $R=0.0168$, $T=0.052$, $P<0.521$).

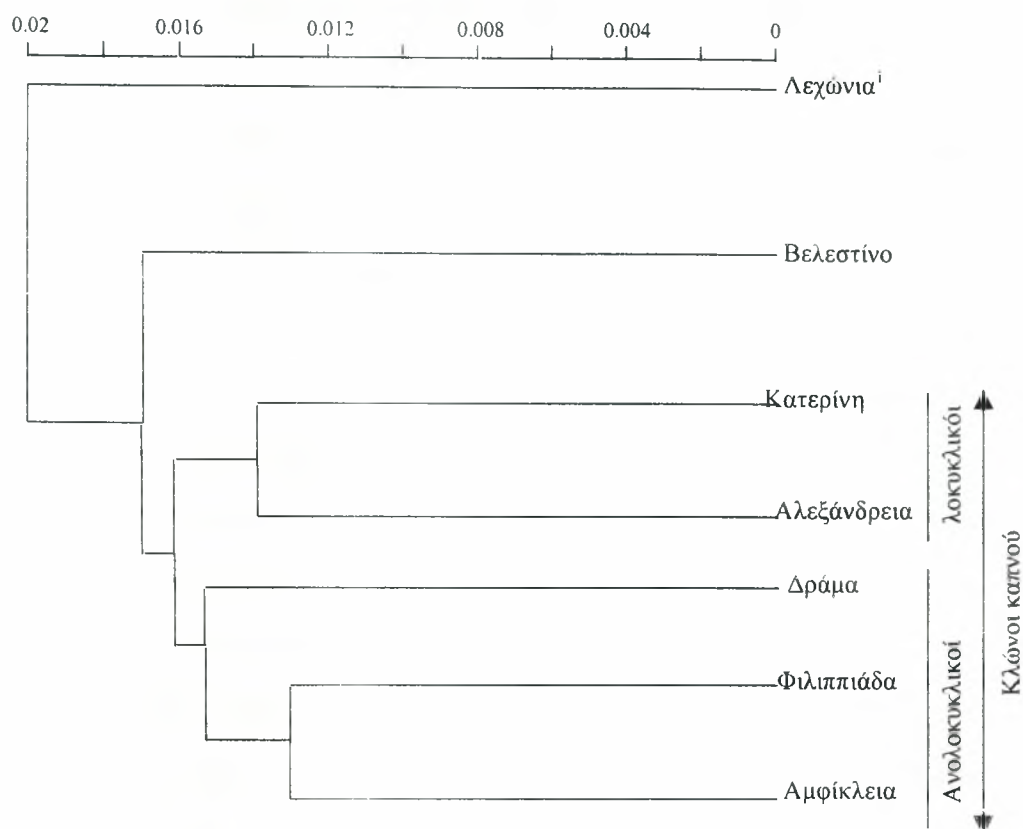
Πίνακας 4. Η γενετική απόσταση του Nei για επτά πληθυσμούς του *M. persicae*

	Περιοχή	1	2	3	4	5	6	7
1	Λεχώνια	–	0.0433	0.0392	0.0422	0.0344	0.0401	0.0409
2	Κατερίνη	0.0433	–	0.0287	0.0383	0.0353	0.0325	0.0348
3	Αλεξάνδρεια	0.0392	0.0287	–	0.0334	0.0308	0.0283	0.0314
4	Δράμα	0.0422	0.0383	0.0334	–	0.0281	0.0320	0.0372
5	Φιλιπιάδα	0.0344	0.0353	0.0308	0.0281	–	0.0255	0.0310
6	Αμφίκλεια	0.0401	0.0325	0.0283	0.0320	0.0255	–	0.0349
7	Βελεστίνο	0.0409	0.0348	0.0314	0.0372	0.0310	0.0349	–

Η ανάλυση ομαδοποίησης (UPGMA) επιβεβαίωσε αυτή την έλλειψη συμφωνίας ανάμεσα στη γενετική παραλλακτικότητα και τη γεωγραφική θέση (Εικόνα 4). Από την άλλη πλευρά υπήρξε συμφωνία με το φυτό ξενιστή. Παρατηρήθηκε βαθμός γενετικής ομοιότητας ανάμεσα στους κλώνους οι οποίοι συλλέχθηκαν από καπνό στις περιοχές Φιλιπιάδας, Αμφίκλειας και Δράμας. Επίσης, οι κλώνοι του καπνού

από την κεντρική Μακεδονία (Κατερίνη, Αλεξάνδρεια) τοποθετήθηκαν στην ίδια ομάδα. Ωστόσο, αφίδες από τα Λεχώνια και το Βελεστίνο οι οποίες συλλέχθηκαν από ροδακινιά και πιπεριά, μακριά από περιοχές όπου καλλιεργείται καπνός, διέφεραν σαφώς από τους κλώνους που συλλέχθηκαν από φυτά καπνού. Επιπλέον, υπήρξε συσχέτιση μεταξύ της γενετικής απόστασης των πληθυσμών από καπνό και της κατηγορίας βιολογικού κύκλου των κλώνων. Οι πληθυσμοί από Κατερίνη και Αλεξάνδρεια, που ομαδοποιήθηκαν μαζί, περιείχαν υψηλό ποσοστό ολοκυκλικών κλώνων (100 και 87, αντιστοίχως) ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στους πληθυσμούς της Φιλιπιάδας, της Αμφίκλειας και της Δράμας ήταν σχετικά χαμηλό (7, 7 και 18, αντιστοίχως).

Για να ελεγχθεί η επίδραση του τρόπου αναπαραγωγής στη γενετική απόκλιση ανάμεσα στους πέντε πληθυσμούς, που συλλέχθηκαν από καπνό, εξετάστηκε ο συνολικός αριθμός των ολοκυκλικών και των μη ολοκυκλικών κλώνων καπνού και υπολογίστηκε από τα δεδομένα όλων των εκκινητών ο εκτιμώμενος βαθμός ετεροζυγωτίας για τους κλώνους με διαφορετική κατηγορία βιολογικού κύκλου. Ο βαθμός ετεροζυγωτίας ήταν σημαντικά υψηλότερος ($P < 0.05$, Wilcoxon sign rank test) στους ολοκυκλικούς κλώνους από αυτούς που ανήκουν σε διαφορετική κατηγορία βιολογικού κύκλου (Πίνακας 5).



Εικόνα 4. Το δενδρόγραμμα UPGMA βασίζεται στις γενετικές αποστάσεις του Νεί ανάμεσα στα δείγματα του *M. persicae* που συλλέχθηκαν από τρεις διαφορετικούς ξενιστές και επτά περιοχές της Ελλάδας

Πίνακας 5. Σχέση μεταξύ βιολογικού κύκλου και εκτιμώμενης ετεροζυγωτίας. N= ο αριθμός των κλώνων που αναλύθηκαν.

Κατηγορία βιολογικού κύκλου	N	Εκτιμώμενη ετεροζυγωτία
Ολοκυκλικόι	32	0.2204
Ανολοκυκλικόι	11	0.1724
Ανδροκυκλικόι	10	0.1766
Ενδιάμεσοι	6	0.1520
Ανολοκυκλικόι*	12	0.1823

* Ανολοκυκλικόι κλώνοι που δεν δοκιμάστηκαν για παραγωγή αρσενικών.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όλοι οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν απέτυχαν να αποκαλύψουν συγκεκριμένες ζώνες που θα μπορούσαν να ξεχωρίσουν τους κλώνους που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές και φυτά ξενιστές ή τους κλώνους που ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες βιολογικού κύκλου. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με προηγούμενη μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας σε κλώνους *M. persicae*, που συλλέχθηκαν από διάφορα φυτά και περιοχές της Ελλάδας (Margaritopoulos *et al.* 1998).

Ο ενδοπληθυσμιακός πολυμορφισμός βρέθηκε ότι ποικίλει σημαντικά από έναν πληθυσμό σε άλλον. Σε παρόμοιο αποτέλεσμα κατέληξε η μελέτη γενετικής παραλλακτικότητας σε πληθυσμούς της αφίδας *Aphis gosypii* Glover (Homoptera: Aphididae) (Vanlerberghe-Masutti & Chavigny, 1998) με τη μέθοδο RAPD-PCR. Ωστόσο, οι Puterka *et al.* (1993) χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο στο *Diuraphis noxia* (Mordvilko) δεν βρήκαν σημαντική ενδοπληθυσμιακή παραλλακτικότητα. Στην παρούσα μελέτη, η παρατηρούμενη παραλλακτικότητα εντός του πληθυσμού δεν συσχετίστηκε με τη γεωγραφική θέση, τα φυτά ξενιστές ή την κατηγορία βιολογικού κύκλου. Η γενετική απόσταση (D) του Nei (1972), που παρέχει μια εκτίμηση του μέσου αριθμού των μεταλλάξεων διαχωρίζοντας το γένωμα των δύο πληθυσμών ανέδειξε γενετική παραλλακτικότητα ανάμεσα στους πληθυσμούς που εξετάστηκαν. Το πιο εντυπωσιακό αποτέλεσμα ήταν η συσχέτιση ανάμεσα στο φυτό ξενιστή, στην κατηγορία του βιολογικού κύκλου και στη γενετική απόκλιση ανεξάρτητα από την περιοχή προέλευσης. Η ανάλυση ομαδοποίησης διαχώρισε τους κλώνους που συλλέχθηκαν σε περιοχές όπου δεν καλλιεργείται καπνός, ειδικά αυτούς από ροδακινιά (περιοχή Λεχώνια). Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από το

γεγονός ότι οι προηγούμενοι κλώνοι ανήκουν στη φυλή που δεν αποικίζει τον καπνό. Μια προηγούμενη εφαρμογή της μεθόδου RAPD (Margaritopoulos *et al.* 1998) και ειδικά μορφομετρικές μελέτες (Margaritopoulos *et al.* 2000) σε διάφορους κλώνους από τις προηγούμενες περιοχές, διαχώρισε (με διαφορετικό επίπεδο αξιοπιστίας) τους κλώνους που τρέφονται σε καπνό, από αυτούς που συλλέχθηκαν σε άλλους ξενιστές ανεξάρτητα από τις περιοχές των δειγμάτων, το χρώμα και το βιολογικό κύκλο. Σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης οι Clements *et al.* (2000) σε πληθυσμούς *M. persicae* δεν βρήκαν γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των πληθυσμών που προέρχονται από καπνό και αυτών που προέρχονται από άλλους ξενιστές. Είναι πιθανό η διαφορά, που παρατηρήθηκε ανάμεσα στην παρούσα μελέτη και στα αποτελέσματα των Clements *et al.* (2000) να οφείλεται στο γεγονός ότι τα αποτελέσματά τους προέρχονται από δύο μόνο τυχαίους εκκινητές ή οι πληθυσμοί είναι διαφορετικοί από αυτούς της Ν. Ευρώπης.

Η φυλή του καπνού απαντάται σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας. Γεωγραφικά απομακρυσμένοι πληθυσμοί από περιοχές της κεντρικής, νότιας και βόρειας Ελλάδας εμφανίζουν γενετική ομοιότητα. Αυτό υποδηλώνει μια πιθανή διασπορά ορισμένων ανολοκυκλικών γενοτύπων μεταξύ των περιοχών δειγματοληψίας, καθώς οι αφίδες έχουν υψηλή μεταναστευτική ικανότητα (Loxdale *et al.* 1993). Εν τούτοις, παρά την έλλειψη της γεωγραφικής συμφωνίας, υπήρχε συσχέτιση της γενετικής απόκλισης μεταξύ των πληθυσμών και του τρόπου αναπαραγωγής. Οι πληθυσμοί με υψηλό ποσοστό ολοκυκλικών κλώνων έδειξαν γενετική απόκλιση από τους πληθυσμούς με χαμηλό ποσοστό. Φαίνεται επομένως, ότι ο τρόπος αναπαραγωγής είναι ένας σημαντικός παράγοντας πρόκλησης γενετικής παραλλακτικότητας μεταξύ των πληθυσμών του *M. persicae* στην Ελλάδα. Επιπλέον, το γεγονός ότι ολοκυκλικοί και ανολοκυκλικοί πληθυσμοί ακολουθούν διαφορετική κατανομή στην

Ελλάδα (Μαργαριτόπουλος 2000 διδακτορική διατριβή) θα μπορούσε να έχει σημαντική επίπτωση στη δομή των πληθυσμών του είδους.

Η διαφορετική γενετική δομή των ολοκυκλικών και ανολοκυκλικών πληθυσμών έχει επίσης αναφερθεί σε άλλα είδη αφίδων όπως είναι το *Rhopalosiphum padi* L. (Homoptera: Aphididae). Οι Martinez-Torres *et al.* (1997) χρησιμοποιώντας μιτοχονδριακούς δείκτες DNA βρήκαν τέσσερις απλότυπους, από τους οποίους οι δύο σχετίζονται με τον ολοκυκλικό βιολογικό κύκλο. Οι Simon *et al.* (1996), σε μελέτη παραλλακτικότητας αλλοενζύμων σε εαρινούς και θερινούς πληθυσμούς του *R. padi* βρήκαν ότι οι ολοκυκλικοί πληθυσμοί εμφανίζουν υψηλότερο βαθμό ετεροζυγωτίας από τους ανολοκυκλικούς. Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συμφωνούν με αυτά που αναφέρονται για το *R. padi*, καθώς βρέθηκαν διαφορές στο βαθμό της εκτιμώμενης ετεροζυγωτίας ανάμεσα σε κλώνους που ανήκουν σε διαφορετική κατηγορία βιολογικού κύκλου. Οι ολοκυκλικοί κλώνοι του καπνού έχουν υψηλότερα επίπεδα εκτιμώμενης ετεροζυγωτίας από τους αντίστοιχους μη ολοκυκλικούς, πιθανόν λόγω της ανταλλαγής γενετικού υλικού. Αξίζει να αναφερθούμε στους περιορισμούς της μεθόδου RAPD-PCR όσον αφορά τον υπολογισμό της ετεροζυγωτίας. Η ετεροζυγωτία που εκτιμάται με τη μέθοδο της RAPD-PCR είναι λιγότερο ακριβής από αυτήν που υπολογίζουμε χρησιμοποιώντας άλλους δείκτες, όπως είναι τα αλλοένζυμα, τα RFLPs και το μικροδορυφορικό DNA (Hadrys *et al.* 1992, Black 1993, Lynch & Milligan 1994).

Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν, ότι το *M. nicotianae* δεν πρέπει να θεωρείται διαφορετικό είδος από το *M. persicae*. Ωστόσο, οι αφίδες που αποικίζουν τον καπνό αποτελούν ξεχωριστή φυλή προσαρμοσμένη στο συγκεκριμένο ξενιστή. Επίσης η παρούσα μελέτη επιβεβαιώνει την αξία της μεθόδου RAPD-PCR ως ένα συμπληρωματικό εργαλείο σε άλλες μεθόδους όπως: παραλλακτικότητα αλλοενζύμων,

χαρακτηριστικά βιολογικού κύκλου, προτίμηση φυτού-ξενιστή κ.α., για την επίλυση ταξινομικών προβλημάτων στις αφίδες. Η μέθοδος έχει το πλεονέκτημα ότι χρειάζεται πολύ μικρές ποσότητες DNA και δίνει καλά αποτελέσματα σε οργανισμούς που συντηρούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα. Επιπλέον, για την εφαρμογή της δεν είναι απαραίτητη η γνώση της αλληλουχίας του DNA του υπό εξέταση οργανισμού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συντηρημένο υλικό.

Παρόλο που η παρούσα μελέτη έχει αποκαλύψει νέες αντιλήψεις για την οικολογία του *M. persicae* (π.χ. μετανάστευση, γενετική απόκλιση της φυλής του καπνού) στην Ελλάδα, η ανάπτυξη άλλων μοριακών δεικτών (π.χ. μιτοχονδριακό και μικροδορυφορικό DNA) είναι απαραίτητη για την απόκτηση μεγαλύτερης γνώσης στη δομή των πληθυσμών του σημαντικού εχθρού.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Banks, C. J. (1962) Effects of the ant *Lasius niger* (L.) on insects preying on small populations of *Aphis fabae* Scop. on bean plants. *Annals of Applied Biology* **50**: 669-679.
- Black, W. C. IV, N. M. Du Teau, G. J. Puterka, J. R. Nechols & J. M. Pettorini, 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids. *Bulletin of Entomological Research* **82**: 151-159
- Black, W. C., 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molecular Biology* **2**: 1-6
- Blackman, R. L., 1971. Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Bulletin of Entomological Research* **60**: 533-546.
- Blackman, R. L., 1972. The inheritance of life-cycle differences in *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* **62**: 281-294.
- Blackman, R. L., 1987. Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Hemiptera Aphididae), and a key to New World *Myzus* (*Nectarosiphon*) species. *Bulletin of Entomological Research* **77**:713-730.
- Blackman R. L. & V. F. Eastop, 1984. Aphids of the World's Crops: An Identification and Information Guide. London, John Wiley Sons Publications
- Blackman R. L., S. E. Halbert & T. W. Carroll, 1990. Association between karyotype and host plant in corn leaf aphid (Homoptera Aphididae) in the Northwestern United States. *Environmental Entomology* **19**: 609-611.

- Blackman, R. L. & J. M. Spence, 1992. Electrophoretic distinction between the peach-potato aphid, *Myzus persicae* and the tobacco aphid *Myzus nicotianae* (Homoptera: Aphididae) *Bulletin of Entomological Research* **82**: 161-165.
- Brun A.A., K. Crabtree, M. J. Dallwitz, A. J. Gibbs and L. Watson, 1996. Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database. Cab International.
- Caillaud, M. C. 1999. Behavioural correlates of genetic divergence due to host specialization in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **91**: 227-232
- Cenis, J. L., P. Perez & A. Fereres, 1993. Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by Random Amplified Polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society of America* **86**: 545-550.
- Clements, K. M., C. E. Sorenson, B. M. Wiegmann, P. A. Nesse & R. M. Roe, 2000. Genetic, biochemical, and behavioral uniformity among populations of *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **95**:269-281.
- Dixon, A. F. G.1998. Aphid Ecology. Second Edition. Chapman and Hall, London, U.K., 300pp.
- Erlich, H. E., 1992. PCR Tecnology: Principle and Applications for DNA Amplification. W. H. Freeman and Company.
- Erlich, H. E., R. A. Gibbs and H. H. Kazazian, 1989. Polymerase Chain Reaction. Gold Spring Harbor Laboratory
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP: (phylogeny inference package) Version 3.5c University of Washington, Seattle, Washington.
- Guldemon, J.A., W.T. Tigges & P. W F.Vrijer, 1994. Host Races of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) on Cucumber and Chrysanthemum. *Enviromental Entomology* **23**: 1235-1240.

- Hadrys, H., M. Balick & B. Scriverwater, 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* **1**: 55-63.
- Innis, M. A., D. H. Gelfand, J. J. Snihsky, T. J. White, 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications. Academic press Inc.
- Katis, N., A. Chryssohoou and R. Woods, 1993. Tobacco viruses in Greece. Coresta Congress, Spain, Abstract volume, p. 159.
- Kennedy, J.S., M.F. Day, and V. F. Eastop. 1962. A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. Commonwealth Institute of Entomology, London, 114pp.
- Loxdale, H. D., J. Hardie, S. Halbert, R. Footitt, N. A. C. Kidd & C. I. Carter, 1993. The relative importance of short- and long-range movement of flying aphids. *Biological Review* **68**: 291-311.
- Lynch, M. & B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* **3**:91-99.
- Μαργαριτόπουλος, Ι.Τ., Θ. Ε. Κεφαλογιάννη και Ι. Α. Τσιτσιπής, 1997. Μελέτη της βιολογίας κλώνων του συμπλόκου *Myzus persicae* (Sulzer) που συλλέχθηκαν από διαφορετικούς ξενιστές και διαφορετικές περιοχές της Ελλάδας. Πρακτικά 7^{ου} Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου, σελ 191, Καβάλα, 21-24 Οκτωβρίου.
- Margaritopoulos, J. T., Z. Mamuris & J. A. Tsitsipis, 1998. Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Homoptera Aphididae) by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique. *Annals of the Entomological Society of America* **91**: 602-607.
- Μαργαριτόπουλος, Ι. Τ., Δ. Πουπουλίδου, Σ. Γουντουδάκη και Ι. Α. Τσιτσιπής. 1999. Στρατηγικές διαχείμασης της αφίδας *Myzus persicae*: Ο ρόλος των ανδροκυκλικών και ενδιάμεσων γενοτύπων.

Περίληψεις Πρακτικών 8^{ου} Πανελληνίου Εντομολογικού Συνεδρίου, σελ 12, Χαλκίδα, 2-5 Νοεμβρίου.

- Margaritopoulos, J. T., J. A. Tsitsipis, E. Zintzaras & R. L. Blackman, 2000. Host-corelated morphological variation of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) populations in Greece. *Bulletin of Entomological Research* **12**: 233-244.
- Μαργαριτόπουλος, Ι. Τ. 2001. Μελέτη της βιολογίας πληθυσμών του συμπλόκου είδους *Myzus persicae*. Διδακτορική διατριβή.
- Martinez. D., A. Moya, A. Latorre & A. Fereres, 1992. Mitochondrial DNA variation in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) populations from four Spanish localities. *Annals of the Entomological Society of America* **85**: 241-246.
- Martinez-Torres, D., R. Carris, a. Latorre, J. C. Simon, A. Hermoso & A. Moya 1997. Assessing the nucleotide diversity of three aphid species by RAPD. *Journal of Evolutionary Biology* **10**: 459-477.
- Miyazaki, M. 1987. Morphology of Aphids. In: A K. Minks and P. Harrewijn [eds.], *Aphids Their Biology, Natural Enemies and Control*, Volume 2 A, pp 1-25. Elsevier, Amsterdam.
- Mullis, K. B., F. A. Faloon 1987. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*. **155**:335-350.
- Nicol, D., K. F. Armstrong, S. D. Wratten, C. M., Cameron, C. Frampton & B. Fenton, 1997. Genetic Variation in an introduced aphid pest (*Metopolophium dirhodum*) in New Zealand and relation to individuals from Europe. *Molecular Ecology* **6**: 255-265.
- Nicol, D., K. F. Armstrong, S. D. Wratten, P. J. Walsh, N. A. Straw, C. M. Cameron, C. Lahman & C. M. Frampton, 1998. Genetic diversity of an introduced pest, the green spruce aphid *Elatobium abietinum*

- (Hemiptera, Aphididae) in New Zealand and the United Kingdom. *Bulletin of Entomological Research* **88**: 537-543.
- Powers, T. O., S. G. Jensen, S. D. Kindler, C. J. Stryker & L. J. Sandall, 1989. Mitochondrial DNA divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Annals of the Entomological Society of America* **82**: 298-302.
- Puterka, G. Z., W. C. IV Black, W. M. Steiner & R. L. Burton, 1993 Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* **70**: 604-618.
- Remaudière, G. and H.L.G. Stroyan. 1984. Un *Tamalia* nouveau de Californie (USA). Discussion sur le Tamaliinae subfm. Nov. (Hom. Aphididae). *Annales de la Société Entomologique de la France* (Nouvelle Serie) **20**:93-103.
- Remaudière, G. and M. Ramaudière 1997. Catalogue of the World's Aphididae (Homoptera Aphidoidea). INRA, Paris, pp.127.
- Rinvay, E. 1962. Field Crop Pests in The Near East. W. Junk, Den Haag, 450 pp.
- Simon, J. C., E. Carrel, P/ D. N. Hebert, C. A. Dedryver, J. Bonhomme & J. F. Le Gallic, 1996. Genetic diversity and mode of reproduction in French populations of the *Rhopalosiphum padi* L. *Heredity* **76**: 305-313.
- Sneath P. H. A. & R. R. Sokal, 1973. Numerical Taxonomy. W. H. Freeman and Co, San Fransisco.
- Sunnucks P., Driver F. Brown W. V., Carver M., Halew D.F., & Milne W. M. 1997. Biological and genetic characterization of Morphologically similar *Therioaphis trifolii* (Hemiptera Aphididae) with different host utilization. *Bulletin of Entomological Research* **87**: 425-436.

- Τζανακάκης Μ. Ε. 1980. Μαθήματα Εφαρμοσμένης Εντομολογίας 2. Ειδικό μέρος. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο, Θεσσαλονίκη.
- van Emden, H. F., V. F. Eastop, R. D. Hughes & M. J. Way, 1969. The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Review of Entomology*, **14**: 197-270.
- Vanlerberghe-Masutti, F. & P. Chavigny, 1998. Host based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprints. *Molecular Ecology* **7**:905-914.
- Weber, G. 1985. Genetic variability in host plant adaption of the green Peach ahid, *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **38**:49-56.
- Welsh, J. & M. McClland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR Arbitrary primers. *Nucleic Acids research*. **18**:7212-7218.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski & S. V. Tingey, 1991. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful genetic markers. *Nucl Acids Res* **18**:6531-6535.
- Williams, J. G .K., M .K. Hanafey, J. A. Rafalski & S. V. Tingey, 1993. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods of Enzymology* **218**:704-740.

6. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πρωτόκολλο απομόνωσης DNA

- Ομογενοποίηση σε σωλήνα erpendorf 15 αφίδων σε 200 λ extraction buffer.
- Προσθήκη 100 λ οξικού νατρίου NaOC 3M PH 5.2 και τοποθέτηση του σωλήνα στους -20° C για 10 λεπτά
- Φυγοκέντρηση του σωλήνα στις 13000 rpm στους 4° C για 5 λεπτά και μεταφορά του υπερκειμένου σε άλλο σωλήνα erpendorf
- Προσθήκη 1 ml φαινόλης και φυγοκέντρηση για 20 λεπτά στις 13000 rpm και στους 4° C (Ανάδευση).
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο περιέκτη, προσθήκη 1 ml φαινόλης-χλωροφόρμιο ισοαμυλικής αλκοόλης (25:24:1) και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm (4° C) για 5 λεπτά (Ανάδευση).
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο περιέκτη, προσθήκη 1ml χλωροφόρμιο ισοαμυλικής αλκοόλης και φυγοκέντρηση στις 13000 rpm (4° C) για 5 λεπτά (Ανάδευση).
- Μεταφορά του υπερκειμένου σε νέο περιέκτη, προσθήκη παγωμένης αιθανόλης και τοποθέτηση στους -20° C για μια ημέρα.
- Φυγοκέντρηση του ιζήματος DNA για 20 λεπτά., απομάκρυνση της αλκοόλης και ξέπλυνση με 70% αιθανόλη (φυγοκέντρηση σε 7500 rpm για 5 λεπτά).
- Στέγνωμα στους 37° C για 5-10 λεπτά και προσθήκη 100 μ l ddH₂O

Extraction buffer (100 ml)

Διάλυμα	10 ml	20 ml	50 ml	100 ml
SDS 10% (ml)	0.5	1	2.5	5
NaCl (gr)	1.169	2.34	5.845	11.69
EDTA 0.5M (ML)	0.5	1	2.5	5
Tris-HCl 2M PH 8.5 (gr)	1	2	5	10
H ₂ O	8	16	40	80

EDTA 0.5 M PH 8.0

Διάλυμα	50 ml	100 ml	800 ml
EDTA (gr)	11.63	23,26	186,1
NaOH (gr)	1,25+	2,5+	20,0+
H ₂ O (ml)	50	100	800

Tris-HCl 2M PH 8.5

Διάλυμα	50 ml	100 ml	1000 ml
H ₂ O (ml)	42.5	85	850
Tris (gr)	12,11	24,22	242,2
HCl (ml)	3,25	7,5	75
H ₂ O (ml)	3,25	7,5	75

Οξικό Na (Sodium acetate NaOAc 3M PH 5.2

Διάλυμα	50ml	100ml
NaOAc (gr)	20,4	40,8
H ₂ O (ml)	45	90
H ₂ O (ml)	5+	10+

7. Abstract

Myzus persicae (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) is a cosmopolitan polyphagous species and an important pest of many crops. In addition, the species is a major vector of many economic plant viruses. The tobacco populations of *M. persicae* are considered as the most important pest of tobacco in Greece, causing direct as well as indirect damage to plants by transmitting important non-persistent viruses.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was applied on 96 clones of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) representing seven populations collected from different host-plants and regions of Greece. Ten decamer random primers were used to evaluate genetic variation among the examined samples. Despite the variability found between clones, no specific RAPD marker was detected to discriminate the different populations. A significant finding was that aphids from peach and pepper, which were collected far away from tobacco-growing regions, especially those from peach, showed genetic divergence from the tobacco-feeding clones. Moreover, data analysis revealed a significant genetic divergence between holocyclic and anholocyclic populations from tobacco. Lastly, holocyclic clones showed higher level of estimated heterozygosity than the nonholocyclic (anholocyclic, androcyclic and intermediate) ones.



Genetic variation in *Myzus persicae* populations associated with host-plant and life cycle category

Kiriaki Zitoudi¹, John T. Margaritopoulos¹, Zissis Mamuris² & John A. Tsitsipis¹

¹Laboratory of Entomology and Agricultural Zoology, Faculty of Crop and Animal Production and ²Faculty of Applied and Theoretical Sciences, University of Thessaly, Fytokou St, 38446 Nea Ionia, Magnesia, Greece;

*Author for correspondence (Tel.: +30 0421 93190; Fax: +30 0421 93586; E-mail: tsitsipi@uth.gr)

Accepted: December 7, 2000

Key words: *Myzus persicae*, RAPD-PCR, life cycle category, Greece, Homoptera, Aphididae

Abstract

Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis was applied on 96 clones of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) representing seven populations collected from different host-plants and regions of Greece. Ten decamer random primers were used to evaluate genetic variation among the examined samples. Despite the variability found between clones, no specific RAPD marker was detected to discriminate the different populations. A significant finding was that aphids from peach and pepper, which were collected far away from tobacco-growing regions, especially those from peach, showed genetic divergence from the tobacco-feeding clones. Moreover, data analysis revealed a significant genetic divergence between holocyclic and anholocyclic populations from tobacco. Lastly, holocyclic clones showed higher level of estimated heterozygosity than the nonholocyclic (anholocyclic, androcyclic and intermediate) ones.

Introduction

Myzus persicae (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) is a cosmopolitan polyphagous species (Tatchell et al., 1983) and an important pest of many crops. In addition, the species is a major vector of many economic plant viruses (Blackman & Eastop, 1984). The tobacco populations of *M. persicae* are considered as the most important pest of tobacco in Greece, causing direct as well as indirect damage to the plants by transmitting important non-persistent viruses (Katis et al., 1993). An important feature of the biology of this aphid is host alternation; in autumn, when daylength decreases below a critical level, apterous viviparae of holocyclic clones produce gynoparae and males on secondary hosts, which migrate to the principal primary host (*Prunus persica* L.) where the gynoparae give birth to oviparae. The oviparae mate with the males and lay the overwintering eggs (van Emden et al., 1969). During the course of aphid evolution, some *M. persicae* populations have partially or completely lost the ability of sexual reproduction. Three other life cycle categories,

except holocyclic ones, have been described in relation to the photoperiodic response, i.e., anholocyclic, androcyclic, and intermediate. Anholocyclic clones are unable to produce any sexual morphs and overwinter as parthenogenetic morphs on weeds or winter crops. Other genotypes are able to invest in both reproductive and overwintering strategies. Under short day conditions androcyclic clones produce parthenogenetic morphs and males, which mate with oviparous females of holocyclic clones. The intermediate ones produce many apterous and alate virginoparae, some males and alate females under long nights, which give birth to both virginoparae and oviparae (Blackman, 1971, 1972).

Another feature of the biology of *M. persicae* is adaptation to specific host-plants. A noticeable example are the populations feeding on tobacco, which can be distinguished from those originating from other hosts by differences in morphology or allozymes (Blackman, 1987; Blackman & Spence, 1992). It has also been found that both groups can maintain their host-related differences in regions where holocyclic

populations coexist and spend the sexual phase on peach (Blackman & Spence, 1992; Margaritopoulos et al., 1998).

Allozyme studies in *M. persicae* failed to reveal any detectable enzyme variation between populations, except for esterases and glutamate oxaloacetate transaminase (Brookes & Loxdale, 1987; Blackman & Spence, 1992). However, molecular genetic approaches based on DNA analysis (mitochondrial and microsatellite DNA and random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction, RAPD-PCR) have revealed either qualitative or quantitative differences in the genetic structure of aphid populations (Powers et al., 1989; Martinez et al., 1992; Black et al., 1992; Cenis et al., 1993; Martinez-Torres et al., 1997; Nicol et al., 1997, 1998).

In a previous study (Margaritopoulos et al., 1998), the genetic variation between clones of *M. persicae*, originating from tobacco and other host plants from different regions of Greece, was studied using RAPD-PCR. All 64 random primers tested, failed to reveal any consistent difference in banding pattern between the two groups. Only one primer produced a polymorphism significantly associated with host plant (Margaritopoulos et al., 1998). In the present study, the RAPD method has been applied to samples of *M. persicae* clones with well-characterized life cycles, originating from different host plants and regions of Greece, the aim being to examine intraspecific genome diversity in relation to aphid biology and host-plant. In addition, another objective was to analyse the influence of the mode of reproduction on genetic diversity and population structure.

Materials and methods

A total of 96 asexual lineages of *M. persicae* were examined, 15 collected from peach (*Prunus persica* L.) trees, 10 from pepper (*Capsicum annuum* L.), and 71 from tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Those from pepper and peach originated from non-tobacco growing areas, whilst those from tobacco were collected near main peach-growing areas (Alexandria and Katerini) and from regions where peach orchards are uncommon (Figure 1, Table 1). A field of about one ha. was sampled from each region. One sample was collected per plant and consisted of 1–3 aphid-infested leaves. In annual crops, plants were sampled every 4–5 rows and at least every 5 m per row. With peach, samples were taken every 3–4 trees per row. Each sam-



Figure 1. Collection sites of the clones of *M. persicae* in Greece. Clones from Lehonía and Velesino were collected from peach and pepper, respectively. All other clones originated from tobacco.

ple was put in self-sealing plastic bags, which were slightly inflated and contained a piece of paper towel to reduce condensation. Bags were placed in isolated plastic containers containing ice packs and transferred to the lab. Asexual lineages were established from a single apterous adult virginopara. The colour of each apterous mother was recorded (Table 1). All lineages were kept on potato (*Solanum tuberosum* L.) leaves in plastic Blackman boxes (7.7 cm × 4.5 cm × 2 cm) (Blackman, 1971) in a growth chamber at 17 °C and a photoperiod of 16 h per day. Fifteen apterous adult virginoparae from each lineage were stored in eppendorf tubes at –25 °C until analysis.

To determine life categories, lineages were reared for three consecutive generations under a short day regime [SD (L10:D14)] at 17 °C. A single apterous adult female from a clonal colony kept under long day conditions (L16:D8) was transferred to SD in a Blackman box. About five apterous virginoparae of the first SD generation were selected and the morph of their first 60–80 progenies (second generation)

Table 1. Greek clones of *M. persicae* collected from seven different regions and three hosts in 1997 used in study. H: holocyclic clones, An: anholocyclic, Ad: androcyclic, A: anholocyclic clones not tested for male production, I: intermediate

Region	Host	No. of clones examined	Red clones					Green clones					Holocyclic clones
			H	An	Ad	A	I	H	An	Ad	AI	%	
Katerini	tobacco	15	2					13					100
Alexandria	tobacco	15	2					11				1	87
Drama	tobacco	11 ^a	1	4		2	1	1				1	18
Filippiada	tobacco	15	1	3	5	4	2						7
Amphiklia	tobacco	15		3	4	5		1	1	1			7
Lehonia	peach	15						11			4		73
Velesino	pepper	10						6	1	3			60

^aFive clones were collected in 1998.

were determined. Holocyclic clones are characterised by production of gynoparae (oviparae producers) and males in the second generation, anholocyclic ones by production of apterous and alate virginoparous females only. However, some clones were found to produce mainly apterous and alate virginoparae, some males and alatae, which gave birth to both apterous virginoparae and oviparae and were characterised as 'intermediates'. In another set of experiments, the ability of some anholocyclic clones to produce males (androcyclic category) was examined. Whereas in androcyclic clones, only some apterous virginoparae produced males after a number of females were born (Blackman 1971, 1972), 9-12 apterous virginoparae of the first SD generation were selected and the morph of all progenies produced was examined. In androcyclic clones, a number of males were produced in the second generation. Information on life cycle category of each clone can be found in Table 1.

Aphid DNA was extracted according to a modified method of Cenis et al. (1993). In an Eppendorf tube, 15 individuals of each clone were crushed in 200 μ l of extraction buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.5, 200 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH = 8, and 0.5% SDS). An aliquot (100 μ l) of 3M sodium acetate, pH 5.2, was added and the tube placed at -20°C for 10 min. Tubes were then centrifuged at 13 800 g for 5 min and the supernatant transferred to another tube. DNA was purified by successive extraction with phenol, phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1; v:v:v), and chloroform:isoamyl alcohol (24:1; v:v) respectively, and precipitated with ice-cold absolute ethanol overnight at -20°C . The precipitated DNA was pelleted by centrifugation at 13 800 g for 20 min, and after washing with 70% ethanol, was vacuum

Table 2. Sequence of the ten RAPD decamer primers used in this study

Primer name	Sequence (5' to 3')
OPA 03*	AGTCAGCCAC
OPA 05	AGGGGTCTTG
OPA 08	GTGACGTAGG
OPA 09	GGGTAACGCC
OPA 10	GTGATCGCAG
OPA 13	CAGCACCCAC
OPA 15	TTCCGAACCC
OPA 19	CAAACGTCGG
OPA 20	GTTGCGATCC
ECO**	ATGAATTCGC

*Operon Technologies (Alameda, CA, USA) **Designed by DuTeau (Black et al., 1992) and synthesised in the Laboratory of Biology-Genetics, Medical School, University of Thessaly, Larisa, Greece.

dried and resuspended in 100 μ l TE buffer (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8).

Ten decamer primers were used in the study. Nine of them (OPA 03, OPA 05, OPA 08, OPA 09, OPA 10, OPA 13, OPA 15, OPA 19, and OPA 20) were purchased from Operon Technologies (Alameda, CA, USA) and one (ECO: 5'-ATGAATTCGC-3' designed by DuTeau (Black et al., 1992)) was synthesized in the Laboratory of Biology-Genetics, Medical School, University of Thessaly, Larisa, Greece (Table 2). PCR reactions were performed using the same thermocycler in 25 μ l of reaction mixture containing 30 ng of template DNA, 1 unit of Taq polymerase (Minotech, Heraklio, Greece), 0.25 mM dNTPs, 20 ng of each primer, 2.5 mM MgCl₂, and 1 \times reaction buffer

(500 mM KCl, 100 mM Tris HCl, pH 9) supplied by the enzyme manufacturer. Amplification conditions involved a total of 35 cycles of 40 s. at 94 °C, 1 min at 38 °C, and 1 min at 72 °C, using the fastest available transitions between each temperature and followed by a 4 °C soak until electrophoresis.

A 10- μ l aliquot of each PCR product was separated on a 2% agarose gel containing 0.5 μ l ml⁻¹ ethidium bromide in TAE buffer (40 mM Tris/acetate, 1 mM EDTA, pH 8). DNA bands were visualized under UV light. The molecular weight of each band was estimated by comparison to a co-migrating 100-bp ladder. To avoid problems related to variation in the number and intensity of amplification products (Hadrys et al., 1992; Black, 1993; Williams et al., 1993), band mobility comparisons were made only within gels and based on the same PCR reaction. Each PCR reaction from the same DNA extraction was replicated twice to check for reproducibility of the RAPD patterns produced. Any weak DNA patterns generated due to unsatisfactory amplification, were excluded from the analysis.

Statistical analysis of RAPD data was based on the method proposed by Lynch & Milligan (1994). The frequency of each allele within each population was estimated under the assumption that variation in banding patterns represents allelic segregation at independent loci. Each locus was treated as a two-allelic system corresponding to the presence or absence of the amplified band, where 'null' allele may fail to amplify either because of loss of primer site or because an insertion has caused the distance between primer sites to exceed the capacity of the PCR (Lynch & Milligan, 1994). Under these assumptions an asymptotically unbiased estimator of the null allele frequency is $\hat{q} = \hat{x}^{1/2}(1 - (\text{Var}(\hat{x})/8\hat{x}^2))^{-1}$, where \hat{x} is the proportion of N sampled individuals that do not exhibit the marker and $\text{Var}(\hat{x}) = \hat{x}(1 - \hat{x})/N$. Nei's pairwise genetic distances (Nei, 1972) between populations for the combined data from all the studied primers and heterozygosity between lineages were estimated according to the method proposed by Lynch & Milligan (1994). Genetic distances obtained using all primers were used to estimate genetic relationships between the populations by means of the unweighted pair-group method of analysis (UPGMA) (Sneath & Sokal, 1973). A dendrogram was then constructed using the PHYLIP 3.5 computer package (Felsenstein, 1993).

Whole specimens of several of the clones used and analysed by PCR, are also kept in the Lab of Entomology and Agricultural Zoology of the University

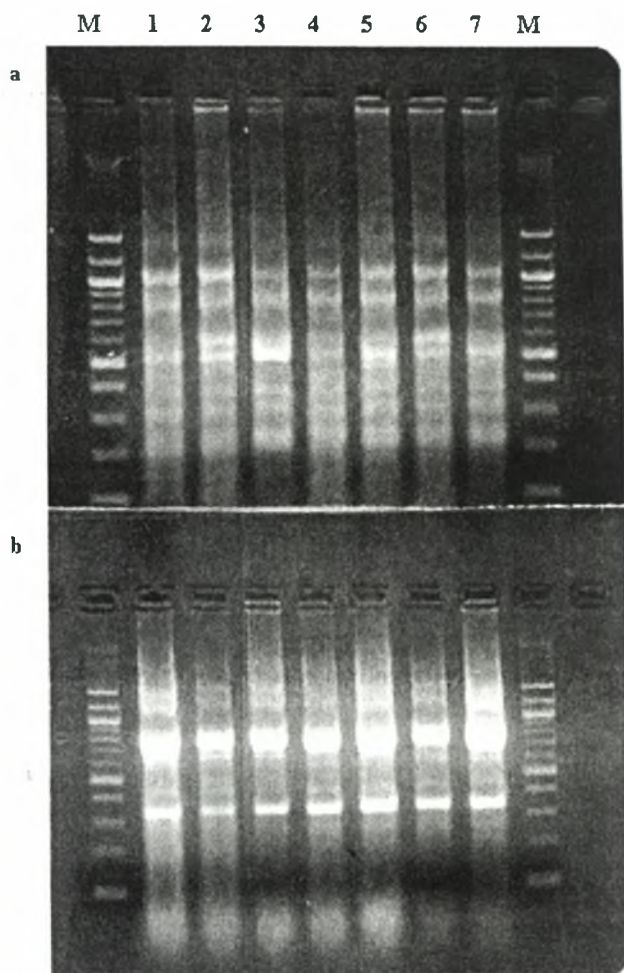


Figure 2. Banding pattern produced by RAPD-PCR in different clones of *M. persicae* using the OPA-09 (a) and OPA-10 (b) primers. Lane M, DNA marker (Promega, USA); sizes 100 to 1500 base pairs. Clones collected from 1: Katerini, 2: Velestino, 3: Lehonía, 4: Alexandria, 5: Drama, 6: Amphiklia, and 7: Filippiada

of Thessaly for further study with different molecular methods.

Results

All the primers used in the analysis gave satisfactory amplification products with all clones tested, with the exception of two primers with two clones deriving from pepper and one primer with one clone collected from tobacco. The number of clones analysed per population and per primer varied between nine and 15 (Table 3). Bands that were reproduced after at least two replications, regardless of their intensity, were considered reliable. RAPD profiles produced by the OPA-09 and OPA-10 primers, are illustrated in Figure 2. Bands analysed per primer ranged from 10–13

Table 3. Number of clones (*N*), RAPD bands (*n*) analysed per *M. persicae* population, number (*m*), and average proportion (*P*) of monomorphic bands found per primer in each population

Primer	<i>n</i>	Lehonia		Velestino		Katerini		Alexandria		Drama		Filippiada		Amphiklita	
		<i>N</i>	<i>m</i>	<i>N</i>	<i>m</i>	<i>N</i>	<i>m</i>	<i>N</i>	<i>m</i>	<i>N</i>	<i>m</i>	<i>N</i>	<i>m</i>	<i>N</i>	<i>m</i>
OPA 3	13	15	7	10	10	15	8	15	9	11	6	15	8	15	7
OPA 5	13	15	8	10	9	15	8	15	8	11	8	15	8	15	8
OPA 8	11	15	3	10	3	15	1	15	1	11	1	15	3	15	3
OPA 15	13	15	6	9	5	15	5	15	5	10	7	15	6	15	7
OPA 19	12	15	4	10	5	15	4	15	5	11	7	15	5	15	5
OPA 20	10	15	4	9	6	15	5	15	5	11	6	15	7	15	5
OPA 9	10	15	9	10	10	15	7	15	10	11	10	15	7	15	6
OPA 10	12	15	5	10	6	15	8	15	6	11	7	15	6	15	7
OPA 13	11	15	4	10	8	15	9	15	9	11	7	15	9	15	8
ECO	11	15	4	10	5	15	4	15	3	11	7	15	6	15	4
P		0.465		0.578		0.509		0.526		0.569		0.560		0.517	

Table 4. Matrix of Nei's genetic distances for seven *Myzus persicae* populations

Region	1	2	3	4	5	6	7
1 Lehonía	–	0.0433	0.0392	0.0422	0.0344	0.0401	0.0409
2 Katerini	0.0433	–	0.0287	0.0383	0.0353	0.0325	0.0348
3 Alexandria	0.0392	0.0287	–	0.0334	0.0308	0.0283	0.0314
4 Drama	0.0422	0.0383	0.0334	–	0.0281	0.0320	0.0372
5 Filippiada	0.0344	0.0353	0.0308	0.0281	–	0.0255	0.0310
6 Amphiklia	0.0401	0.0325	0.0283	0.0320	0.0255	–	0.0349
7 Velestino	0.0409	0.0348	0.0314	0.0372	0.0310	0.0349	–

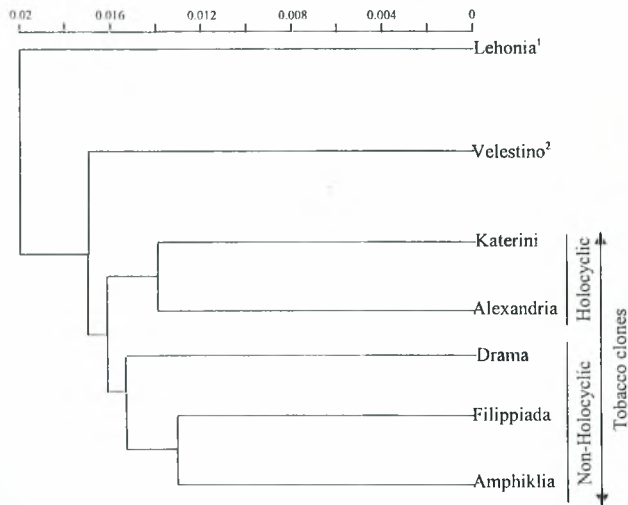


Figure 3. UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distances between samples of *M. persicae* collected from three different host-plants and seven regions of Greece. Clones collected from ¹peach and ²pepper away from tobacco-growing regions.

(Table 3) and all primers together yielded 116 reproducible bands, ascribed to 'loci'. The size of the bands ranged from 200 to 2100 bp. None of the primers produced any diagnostic band or specific RAPD pattern that could differentiate the *M. persicae* populations. To reveal the relative genetic affinities among the seven aphid populations examined, allele frequencies were estimated for the 116 loci. Monomorphic bands, constantly present in all clones within a population, varied between primers in all populations from 9.0% to 100%. Intrapopulation polymorphism varied considerably from one primer to another and from one population to another (Table 3). For instance, the populations from Drama, Alexandria, and Velestino were completely monomorphic for the primer OPA 09, while only one out of the 11 loci produced with primer OPA 08 was monomorphic in the populations from Alexandria and Drama. In addition, monomor-

Table 5. Relation between life cycle category and estimated heterozygosity with N = number of clones analysed

Life cycle category	N	Estimated heterozygosity
Holocyclic	32	0.2204
Anholocyclic	11	0.1724
Androcyclic	10	0.1766
Intermediate	6	0.1520
Anholocyclic*	12	0.1823

*Anholocyclic clones not tested for male production.

phic loci for combined data from all primers tested varied among the seven populations from 46.5% in Lehonía to 57.8% in Velestino (Table 3).

Nei's pairwise genetic distances (D) calculated for clones originating from different regions ranged from $D = 0.0255$ (Amphiklia-Filippiada) to $D = 0.0433$ (Lehonía-Katerini) with an average of $D = 0.0344$ (Table 4). The degree of divergence between populations was variable but independent of geographical location, since comparison between matrices of genetic and geographical distances showed no significant correlation (Mantel T test; $R = 0.0168$, $T = 0.052$, $P < 0.521$).

Phylogenetic reconstruction (UPGMA) confirmed this lack of concordance between genetic and geographical pattern (Figure 2). On the other hand, there was concordance with host plant. Genetic similarity was observed between clones that were collected from tobacco from Filippiada, Amphiklia and Drama regions. The tobacco clones from Central Macedonia (Katerini, Alexandria) were located in the same cluster. However, aphids from Lehonía and Velestino, which were collected from peach and pepper away from tobacco-growing areas, were clearly differentiated from the clones collected from tobacco plants. In addition, there was an association between genetic

affinities among populations from tobacco and the mode of reproduction of the clones within each population (Table 1). Therefore, the populations of Katerini and Alexandria that clustered together included a high percentage of holocyclic clones (100 and 87, respectively), while the percentage within the populations from Filippiada, Amphiklia and Drama was relatively low (7, 7, and 18, respectively).

To check the impact of the mode of reproduction to the genetic divergence between the five geographical populations, which were collected from tobacco, the total number of holocyclic and non-holocyclic tobacco clones tested and the values of their estimated heterozygosity for combined data from all primers, was calculated. The estimated heterozygosity was significantly higher ($P < 0.05$, Wilcoxon sign rank test) in holocyclic clones than those in the different reproductive categories (Table 5).

Discussion

All primers tested failed to reveal specific bands enabling the discrimination either between clones from different regions or host plants, or between clones with different life-cycle categories. These results agree with those obtained in a previous study of genetic variation in Greek clones of *M. persicae* (Margaritopoulos et al., 1998), which were collected from different plants and regions, and analysed using the RAPD-PCR method and a large number of primers. In addition, the observations of the present study are consistent with the findings reported by other authors. Al-Aboodi & French-Constant (1995) found an absence of variability in RAPD markers between insecticide resistant and susceptible clones of *M. persicae* and Clements et al. (2000) reported that the RAPD polymorphisms did not separate populations on the basis of host-plant association or geographic origin.

The level of intrapopulation polymorphism found varied considerably between loci and populations. A similar result was obtained in a study of genetic variation in populations of the cotton-melon aphid, *Aphis gossypii* Glover, using RAPD markers (Vanlerberghe-Masutti & Chavigny, 1998). However, Puterka et al. (1993) using the same method to study populations of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), failed to show intrapopulation variation. In the present study, the observed intrapopulation variation pattern was not associated with geography, host-plant or life cycle characteristics. Nei's (1972)

pairwise genetic distances (D), which provide an estimate of the mean number of mutations separating the genes of two populations, suggest a substantial amount of genetic variation among the examined populations. The most striking feature was the association between host plant, life cycle category and genetic divergence regardless of the region of origin. Cluster analysis separated the clones, which were collected from peach and pepper far away from those on tobacco, especially those from peach (Lehonia region). This may be explained by the fact that the former clones are of non-tobacco origin. A previous application of the RAPD method (Margaritopoulos et al., 1998) and especially morphometric studies (Margaritopoulos et al., 2000) on several clones, originated from the same regions where samples were collected in the present study, discriminated (at different level of reliability) the tobacco-feeding form regardless of region, colour or life cycle. Contrary to our results, Clements et al. (2000) did not find a genetic divergence among *M. persicae* populations originating from tobacco and other hosts. It is possible that the discrepancy observed between our study and the results of Clements et al. (2000) is due to the fact that data were obtained from only two random primers.

The tobacco form of *M. persicae* has been dispersed to all parts of Greece. Geographically distant populations from central-south and northern regions of Greece showed genetic similarity. This result suggests the dispersal of certain anholocyclic genotypes between collecting sites, since aphids may show a high migratory capacity (Loxdale et al., 1993). However, despite the lack of geographical concordance, there was an association between genetic divergence among populations and the mode of reproduction. Populations with a high proportion of holocyclic clones were genetically divergent from those with a low proportion. It seems therefore, that the mode of reproduction is an important factor in the maintenance of genetic variation between *M. persicae* populations in Greece. Moreover, the fact that holocyclic and anholocyclic populations are differentially distributed in Greece (Margaritopoulos, Tsitsipis & Goundoudaki, unpubl.) could result in significant structuring of populations.

A differential genetic structuring of holocyclic and anholocyclic populations has also been reported in other aphids, such as the host-alternating bird cherry aphid, *Rhopalosiphum padi* L. Using mitochondrial DNA markers, Martinez-Torres et al. (1997) found two major mitochondrial lineages associated with breeding system. Simon et al. (1996), in a study

of allozyme variation in spring and summer populations of *R. padi* found, that holocyclic populations showed higher heterozygosity than anholocyclic ones. The results of our study agree with those reported for *R. padi*, since differences in estimated heterozygosity were found between clones investing in different reproductive strategies. The holocyclic clones from tobacco have higher levels of heterozygosity than their non-holocyclic counterparts, probably as a result of exchange of genetic material among populations. It is worth, however, to notice the limitations of genetic parameters such as heterozygosity based on RAPD. The RAPD method, by its nature, cannot distinguish the marker/marker homozygotes from the marker/null heterozygotes. Thus, heterozygosity estimated from RAPD data is less accurate than those obtained from codominant markers, such as allozymes, RFLPs, and microsatellites (Hadrys et al., 1992; Black, 1993; Lynch & Milligan, 1994).

Whilst this study has revealed new aspects of the *M. persicae* ecology (i.e., migration, distribution of the tobacco form) in Greece, clearly the development of other markers, e.g., mtDNA and microsatellites, is required to provide a more comprehensive understanding of the population structure, dynamics, and life cycle strategies of this important pest insect.

Acknowledgements

We thank D. Boutos and A. Chrysochou for assistance with the collection of aphids and C. Stamatis for technical assistance. This study was partially supported by the EPET II 453 grant from the General Secretariat for Research and Technology of Greece and the Commission of the European Communities, Tobacco Information and Research Fund, project 96/1/18 'Management of the insect pests and viruses using ecologically compatible technologies'. It does not necessarily reflect the views of the Commission and in no way anticipates its future policy in this area.

References

- Al-Aboodi, A. & R. H. French-Constant, 1995. RAPD PCR confirms absence of genetic variation between insecticide resistant variants of the green peach aphid, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *The Great Lakes Entomologist* 28: 127-133.
- Black, W. C. IV, N. M. DuFeau, G. J. Puterka, J. R. Nechols & J. M. Pettorini, 1992. Use of the random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction (RAPD-PCR) to detect DNA polymorphisms in aphids. *Bulletin of Entomological Research* 82: 151-159.
- Black, W. C., 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Molecular Biology* 2: 1-6.
- Blackman, R. L., 1971. Variation in the photoperiodic response within natural populations of *Myzus persicae* (Sulzer). *Bulletin of Entomological Research* 60: 533-546.
- Blackman, R. L., 1972. The inheritance of life-cycle differences in *Myzus persicae* (Sulz.) (Hem., Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 62: 281-294.
- Blackman, R. L., 1987. Morphological discrimination of a tobacco-feeding form from *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae), and a key to New World *Myzus* (*Nectarosiphon*) species. *Bulletin of Entomological Research* 77: 713-730.
- Blackman, R. L. & V. F. Eastop, 1984. *Aphids of the World's Crops: An Identification and Information Guide*. London, John Wiley Sons Publications.
- Blackman, R. L. & J. M. Spence, 1992. Electrophoretic distinction between the peach-potato aphid, *Myzus persicae* and the tobacco aphid, *Myzus nicotianae* (Homoptera: Aphididae). *Bulletin of Entomological Research* 82: 161-165.
- Brookes, C. P. & H. D. Loxdale, 1987. Survey of enzyme variation in British populations of *Myzus persicae* (Sulzer) (Homoptera: Aphididae) on crops and weed hosts. *Bulletin of Entomological Research* 77: 83-89.
- Cenis, J. L., P. Perez & A. Fereres, 1993. Identification of aphid (Homoptera: Aphididae) species and clones by Random Amplified Polymorphic DNA. *Annals of the Entomological Society of America* 86: 545-550.
- Clements, K. M., C. E. Sorenson, B. M. Wiegmann, P. A. Neese & R. M. Roe, 2000. Genetic, biochemical, and behavioral uniformity among populations of *Myzus nicotianae* and *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 95: 269-281.
- Felsenstein, J., 1993. PHYLIP: (phylogeny inference package) version 3.5c. University of Washington, Seattle, Washington.
- Hadrys, H., M. Balick & B. Scierwater, 1992. Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology* 1: 55-63.
- Katis, N., A. Chrysochou & R. Woods, 1993. Tobacco viruses in Greece. *Coresta Congress, Spain, Abstract volume*, p. 159.
- Loxdale, H. D., J. Hardie, S. Halbert, R. Footitt, N. A. C. Kidd & C. I. Carter, 1993. The relative importance of short- and long-range movement of flying aphids. *Biological Reviews* 68: 291-311.
- Lynch, M. & B. G. Milligan, 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Margaritopoulos, J. T., Z. Mamuris & J. A. Tsitsipis, 1998. Attempted discrimination of *Myzus persicae* and *Myzus nicotianae* (Homoptera: Aphididae) by random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction technique. *Annals of the Entomological Society of America* 91: 602-607.
- Margaritopoulos, J. T., J. A. Tsitsipis, E. Zintzaras & R. L. Blackman, 2000. Host-correlated morphological variation of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) populations in Greece. *Bulletin of Entomological Research* 12: 233-244.
- Martinez, D., A. Moya, A. Latorre & A. Fereres, 1992. Mitochondrial DNA variation in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) populations from four Spanish localities. *Annals of the Entomological Society of America* 85: 241-246.
- Martinez-Torres, D., R. Carris, A. Latorre, J. C. Simon, A. Hermoso & A. Moya, 1997. Assessing the nucleotide diversity of three aphid species by RAPD. *Journal of Evolutionary Biology* 10: 459-477.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-232.

- Nicol, D., K. F. Armstrong, S. D. Wratten, C. M., Cameron, C. Frampton & B. Fenton, 1997. Genetic variation in an introduced aphid pest (*Metopolophium dirhodum*) in New Zealand and relation to individuals from Europe. *Molecular Ecology* 6: 255–265.
- Nicol, D., K. F. Armstrong, S. D. Wratten, P. J. Walsh, N. A. Straw, C. M., Cameron, C. Lahmann & C. M. Frampton, 1998. Genetic diversity of an introduced pest, the green spruce aphid *Elatobium abietinum* (Hemiptera: Aphididae) in New Zealand and the United Kingdom. *Bulletin of Entomological Research* 88: 537–543.
- Powers, T. O., S. G. Jensen, S. D. Kindler, C. J. Stryker & L. J. Sandall, 1989. Mitochondrial DNA divergence among greenbug (Homoptera: Aphididae) biotypes. *Annals of the Entomological Society of America* 82: 298–302.
- Puterka, G.Z., W. C. IV Black, W. M. Steiner & R. L. Burton, 1993. Genetic variation and phylogenetic relationships among worldwide collections of the Russian wheat aphid, *Diuraphis noxia* (Mordvilko), inferred from allozyme and RAPD-PCR markers. *Heredity* 70: 604–618.
- Simon, J. C., E. Carrel, P. D. N. Hebert, C. A. Dedryver, J. Bonhomme & J. F. Le Gallic, 1996. Genetic diversity and mode of reproduction in French populations of the aphid *Rhopalosiphum padi* L. *Heredity* 76: 305–313.
- Sneath, P. H. A. & R. R. Sokal, 1973. *Numerical Taxonomy*. W. H. Freeman and Co, San Francisco.
- Tatchell, G. m, J. S. Parker, J. Susan & I. P. Woiwod, 1983. Synoptic monitoring of migrant insect pests in Great Britain and Western Europe. IV. Host plants and their distribution for pest aphids in Great Britain. *Rothamsted. A. Rep. 1982, Part 2*, 45–159.
- van Emden, H. F., V. F. Eastop, R. D. Hughes & M. J. Way, 1969. The ecology of *Myzus persicae*. *Annual Revue of Entomology*, 14: 197–270.
- Vanlerberghe-Masutti, F. & P. Chavigny, 1998. Host-based genetic differentiation in the aphid *Aphis gossypii* Glover, evidenced from RAPD fingerprints. *Molecular Ecology* 7: 905–914.
- Williams, J. G. K., M. K. Hanafey, J. A. Rafalski & S. V. Tingey, 1993. Genetic analysis using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Methods of Enzymology* 218: 704–740.

